

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INRS-SANTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN SCIENCES EXPÉRIMENTALES DE LA SANTÉ

PAR
JEAN DUBÉ

DOPAGE SANGUIN: ANTIGÈNES ÉRYTHROCYTAIRES

JUIN 1993

REMERCIEMENTS

Je ne peux déposer ce mémoire sans remercier, sincèrement, tout ceux qui m'ont aidé à réussir ma maîtrise. Premièrement, mon directeur de recherche, le Dr. Raynald Gareau, pour sa disponibilité et principalement pour la confiance qu'il a su me manifesté tout au long de mon cheminement scientifique. Je veux aussi remercier le Dr Guy Brisson, mon co-directeur, pour sa diplomatie et pour son aide.

De plus, je remercie Claire Chénard-Poirier, Hélène Goulet, Charlotte Caron et Marie-Guylaine Gagnon pour leurs conseils et leur soutien au laboratoire. Je tiens aussi à remercier le Dr. Rogath Gagnon pour sa compréhension, ses conseils et sa foi inébranlable en la biologie médicale.

Finalement, je me dois de remercier du fond du coeur Isabelle sans qui je n'aurais pu accomplir ce travail. Mille mercis, à celle qui a su pendant cette période de ma vie me donner plusieurs raisons d'aller un peu plus loin.

Jean Dubé

RÉSUMÉ

Le terme "dopage sanguin" désigne l'injection de globules rouges (GRs) chez un athlète désirant augmenter sa puissance aérobie en vue d'une épreuve d'endurance. Il existe deux types de dopage sanguin: le dopage autologue, où l'athlète se réinjecte ses propres GRs et le dopage hétérologue, où les GRs utilisés proviennent de donneurs compatibles. Les athlètes de sports d'endurance sont les principaux utilisateurs du dopage sanguin. Parmi ces sports d'endurance, on compte principalement le cyclisme, le marathon et le ski de fond. L'efficacité ergogénique du dopage sanguin dépend de l'augmentation de la masse globulaire. Habituellement, l'injection de deux culots globulaires est suffisante pour augmenter le transport d'oxygène vers le muscle. Si le muscle à l'effort a la capacité oxydative pour utiliser plus d'oxygène, le dopage sanguin devrait augmenter la consommation maximale d'oxygène de l'athlète et lui permettre une meilleure performance.

Le Comité International Olympique (CIO) interdit le dopage par le sang même s'il n'existe actuellement aucune méthode de dépistage. Le mimétisme quasi-parfait, retrouvé entre les cellules d'un même individu, représente une source de difficulté dans le dépistage du dopage sanguin par transfusion autologue. Les méthodes développées par différents groupes de recherche sont inefficaces ou inacceptables. L'apparition de marqueurs irréversibles du vieillissement érythrocytaire, lors de la conservation en banque de sang, pourrait permettre le développement d'une méthode de dépistage du dopage sanguin par cytométrie de flux. Certains antigènes, l'antigène de sénescence (SCA), le Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (Gal), le "decay accelerating factor" (DAF) et le récepteur du complément de type I (CR₁), furent identifiés comme marqueurs du vieillissement érythrocytaire. Ces marqueurs antigéniques permettraient, lors d'analyses en CMF, la distinction de deux populations de cellules dans l'échantillon sanguin d'un athlète utilisant le dopage par le sang. Les populations représenteraient les

érythrocytes normaux et les érythrocytes vieillissants en conservation. De ces antigènes, seul l'antigène DAF fut décelable par cytométrie de flux. Les résultats obtenus avec l'antigène DAF démontrent que les différences entre les jeunes et les vieux érythrocytes sont minimales. De plus, on retrouve des variations élevées d'antigènes DAF entre les individus. Les différences minimales et les variations font que l'antigène DAF serait inutilisable pour le dépistage du dopage sanguin.

Soulignons enfin que ce projet est basé sur des mécanismes naturels d'élimination d'érythrocytes sénescents de la circulation. Ces mécanismes, très efficaces au niveau biologique, sont beaucoup plus sensibles que le cytomètre de flux. Lorsque la sensibilité de ce type d'appareil approchera celle du corps humain, il sera alors possible d'utiliser ces mécanismes naturels pour permettre le dépistage du dopage sanguin, sans moyens d'amplification de la fluorescence.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES	X
INTRODUCTION.....	1
PREMIER CHAPITRE.....	5
<u>1.1 DOPAGE SANGUIN</u>.....	6
1.1.1 PAR TRANSFUSION HÉTÉROLOGUE	6
1.1.2 PAR TRANSFUSION AUTOLOGUE.....	7
1.1.3 LES MÉTHODES DE CONSERVATION	8
1.1.4 LES BASES PHYSIOLOGIQUES	8
1.1.5 LES MÉTHODES DE DÉPISTAGE DU DOPAGE SANGUIN.....	9
<u>1.2 LES STRUCTURES DE L'ÉRYTHROCYTE</u>	11
1.2.1 LA BANDE 3	12
1.2.2 LES ANTIGÈNES DAF ET CR ₁	17
1.2.2.1 LE DAF	20
1.2.2.2 LE CR ₁	23

<u>1.3 LE VIEILLISSEMENT ÉRYTHROCYTAIRE</u>	26
1.3.1 LA BANDE 3 ET LE GAL	26
1.3.1.1 L'HYPOTHÈSE DE KAY.....	27
1.3.1.2 L'HYPOTHÈSE DE LOW.....	29
1.3.1.3 L'HYPOTHÈSE DE GALILI.....	32
1.3.2 LE DAF ET LE CR1	35
 <u>1.4 OBJECTIFS INITIAUX ET LIMITES MÉTHODOLOGIQUES</u>	36
 DEUXIÈME CHAPITRE	40
 <u>2.1 MATÉRIEL</u>	41
2.1.1 PRODUITS ET FOURNISSEURS.....	41
2.1.2 SOLUTIONS	42
2.1.2.1 PRÉPARATION DES ÉRYTHROCYTES	42
2.1.2.2 PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES AUTOLOGUES.....	42
2.1.2.3 ÉLECTROPHORÈSE PAGE-SDS.....	43
2.1.2.4 TRANSFERT WESTERN	44
 <u>2.2 MÉTHODE</u>	45
2.2.1 PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉRYTHROCYTES.....	45
2.2.2 PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES AUTOLOGUES	46
2.2.2.1 PURIFICATION DE L'ANTI-SCA.....	46
2.2.2.2 PURIFICATION DE L'ANTI GAL	48
2.2.3 ÉLECTROPHORÈSE PAGE-SDS	49
2.2.4 TRANSFERT WESTERN.....	51

2.2.5.CYTOMÉTRIE DE FLUX.....	52
2.2.5.1 AVEC DES BILLES FLUORESCENTES.....	52
2.2.5.2 AVEC ANTICORPS FLUORESCENTS.....	54
TROISIÈME CHAPITRE.....	56
<u>3.1 ÉTUDE DE LA FIXATION D'IMMUNOGLOBULINES</u>	
<u>AUTOLOGUES.....</u>	57
3.1.1 PURIFICATION DE L'ANTICORPS ANTI-SCA	57
3.1.2 PURIFICATION DE L'ANTI-GAL.....	60
3.1.3 VÉRIFICATION DE LA SPÉCIFICITÉ DES IgGs AUTOLOGUES PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX	62
<u>3.2 ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES ANTIGÈNES DAF ET CR1</u>	64
QUATRIÈME CHAPITRE.....	67
<u>4.1 DISCUSSION</u>	68
<u>4.2 CONCLUSION.....</u>	74
CINQUIÈME CHAPITRE	75
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABTS: 2,2'-AZINO-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ADN: Acide désoxyribonucléique
BSA: Albumine sérique bovine
COI: Comité Olympique International
CMF: Cytométrie de flux, cytomètre de flux
CPDA-1: Citrate phosphate dextrose adénine
CR₁: Récepteur du complément de type 1
Da: Dalton
DAF: Decay accelerating factor
D.O.: Densité optique
EDTA: Acide tétraacétique éthylène diamine
ELISA: Essai immunométrique enzymatique
FITC: Isothiocyanate de fluorescéine
GR (s): Globule(s) rouge(s)
Hb: Hémoglobine
IgG: Immunoglobuline gamma
IgM: Immunoglobuline mu
kDa: kiloDalton
PBS: Tampon phosphate salin
PMSF: Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PVC: Polyvynile chloré
SCA: Antigène de sénescence
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
TEMED: N,N,N',N',-Tétraméthylène diamine
TRIS: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
VO₂ max: Consommation maximale d'oxygène

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	PAGES
Tableau 1: Volumes des réactifs d'électrophorèse.....	50
Tableau 2: Résultats de la liaison non-spécifique des billes aux GRs (sans anticorps spécifiques).....	64
Tableau 3: Résultats des études d'expression de l'antigène érythrocytaire CR ₁ avec un anticorps marqué au FITC.....	65
Tableau 4: Résultats des études d'expression d'antigènes érythrocytaire DAF par CMF.....	65

LISTE DES FIGURES

FIGURE	PAGES
Figure 1: Électrophorégramme de membranes érythrocytaire représentant la nomenclature de Steck.....	13
Figure 2: Diagramme de la membrane érythrocytaire.....	15
Figure 3: Voies d'activation du complément.....	18
Figure 4: Activité du DAF sur la membrane érythrocytaire.....	22
Figure 5: Activité de l'antigène CR ₁ à différentes étapes de l'activation du complément.....	25
Figure 6: Schémas des composantes érythrocytaires impliquées dans la génération de l'antigène de sénescence sur les GRs vieux, endommagés ou anormaux.....	31
Figure 7: Schéma des interactions de l'anti-Gal.....	34
Figure 8: Schéma du cytomètre de flux.....	38
Figure 9: Profils d'élution de l'anti-SCA sur colonne de protéines G (a) et colonne d'affinité pour le Gal (b).....	58
Figure 10: Schéma de l'électrophorèse SDS-PAGE de l'anti-SCA purifié par la méthode de Kay modifiée.....	59
Figure 11: Schéma du transfert Western effectué sur des membranes érythrocytaires démontrant la spécificité de l'anti-SCA pour la bande 3.....	59
Figure 12: Profils d'élution de l'anti-Gal sur colonne d'affinité Gal (a) et colonne de protéines G (b).....	61
Figure 13: Schéma de l'électrophorèse SDS-PAGE de l'anti-Gal purifié par chromatographie d'affinité Gal et protéine G (b).....	61

INTRODUCTION

Il fallu attendre le XVII^e siècle pour avoir une notion relativement exacte de la circulation sanguine. Harvey, professeur au "Royal College" de Londres, fut le premier à réfuter la théorie d'Hippocrate et celle de Galien, démontrant, en 1623, la double circulation en circuit fermé dépendante des contractions cardiaques¹.

En 1674, Van Leeuwenhoek fut le premier à dessiner le globule rouge (GR) et à décrire ses déformations¹. Le sang est constitué d'environ 45% de cellules (les GRs, les globules blancs, et les plaquettes) et de 55% d'un liquide appelé plasma. Le plasma est un liquide complexe composé d'eau, de sels minéraux, de glucides, de lipides, de protides, de vitamines et d'hormones^{1,2}.

Le rôle des différentes cellules du sang est varié. Celui des globules blancs est de défendre l'organisme, tandis que les plaquettes jouent un rôle important dans le processus de coagulation. Le GR, pour sa part, transporte l'oxygène des poumons aux tissus et le CO₂, et autres déchets métaboliques des tissus aux poumons ou autres organes (reins, foie). La concentration cellulaire du sang varie selon le type de cellule, soit 6×10^3 cellules/ μl pour les globules blancs, 3×10^5 cellules/ μl pour les plaquettes et, finalement, 5×10^6 cellules/ μl pour

les GRs. La quantité importante de GRs reflète l'immense besoin en oxygène du corps et, ainsi, l'importance de maintenir les concentrations d'oxygène dans les tissus.

Le sang est donc un véritable tissu liquide; la simplicité de son prélèvement par ponction veineuse et la facilité de séparation de ses éléments en font un tissu particulièrement intéressant pour l'étude des fonctions cellulaires. L'utilisation d'anticoagulants facilita beaucoup ces différentes études. En 1915, un médecin de New York observa qu'il était possible de conserver du sang citraté pendant plusieurs jours dans une glacière pour ensuite le retransfuser. Plus tard, au cours de la première guerre mondiale, on démontra que le sang prélevé dans une solution de citrate-glucose pouvait se conserver jusqu'à trois semaines après son prélèvement². Aujourd'hui, les nouvelles techniques de conservation permettent de conserver le sang jusqu'à 35 jours à 4°C. Ceci représente un énorme avantage d'un point de vue thérapeutique.

Toutefois, il n'y a pas seulement le monde médical qui bénéficie de la conservation érythrocytaire mais aussi celui du sport d'élite. En effet, certains athlètes d'endurance utilisent les transfusions sanguines afin d'améliorer leurs performances. Cette amélioration de performance s'expliquerait par l'augmentation de la masse globulaire, de la capacité de transport d'oxygène et de l'approvisionnement en

oxygène aux muscles³. Selon la méthode de conservation utilisée, la phlébotomie peut s'effectuer quelques 35 jours ou plus avant la compétition. Une ou deux unités de sang sont alors réinjectées entre 1 et 7 jours avant la compétition ayant pour effet d'augmenter la masse globulaire de l'athlète^{4,9}.

Malgré l'utilisation depuis 1947 du dopage sanguin pour des raisons scientifiques, ce n'est qu'aux Jeux Olympiques de Montréal, en 1976, que les premières rumeurs de dopage sanguin prirent naissance. En 1985, ces rumeurs furent confirmées lorsque le magazine Rolling Stone publia un exposé intitulé "Olympic Cheating. The inside story of illicit doping and the U.S. cycling team.", dans lequel des cyclistes américains ont avoué avoir utilisé le dopage sanguin comme aide ergogène^{5,6}. Plus récemment encore, la production d'érythropoïétine humaine recombinante est venue donner un autre outil de choix aux athlètes. En effet, cette hormone produite par le rein augmente la production de GRs de l'organisme, produisant chez l'athlète le même effet que le dopage sanguin. Ces deux formes de dopage sont officiellement interdites par le Comité International Olympique (CIO) mais il n'existe à ce jour aucune méthode de dépistage acceptée par ce dernier.

Pour cette raison, les travaux de ce travail de recherche furent orientés vers la mise au point d'une méthode de dépistage du dopage

sanguin par transfusion autologue. Plus spécifiquement l'objectif de ce travail visait à identifier certains antigènes susceptibles d'être modifiés lors de leur conservation en banque de sang. Différents antigènes propres au GR (le SCA, le Gal, le DAF et le CR₁) furent marqués par des méthodes immunologiques. Les cellules furent étudiées par cytométrie de flux (CMF) afin de distinguer les différences de fluorescence entre les jeunes et les vieux GRs. Si des différences antigéniques étaient décelées par CMF, il serait alors éventuellement possible de distinguer deux populations de cellules dans un échantillon de sang provenant d'un athlète utilisant le dopage sanguin. Ces populations représenteraient les GRs normaux en circulation et les GRs réinjectés à des fins de dopage.

PREMIER CHAPITRE
PROJET DE RECHERCHE

1.1 DOPAGE SANGUIN

Le terme "dopage sanguin" désigne l'administration exogène de GRs à un athlète dans le but d'augmenter sa capacité aérobie en vue d'une épreuve d'endurance. Il existe deux types de dopage sanguin: le dopage autologue, où l'athlète se réinjecte ses propres GRs, et le dopage hétérologue, où les GRs utilisés proviennent de donneurs compatibles. Les athlètes de sports d'endurance sont les principaux utilisateurs du dopage sanguin. Parmi ces sports d'endurance, on compte principalement le cyclisme, le marathon et le ski de fond. Certains rapportent même des cas de dopage sanguin chez les lévriers et les chevaux de course^{7,8}. Ces deux types de dopage seront maintenant discutés d'un point de vue technique.

1.1.1 DOPAGE PAR TRANSFUSION HÉTÉROLOGUE

Le dopage sanguin par transfusion hétérologue est impopulaire malgré les avantages qu'il peut représenter. Contrairement au dopage autologue, l'athlète ne subit pas les effets de désentraînement de la phlébotomie. De plus, le sang prélevé peut être utilisé immédiatement après la phlébotomie sans avoir à subir les conséquences néfastes de la conservation^{7,9}. Toutefois, à ces avantages s'ajoutent plusieurs désavantages, dont les risques

d'infections, de réactions transfusionnelles, et de détection. En effet, cette forme de dopage est facilement décelable par l'utilisation de tests immunologiques (à moins que le sang provienne d'un jumeau identique). Il existe donc plusieurs bonnes raisons pour l'athlète d'utiliser le dopage sanguin par transfusion autologue.

1.1.2 DOPAGE PAR TRANSFUSION AUTOLOGUE

Le dopage par transfusion autologue implique le retrait de deux unités de sang chez l'athlète. Ce sang est conservé et réinjecté environ sept jours avant une compétition. La phlébotomie s'effectue de 3 à 5 semaines avant la transfusion (délais plus longs si la conservation se fait par congélation au glycérol), ces délais sont nécessaires pour permettre au niveau d'Hb de se renormaliser, sans oublier que le pourcentage de cellules viables en conservation diminue de semaine en semaine^{9,10}. Fréquemment, une période plus longue (pour la conservation au glycérol) est nécessaire pour permettre à l'athlète de récupérer les capacités physiques perdues suite à la phlébotomie (effets de désentraînement)^{7,9,10}. On en déduit que l'efficacité ergogénique du dopage sanguin varie selon la méthode de conservation du sang.

1.1.3 LES MÉTHODES DE CONSERVATION

Il existe deux méthodes de conservation des GRs. La plus classique utilise des sacs commerciaux contenant du CPDA-1 pour la conservation du sang à 4°C. L'autre s'effectue par congélation des GRs à -80°C dans du glycérol. La première méthode permet de conserver des GRs jusqu'à 5 semaines (35 jours), après quoi le taux de viabilité des GRs chute rendant alors la transfusion inutile. En utilisant la conservation au glycérol le vieillissement des cellules est interrompu. On peut ainsi conserver des GRs pendant plusieurs années pour ensuite les transfuser avec des pertes négligeables. Des banques de sang utilisant cette technique de conservation existent aux États-Unis pour des patients désirant utiliser leur propre sang pour des besoins chirurgicaux^{9,10}. L'hypothèse de recherche de ce travail de maîtrise repose sur les changements se produisant lors de la conservation classique de GRs à 4°C.

1.1.4 LES BASES PHYSIOLOGIQUES

L'efficacité ergogénique du dopage sanguin dépend de l'augmentation de la masse globulaire. Habituellement, l'injection de deux culots globulaires est suffisante pour augmenter le transport d'oxygène vers le muscle. Si le muscle à l'effort dispose de la capacité

oxidative d'utiliser plus d'oxygène, le dopage sanguin devrait alors augmenter la consommation maximale d'oxygène (donc le $\dot{V}O_2$ max) de l'athlète et lui permettre une meilleure performance^{3,4,7,9,11}.

En plus de son effet sur la consommation maximale d'oxygène, le dopage sanguin aurait des effets bénéfiques sur la thermorégulation et le tamponnage de l'acide lactique, ce qui en augmenterait d'autant son utilité ergogène^{4,9,12}. Toutefois, le dopage sanguin n'a pas que des effets bénéfiques. En plus des risques mentionnés précédemment et liés aux transfusions hétérologues, toutes les transfusions comportent des risques lorsqu'effectuées de façon non-professionnelle. Parmi ces risques on compte la thrombose, la phlébite, la septicémie, l'insuffisance cardiaque et même la mort^{4,9}.

1.1.5 LES MÉTHODES DE DÉPISTAGE DU DOPAGE SANGUIN

Le dopage sanguin, interdit par le CIO, est reconnu comme une forme de tricherie. Malgré cela, il n'existe à ce jour aucune méthode de dépistage du dopage sanguin. Cette absence de dépistage facilite l'utilisation du dopage sanguin par les athlètes.

Tel que mentionné précédemment il existe deux formes de dopage sanguin: hétérologue et autologue. Le dopage sanguin hétérologue se détecte facilement en démontrant que certaines des cellules sont porteuses d'antigènes de groupes sanguins différents de ceux de l'athlète. À ce jour, aucune méthode précise de détection ne fut mise au point due à l'utilisation minimale de cette forme de dopage^{9,10}. Conséquemment, on peut affirmer que les recherches sont effectuées dans le but de mettre au point une méthode de dépistage du dopage sanguin autologue.

Le CIO a subventionné certains travaux de recherche effectués par le chercheur scandinave Berglund. Une technique proposée par son équipe utilise un algorithme dans lequel l'érythropoïétine sérique et l'Hb sont mesurés. Les résultats de ces dosages servent à conclure au dopage; toutefois cette approche donne trop souvent des résultats faussement négatifs^{9,10}.

Le marquage au ⁵¹Cr est une autre technique pouvant mettre en évidence un dopage sanguin. Toutefois cette méthode demande le prélèvement de six échantillons sanguins sur une période de deux semaines, ce qui demeure inapplicable pour des athlètes en compétition. Finalement, une nouvelle avenue de recherche fut proposée: considérant les variations de tailles se produisant lors de la conservation, un appareil, le Technicon H6000, produisant des

histogrammes de distribution de tailles des GRs, pourrait être utilisé dans le dépistage d'un dopage sanguin¹⁰. La cytométrie de flux allie les caractéristiques d'analyse de taille à celles de l'immunofluorescence, élargissant grandement ses capacités.

1.2 LES STRUCTURES DE L'ÉRYTHROCYTE

L'érythrocyte est une cellule particulière en raison de ses capacités de transport d'oxygène à travers l'organisme. Pour accomplir ses fonctions, le GR dépense beaucoup d'énergie, traversant des capillaires dont le diamètre est inférieur à son diamètre cellulaire. Pour y parvenir, l'érythrocyte doit être complètement fonctionnel, le moindre défaut de fonctionnement pouvant le rendre inutile à l'organisme. En moyenne, les GRs circulent pendant 120 jours, après quoi ils sont éliminés de la circulation.

La membrane érythrocytaire est constituée de plusieurs protéines et glucides ayant pour la plupart des rôles physiologiques, immunologiques et structuraux. Les sucres sont à la base de la plupart des antigènes, dont ceux de groupe ABO; ils possèdent des fonctions immunologiques plus importantes que les protéines. Ces dernières seraient impliquées dans le maintien de l'intégrité

structurale et membranaire de la cellule. Les protéines portent également certains antigènes caractérisant les groupes sanguins.

Les fonctions des protéines sont très diversifiées: certaines exerçant un rôle au niveau du cytosquelette, d'autres dans le transport d'ions à travers la membrane, ou une combinaison des deux. Parmi ces protéines, la bande 3, l'antigène DAF et l'antigène CR₁ retiennent plus particulièrement l'attention en vertu de leurs rôles dans l'élimination naturelle des vieux érythrocytes de la circulation^{14,15,16,65}.

1.2.1 LA BANDE 3

Selon la nomenclature de Steck (voir la figure 1), les protéines érythrocytaires se séparent selon leur migration électrophorétique en bande 1, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.5, 3, 4.1, 4.2, 4.5, 5, 6, 7, et 8. La bande 3 correspond à une protéine transmembranaire d'environ 95 000 Da telle qu'estimé par électrophorèse PAGE-SDS¹⁷. On retrouve cette protéine sur une multitude de cellules autres que l'érythrocyte dont les hépatocytes, les cellules de l'épithélium pavimenteux, les cellules des alvéoles pulmonaires, les lymphocytes, les cellules rénales, les neurones et les fibroblastes^{18,19}. De plus, on la retrouve sur les membranes nucléaires, mitochondriales et celles de l'appareil de

Golgi, ce qui en fait un constituant membranaire universel^{18,20,21}. Elle est aussi présente chez d'autres espèces animales comme les volailles, les souris, les rats, et les bovins^{22,23}.



Figure 1: Électrophorogramme de membranes érythrocytaires représentant la nomenclature de Steck. Les protéines sont identifiées selon leur migration électrophorétique¹⁷.

Sur le GR, la protéine de bande 3 est présente en 1.2×10^6 copies; elle constitue donc l'une des composantes majeures de la membrane érythrocytaire, constituant jusqu'à 30% des protéines membranaires²⁴. La bande 3 peut être divisée en deux parties ayant chacune une fonction particulière: une partie cytoplasmique NH_2 -terminale hydrosoluble et une autre membranaire carboxy-terminale^{25,26,27,28}. La partie membranaire traverse la membrane

plusieurs fois et est responsable du transport anionique^{27,29,30}. La partie cytoplasmique complémentaire (42 000 Da) lie l'Hb, l'ankyrine et différents enzymes glycolytiques: la déshydrogénase glycéraldéhyde-3-phosphate, l'aldolase et la phospho-fructokinase^{31,32}. On s'interroge de plus en plus sur l'existence de liaisons enzymatiques à la bande 3 "*in vivo*" car toutes les études démontrant ce type de liaison furent effectuées à des pHs et des forces ioniques non physiologiques.

La partie cytoplasmique de la bande 3 est plus longue et plus effilée que son homologue membranaire²⁷. "*In vitro*", la bande 3 peut s'associer en dimère et en tétramère dans le plan de la membrane; toutefois, plusieurs études démontrent que la forme dimérique est plus fréquente "*in situ*"^{28,29}.

La bande 3 possède deux fonctions bien établies, celle de transporteur d'anions et celle de pilier structural par sa liaison à l'ankyrine. Le transport anionique est assuré par la partie membranaire de la molécule et sert au maintien de l'équilibre acide-base. Les anions impliqués dans ce transport sont les chlorures (Cl⁻) et les bicarbonates (HCO₃⁻)²². La partie membranaire catalyse donc l'échange rapide d'ions Cl⁻ pour des ions HCO₃⁻, ce qui facilite le passage du CO₂ des tissus vers les capillaires ainsi que son excrétion dans les poumons. L'échange d'ions permet l'évacuation des

bicarbonates de la cellule en échange d'ions chlorures, augmentant la capacité de transport du CO₂ par le sang, et ce, par un mécanisme dit de ping-pong³³.

La protéine de bande 3 sert aussi d'ancrage de la membrane au cytosquelette. La figure suivante illustre bien cette fonction.

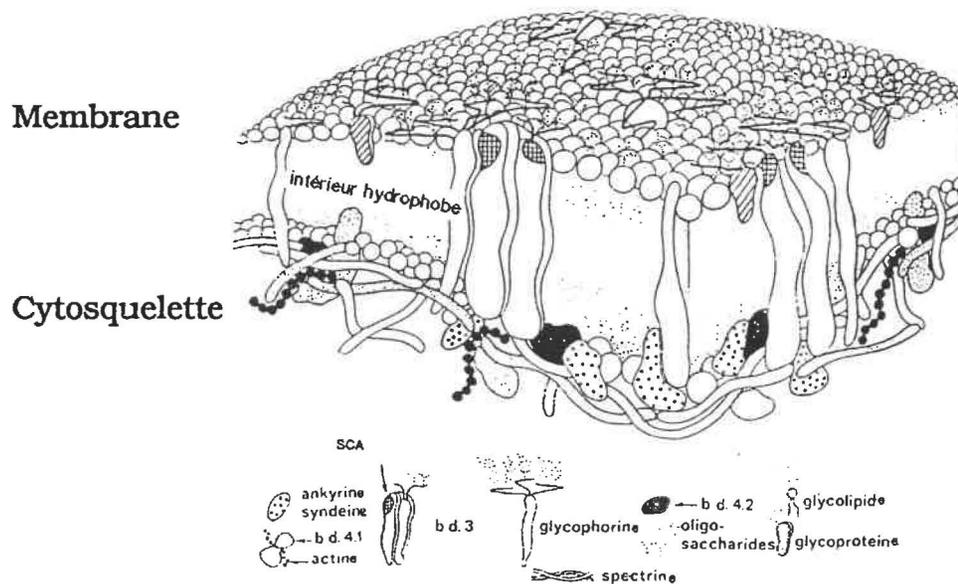


Figure 2: Diagramme de la membrane érythrocytaire³⁴.

La figure 2 démontre la liaison de la bande 3 à l'ankyrine. L'ankyrine étant fixée à la spectrine, protéine prédominante du cytosquelette, permet l'ancrage du cytosquelette à la membrane. La liaison avec l'ankyrine s'effectue par les sous-unité β de la spectrine ($K_d=10^{-8}M$) à 200 Å de sa jonction dimère-tétramère³⁵.

Il existe aujourd'hui diverses hypothèses sur la transmission d'un signal de sénescence par les GRs. Ce signal pourrait être de nature biochimique (relâchement d'une substance chimique par les GRs âgés) ou antigénique (apparition d'un antigène marquant les vieux GRs). Le signal expliquerait l'élimination rapide des GRs après environ 120 jours de vie dans l'organisme^{36,37}. Les travaux effectués par différents auteurs favorisent une explication par des mécanismes antigéniques qui seront décrits ultérieurement. Le système immunitaire reconnaît l'antigène (appelé antigène de sénescence, SCA) exprimé à la surface des GRs et élimine toute cellule portant cet antigène. Deux hypothèses, étant chacune associée à un mécanisme d'apparition des antigènes de sénescences, sont proposées aujourd'hui: l'hypothèse de Kay et celle de Low, toutes deux médiées par la présence d'un anticorps de type IgG reconnaissant la bande 3.

1.2.2 LES ANTIGÈNES DAF ET CR₁

Les antigènes DAF et CR₁ furent étudiés dans ce travail de recherche car présents en quantité variable sur les jeunes et les vieux érythrocytes^{63,64}. Les techniques cytométriques pourraient mesurer ces différences et éventuellement permettre l'élaboration d'une méthode de dépistage du dopage sanguin par transfusion autologue. Pour une meilleure compréhension, une description biochimique (structure, distribution) et physiologique de ces molécules suivra.

Dans un premier temps, nous examinerons la situation de deux antigènes (DAF et CR₁) dans la cascade du complément humain de façon à bien comprendre leurs rôles respectifs. Le complément est constitué d'un ensemble de protéines sériques qui, le plus souvent, complète l'action d'un anticorps, d'où le nom de complément. Il est représenté par la lettre C et les neuf constituants identifiés jusqu'à maintenant sont numérotés de C1 à C9³⁸. L'activation complète du complément conduit à la lyse de la cellule sur laquelle il s'est fixé. Il existe deux voies d'activation de la cascade du complément, la voie classique qui est habituellement déclenchée par les immunoglobulines d'un complexe antigène-anticorps, et la voie alternative, activée en l'absence de complexe antigène-anticorps par différentes substances comme entre autres des agrégats d'immunoglobulines, des endotoxines et des parois de levures³⁸.

La figure 3 représente un schéma des différentes voies d'activation du complément. Un ensemble de molécules ayant des conséquences aussi importantes que la lyse cellulaire (comme les molécules impliquées dans la cascade du complément) doit nécessairement être contrôlé de façon très efficace; voilà le rôle attribué au DAF et au CR₁.

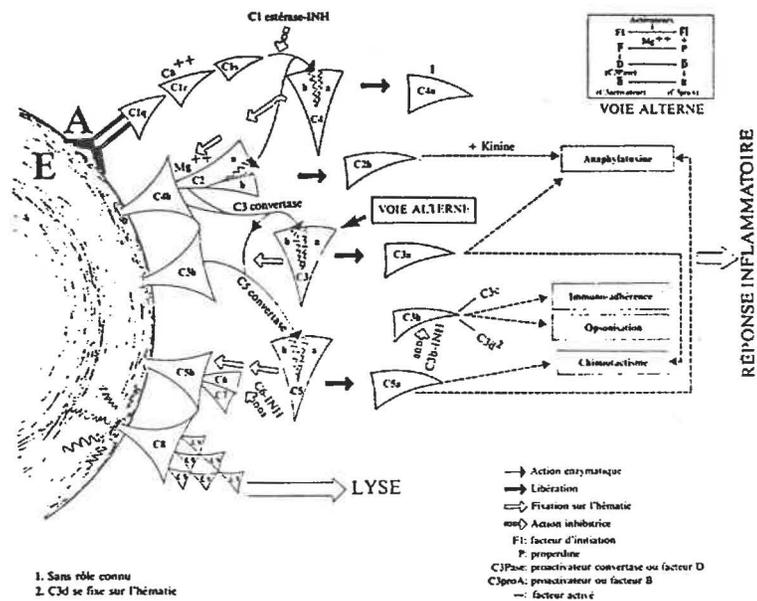


Figure 3: Voies d'activation du complément³⁸.

Les différents constituants du complément adhèrent souvent aux cellules normales comme aux bactéries. Ces constituants doivent initier la cascade complète du complément sur des bactéries mais doivent être inhibés sur les cellules de l'hôte par différentes molécules régulatrices. Les cellules disposent de plusieurs protéines membranaires modulant l'activité des constituants du complément³⁹.

L'étape de formation des enzymes clivant le constituant C3 (convertases-C3) représente l'étape où la plupart des mécanismes de régulation du complément agissent. Ces complexes enzymatiques bimoléculaires (convertases-C3) sont constitués d'une partie protéique cellulaire (attachée à la cellule) sur laquelle une enzyme de type protéase sérine (responsable du clivage du constituant du complément C3) se lie de façon non-covalente³⁹. Les convertases-C3 transforment le constituant C3 en fragments C3a et C3b, ce dernier se déposant à la surface des cellules ou des bactéries. Lorsqu'une quantité importante de fragments C3b se dépose sur une cellule ou une bactérie, celle-ci peut être ingérée et détruite par un macrophage possédant des récepteurs pour les fragments C3b du complément.

Cette même cellule ou bactérie peut par ailleurs être lysée par les constituants du complément responsable de la formation du complexe d'attaque membranaire. Conséquemment, l'essentiel des

mécanismes de régulation s'exerce par la modulation de l'activité des convertases-C3³⁹.

1.2.2.1 LE DAF

L'antigène DAF (decay-accelerating factor, CD55) est une protéine de régulation du système du complément qui agit sur deux molécules, soit 1) la convertase-C3 et 2) la convertase-C5. Le DAF humain, une glycoprotéine membranaire d'environ 70 kDa (en électrophorèse SDS-PAGE), se retrouve sur différents types de cellules⁴⁰. Il fut identifié initialement sur les GRs mais se retrouve aussi sur les neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes, les granulocytes et les plaquettes^{39,41}. La séquence génétique de la protéine de DAF humain est maintenant connue et le gène de 35kb codant pour la protéine se situe sur le chromosome 1³⁹. Une attention particulière sera consacrée au DAF érythrocytaire dont l'expression se situe approximativement à 3000 sites par cellule. Le DAF fut purifié pour la première fois en 1981. Suite à l'addition de DAF purifié à une suspension de GRs, celui-ci se réincorpore à la membrane comme une protéine membranaire et démontre alors une activité fonctionnelle normale³⁹. Des recherches conclurent que le DAF appartenait à une nouvelle classe de protéines ayant leur extrémité carboxy-terminale attachée de façon covalente à un glycophospholipide. Ce glycophospholipide, inséré dans le feuillet

externe de la membrane lipidique, serait constitué de phosphatidylinositols³⁹. L'ajout d'un enzyme spécifique aux phosphatidylinositols, la phospholipase C permet de détacher le DAF des GRs³⁹.

L'antigène DAF se retrouve aussi dans le sérum, l'urine, les larmes, la salive, le liquide synovial et le liquide céphalo-rachidien. L'origine de ces formes solubles de DAF demeure indéterminée. Certaines études suggèrent néanmoins l'apparition de cet antigène dans les liquides corporels suite à l'action de phospholipases endogènes sur les membranes cellulaires. Toutes ces formes de DAF possèdent des poids moléculaires différents de celui de la forme membranaire³⁹.

Plus récemment, il fut démontré que la molécule de DAF est porteuse de quelques antigènes de groupes sanguins. Parmi ceux-ci, on compte les antigènes Cr^a et Tc^a humains^{39,42}. Le rôle de l'antigène DAF étant de protéger les tissus de l'hôte contre le complément, il serait logique de croire à une distribution ubiquitaire de cette molécule entre les espèces. À ce jour, le DAF n'a été isolé que chez le lapin et le cochon d'Inde³⁹. Chez l'humain, une déficience en antigène DAF est associée à l'hémoglobinurie paroxysmale nocturne, pathologie où les patients souffrent d'épisodes de sensibilité au complément produisant une lyse des GRs^{39,43,44,45}. L'injection de

DAF purifié corrige momentanément la situation par sa réincorporation dans la membrane des érythrocytes déficients³⁹.

L'antigène DAF prévient l'assemblage des convertases-C3 et C5 formées par voie classique ou par voie alternative. Ces convertases servent d'étape d'amplification de la cascade du complément³⁹. La figure 4 ci-dessous montre le rôle de l'antigène DAF dans le contrôle de l'activité du complément. On observe sur cette figure le constituant du complément C3b attaché à la membrane par un lien covalent et l'antigène DAF ancré à une structure glycophospholipidique.

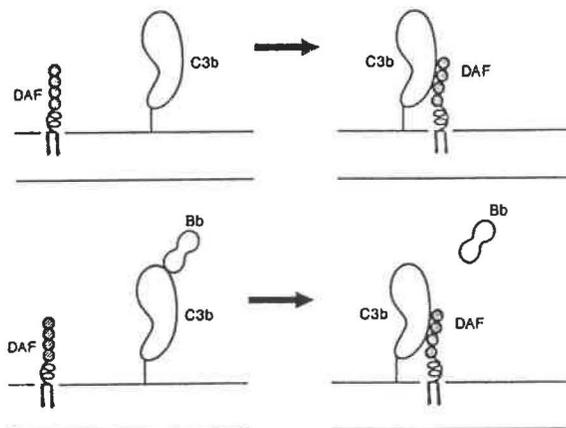


Figure 4: Activité de l'antigène DAF sur la membrane érythrocytaire³⁹.

La portion supérieure de la figure illustre la liaison de l'antigène DAF au C3b, cette liaison inhibant la formation de la convertase-C3 (C3bBb). La portion inférieure illustre la dissociation par l'antigène DAF d'une convertase-C3 déjà formée. L'effet de l'antigène DAF sur la convertase-C3 déjà formée constitue la fonction première de la molécule antigénique DAF. Une activité identique fut décrite pour la convertase-C3 formée par la voie classique (C4b2a)³⁹.

1.2.2.2 LE CR₁

L'antigène CR₁ (CD35, récepteur C3b/C4b) est une autre protéine de régulation du système du complément. Le CR₁ humain est une protéine polymorphique. On décrit habituellement l'antigène CR₁ comme étant une glycoprotéine d'environ 205 kDa. Toutefois, il est connu que des formes de 160kDa, 190kDa, 220kDa, et 250kDa existent et représentent quatre allotypes différents de CR₁^{46,47,48,49}. À l'origine, l'antigène CR₁ fut extrait et décrit sur des GRs; depuis il fut identifié sur les granulocytes, les monocytes, les lymphocytes B et certains lymphocytes T, sur les podocytes rénaux et les cellules du réticulum dendritique^{46,47,49}. Différentes méthodes de mesure démontrent que le nombre de sites de CR₁ chez différents sujets varie de 10 à 100 fois tout en variant très peu chez un même sujet⁴⁷. Les chercheurs semblent s'entendre pour reconnaître une valeur moyenne

d'environ 500 sites de CR₁ par GR⁴⁷. La molécule de CR₁ exprime quelques antigènes globulaires de groupes sanguins; parmi-ceux-ci, on compte les antigènes humains Knops (Kn^a), McCoy (McC^a), Swain-Langley (Sl^a ou McC^c) et York (Yk^a)⁵⁰.

Le rôle de l'antigène CR₁ est sensiblement le même que celui de l'antigène DAF, c'est-à-dire protéger les tissus de l'hôte contre le système du complément. Ces molécules diffèrent cependant par leur mécanisme d'action. L'antigène DAF agit de façon intrinsèque sur la cellule-hôte tandis que l'antigène CR₁ agit plutôt de façon extrinsèque sur une autre cellule que la cellule-hôte⁴⁶. L'antigène érythrocytaire CR₁ aurait donc un rôle majeur dans l'élimination et l'orientation des complexes immuns circulant⁵¹. Physiologiquement, les GRs sont porteurs de plus de 90% des antigènes CR₁ sanguins, ce qui peut expliquer leur implication dans l'élimination de complexes immuns circulant⁴⁶.

La pathologie du lupus érythémateux systémique, une maladie auto-immune caractérisée par la production d'anticorps dirigés contre des antigènes ubiquitaires, est associée à une diminution de l'expression de l'antigène CR₁^{46,47,48,49,51}. Cette diminution d'expression demeure inexpliquée alors qu'une élévation du niveau d'expression chez ces patients correspond à une période de rémission⁴⁶.

La figure 5 illustre le rôle de l'antigène CR₁. Ce dernier dissocie les convertases-C3 présentes sur une autre cellule (C3bBb ou le C4b2a) afin de les inactiver⁴⁶.

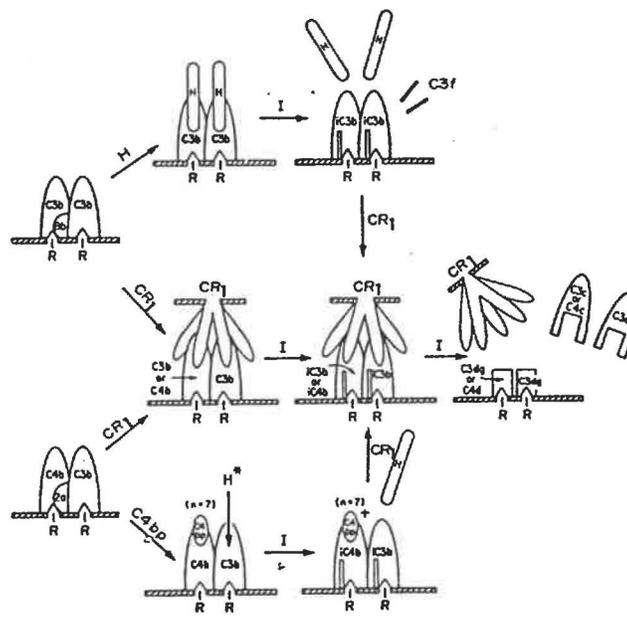


Figure 5: Activité de l'antigène CR₁ à différentes étapes de l'activation du complément⁴⁶.

1.3 LE VIEILLISSEMENT ÉRYTHROCYTAIRE:

La formation des antigènes de sénescence et les modulations antigéniques.

Le maintien du niveau de GRs dans l'organisme est une fonction très importante qui fait partie de l'homéostasie corporelle. Plus spécifiquement, le vieillissement provoque l'apparition de différents antigènes et/ou une modulation antigénique à la surface du GR et déclenche certains mécanismes immunologiques visant à retirer le GR de la circulation. Ce sont ces mêmes mécanismes qui sont mis à profit pour le développement d'une méthode de dépistage du dopage sanguin.

1.3.1 LA BANDE 3 ET L'ANTIGÈNE GAL

Deux auteurs, Kay et Low^{14.15}, proposent l'interaction d'anticorps avec la bande 3 érythrocytaire comme mécanisme immunologique d'élimination des GRs. Un troisième auteur, Galili¹⁶, y voit plutôt l'apparition d'un antigène de nature glucidique sur lequel se fixerait un anticorps spécifique. Tous ces antigènes sont formés par des processus de vieillissement qui seront discutés ultérieurement.

1.3.1.1 L'HYPOTHÈSE DE KAY

L'hypothèse d'apparition d'un nouvel antigène sur des cellules sénescents provient d'études tentant de démontrer les mécanismes macrophagiques de reconnaissance du soi et du non-soi (sénescents). Ces études démontrèrent la liaison spécifique d'anticorps de type IgG sur des érythrocytes humains vieillissants "*in situ*" ainsi que la présence de l'antigène de sénescence (SCA), un antigène de différenciation terminale¹⁴. Cet antigène est reconnu par la partie Fab spécifique d'un autoanticorps sérique de type IgG. La liaison de l'anticorps à l'antigène érythrocytaire entraîne l'élimination du GR de la circulation sanguine par l'intermédiaire des macrophages.

Au cours du vieillissement, plusieurs changements se produisent chez l'érythrocyte humain: l'augmentation de la dégradation de la bande 3, la diminution de la capacité de transport anionique, la diminution du nombre de sites de liaison de haute affinité à l'ankyrine et la diminution de l'activité totale de la déshydrogénase glycéraldéhyde-3-phosphate avec augmentation de son activité membranaire. De plus, une augmentation des liaisons d'IgGs autologues caractérise aussi le vieillissement érythrocytaire^{14,22}.

Le SCA se retrouve sur les érythrocytes humains ainsi que sur les lymphocytes, les granulocytes, les plaquettes, les cellules embryonnaires rénales, les cellules hépatiques adultes et les neurones^{19,52}. Il serait localisé sur une portion extracellulaire comprise sur le dernier 35 000 Da du segment carboxy-terminal de la bande 3 ainsi que sur 30% de la région responsable du transport anionique (17 000 Da)^{53,54}. Aujourd'hui, des chercheurs vérifient si l'apparition du SCA et les changements subis par la bande 3 sont des procédés généraux associés à la destruction des cellules différenciées²². À ce jour, les résultats semblent confirmer ces procédés pour tous les types de cellules.

Selon certaines études, des mécanismes d'oxydation seraient impliqués dans la formation du SCA et induiraient un processus de protéolyse de la bande 3⁵⁵. Ces mécanismes d'oxydation furent étudiés chez des rats déficients en vitamine E, une vitamine aux propriétés anti-oxidantes bien connues⁵⁵. Chez l'humain, une déficience en vitamine E diminue la durée de vie des érythrocytes. Le rôle du SCA dans l'élimination des cellules sénescents a aussi été décrit dans des cas d'anémie hémolytique, d'anémie à hématies falciformes et de malaria²².

La séquence d'ADN de la bande 3 humaine et celle d'autres espèces est maintenant connue. Leurs segments membranaires

démontrent un degré d'homologie élevé, peu importe l'espèce, le type de tissus ou de cellules. Kay²² a récemment utilisé des techniques de cartographie peptidique pour déterminer l'emplacement exact du SCA ainsi que le point de clivage de la protéine de 40 000 Da. Ces études suggèrent que le clivage s'effectue dans la région responsable du transport anionique, approximativement au tiers de la partie membranaire à partir de l'extrémité carboxy-terminale. Le SCA fut localisé aux résidus 538-554 (pep-ANION 1) et 812-827 (pep-COOH) de la bande 3 par des études de compétition et des études de transfert utilisant des peptides synthétiques pour adsorber les IgGs isolés de GRs sénescents²². La combinaison de ces deux peptides dans des épreuves d'inhibition fit augmenter le taux d'inhibition, démontrant que ces deux peptides semblent interagir pour former une structure tridimensionnelle, l'antigène de sénescence (SCA).

1.3.1.2 L'HYPOTHÈSE DE LOW

Différente au niveau du concept mais identique en résultat, l'hypothèse de Low soutient que le SCA apparaît suite à une agrégation de la bande 3 dans le plan de la membrane érythrocytaire¹⁵. Lors de différentes situations de stress oxydant, l'Hb se transforme en metHb, puis en hémichromes, molécules partiellement dénaturées et non-fonctionnelles^{15,56}.

Ces hémichromes ne se retrouvent pas à l'intérieur d'érythrocytes normaux mais sont plutôt générés dans des cellules contenant des Hbs instables ou dans des cellules soumises à différents stress biochimiques. Les hémichromes se retrouvent aussi à l'intérieur d'érythrocytes normaux sénescents. Les anémies à hématies falciformes, les GRs contenant des Hbs mutantes, les thalassémies et les déficiences en déshydrogénase glucose-6-phosphate ou en peroxidase glutathione, s'associent tous à des concentrations élevées d'hémichromes. Les cellules contenant des hémichromes sont retirées de la circulation plus rapidement que les cellules normales^{15,56}.

Différentes études ont démontré que la bande 3 et les hémichromes interagissent "*in vitro*" et "*in vivo*". En fait, lorsque l'enzyme déshydrogénase glycéraldéhyde-1-phosphate est absent de la bande 3, il existe un site de haute affinité et un autre de faible affinité pour la fixation d'hémichromes. Seul un site de faible affinité est retrouvé lorsque l'enzyme est présent sur la partie N-terminale de la protéine.

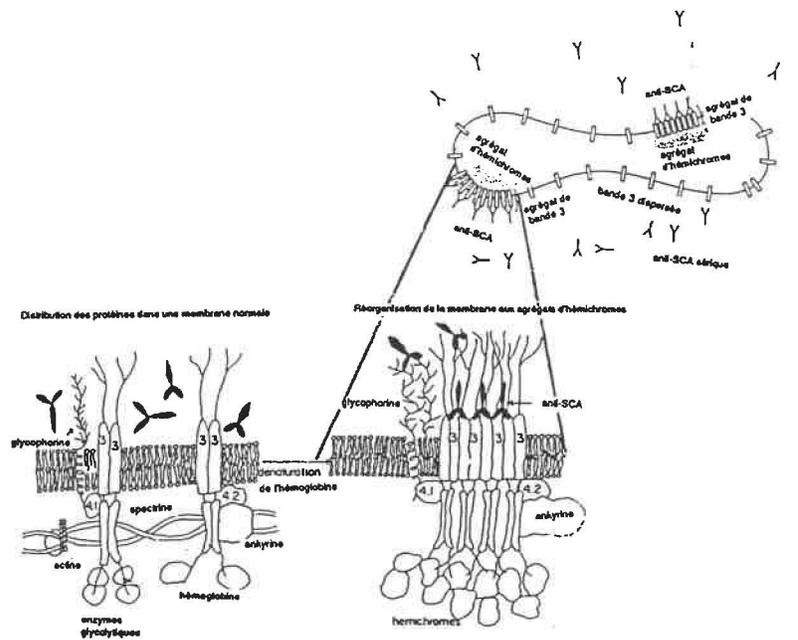


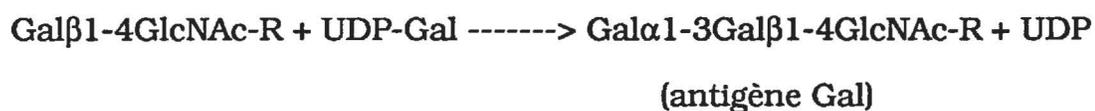
Figure 6: Schéma des composantes érythrocytaires impliquées dans la génération de l'antigène de sénescence sur les GRs vieux, endommagés ou anormaux^{15,56}.

Les hémichromes (voir figure 6), possédant une affinité pour la bande 3, s'associent avec celle-ci produisant une agrégation de bandes 3 dans la membrane. Les bandes 3 entraînent aussi avec elles, de façon directe ou indirecte, des glycophorines. Les glycophorines, les hémichromes et la bande 3 forment un méga-complexe produisant l'antigène de sénescence⁵⁷. L'ensemble de ces événements constitue un signal de sénescence communiquant au système immunitaire un défaut de fonctionnement dans le cytoplasme du GR¹⁵.

1.3.1.3 L'HYPOTHÈSE DE GALILI

L'hypothèse de Galili⁵⁸ fut élaborée suite à la découverte d'un anticorps plasmatique qui fut nommé anti-Gal. Cet anticorps polyclonal de spécificité α -galactosyl se lierait de façon spécifique aux vieux GRs et constituerait jusqu'à 1% des IgGs circulants.

L'anticorps, dans ce mécanisme d'élimination des GRs, est spécifique à un antigène de nature glucidique. La spécificité de l'anti-Gal fut décelée par la possibilité d'éluer cet anticorps de la membrane de vieux GRs à l'aide de solutions contenant du galactose ou un oligosaccharide α -galactosyl⁵⁹. En utilisant des érythrocytes de lapins qui fixent l'anti-Gal de façon spécifique, il fut démontré que l'anti-Gal est un anticorps spécifique à un résidu α -galactosyl terminal, de structure Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R, exposé lors du vieillissement des GRs "*in vivo*"⁵⁸. On estime entre 1000 et 2000 le nombre de sites antigéniques de fixation de l'anti-Gal par cellule chez l'humain. Ce faible nombre de site s'expliquerait par une diminution de l'activité de l'enzyme α 1-3 galactosyltransférase avec l'évolution. Cet enzyme catalyse la réaction suivante¹⁶:



L'antigène Gal est inaccessible en raison de sa position cryptique; avec l'âge, il devient accessible suite à une augmentation du séjour de l'érythrocyte dans les sinus du système réticuloendothélial^{16,58}. Lors de ce séjour, le GR se voit exposé aux enzymes protéolytiques des macrophages bordant ces sinus et la protéolyse enzymatique rend accessible l'antigène cryptique^{16,58}. Cet antigène, faisant partie des glycolipides membranaires, fut aussi mesuré sur 20 à 40% des érythrocytes de patients thalassémiques ou atteints d'anémie falciforme ainsi que sur des GRs âgés^{16,58}.

Plus tard, on découvrit que l'anti-Gal variait selon le groupe ABO de l'individu. L'anti-Gal provenant d'individus de groupe AB, ne reconnaît pas un antigène où un fucose se lie au Gal β 1 comme Gal α 1- \rightarrow 3(Fuc α 1- \rightarrow 2)Gal β 1- \rightarrow 4GlcNac-R, un antigène de groupe B. Chez un même individu l'anti-Gal se doit de réagir de façon spécifique sans se lier avec des antigènes aussi abondants que ceux du système ABO. Le phénomène diffère chez des individus non porteurs de l'antigène B (groupe A et O)^{61, 62}. En effet, on doit 85% de l'activité anti-B du sérum de ces individus à un clone de l'anti-Gal appelé, anti-Gal B et, moins de 10% à des anticorps reconnaissant complètement l'antigène B⁶⁰.

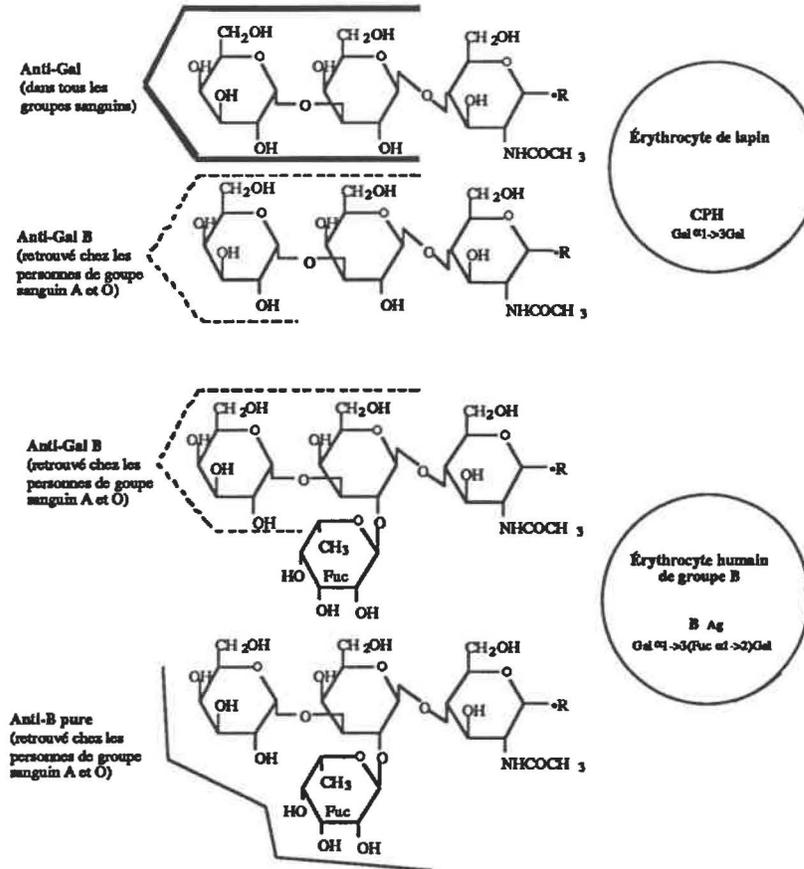


Figure 7: Schéma de l'interaction entre l'anti-Gal (ligne pleine foncée), l'anti-Gal B (ligne pointillée) et l'anti-B pure (ligne fine) avec la structure Gal $\alpha 1 \rightarrow 3$ Gal des GRs de lapin et avec la structure Gal $\alpha 1 \rightarrow 3$ (Fuc $\alpha 1 \rightarrow 2$)Gal sur des GRs humains de groupe B⁶⁰.

Dans la partie supérieure de la figure 7, des érythrocytes de lapin sont utilisés comme modèle car ils sont des porteurs naturels de la structure antigénique Gal $\alpha 1 \rightarrow 3$ Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc-R. Le schéma démontre bien la spécificité de l'anti-Gal et de l'anti-Gal B sur la structure antigénique Gal. Cette dernière est identique à celle

retrouvée à la surface des érythrocytes ayant terminé leur vie utile chez l'humain. De plus, la partie inférieure de la figure illustre la spécificité de l'anti-Gal B et de l'anticorps naturel anti-B sur l'antigène B du système ABO humain. L'anti-Gal isolé d'une personne de groupe B ou AB est incapable de réagir avec un antigène de groupe B; toutefois, un anticorps anti-Gal isolé à partir d'une personne de groupe A ou O posséderait cette propriété.

Comment l'anticorps anti-Gal apparaît-il dans la circulation chez l'humain? Les processus de production de l'anti-Gal chez l'Homme restent obscurs. Un mécanisme d'apparition fut proposé et impliquerait des bactéries du système gastrointestinal comme *E. coli* et *Klebsiella*. Ces dernières porteraient des épitopes Gal α 1-3Gal sur leurs liposaccharides et seraient responsables de l'immunisation continue à l'épitope¹⁶.

1.3.2 LE DAF ET LE CR₁

Certaines études démontrent que le nombre d'antigène CR₁ des GRs humains diminue avec l'âge cellulaire^{63,64}. L'antigène DAF subit lui aussi une diminution de 40 à 60% avec le vieillissement érythrocytaire normal⁶⁵. La diminution de la quantité d'antigènes CR₁ et d'antigènes DAF favorise l'opsonisation de la cellule par des

anticorps (anti-SCA ou autres) stimulant la déposition des fragments C3b de la voie alternative du complément. Les GRs sénescents se retrouvent donc moins protégés contre la déposition de fragments C3b du complément que les jeunes GRs. La diminution de l'expression des antigènes DAF et CR₁ n'entraîne pas automatiquement la formation de complexes d'attaques membranaires; la présence de récepteurs C8/9 érythrocytaires peut en ralentir la formation.

Les diminutions de 40 à 60% du nombre des antigènes CR₁ et des antigènes DAF lors du vieillissement demeurent inexplicées⁶⁵. L'antigène DAF pourrait être détaché de la membrane par l'action enzymatique des phospholipases; l'antigène CR₁ doit par contre se détacher différemment. Des mécanismes de protéolyse ou encore d'exocytose se produisant suite à la formation d'agrégats de CR₁ furent proposés afin d'expliquer la diminution d'antigènes CR₁⁶⁵.

1.4 OBJECTIFS INITIAUX ET LIMITES MÉTHODOLOGIQUES

Ce travail de maîtrise avait comme objectif l'élaboration d'une méthode de dépistage du dopage sanguin par cytométrie de flux en utilisant différents antigènes comme le SCA, le Gal, le DAF et le CR₁. Les différents antigènes ayant déjà été décrits, l'appareil et les stratégies utilisés seront maintenant expliqués. L'antigène Gal et

l'antigène SCA sont exprimés en quantités plus élevées sur les vieux érythrocytes. La détection d'un dopage sanguin se baserait donc sur la présence d'une population positive avec ces antigènes tel que mesurée par CMF chez un athlète ayant utilisé le dopage sanguin. Contrairement à l'antigène Gal et à l'antigène SCA, la quantité d'antigène DAF et d'antigène CR₁ diminue avec l'âge érythrocytaire. Le sang d'un athlète utilisant le dopage sanguin posséderait en plus d'une population normale, une population négative en fluorescence pour les antigènes DAF et CR₁. Des études d'immunofluorescences visant à démontrer ces populations furent entreprises au cytomètre de flux.

Le cytomètre de flux (voir schéma à la figure 8), un appareil ultrasophistiqué, analyse chaque cellule, une à une, afin d'évaluer leur intensité de fluorescence. Les cellules, marquées à l'aide d'un anticorps fluorescent, sont injectées dans l'appareil et acheminées devant un faisceau lumineux issu d'un laser.

La lumière émise par le laser excite les molécules fluorescentes qui émettent subséquentement de la lumière. Cette dernière passe par différents filtres optiques afin d'être acheminée, selon la couleur de la fluorescence, vers le photomultiplicateur approprié.

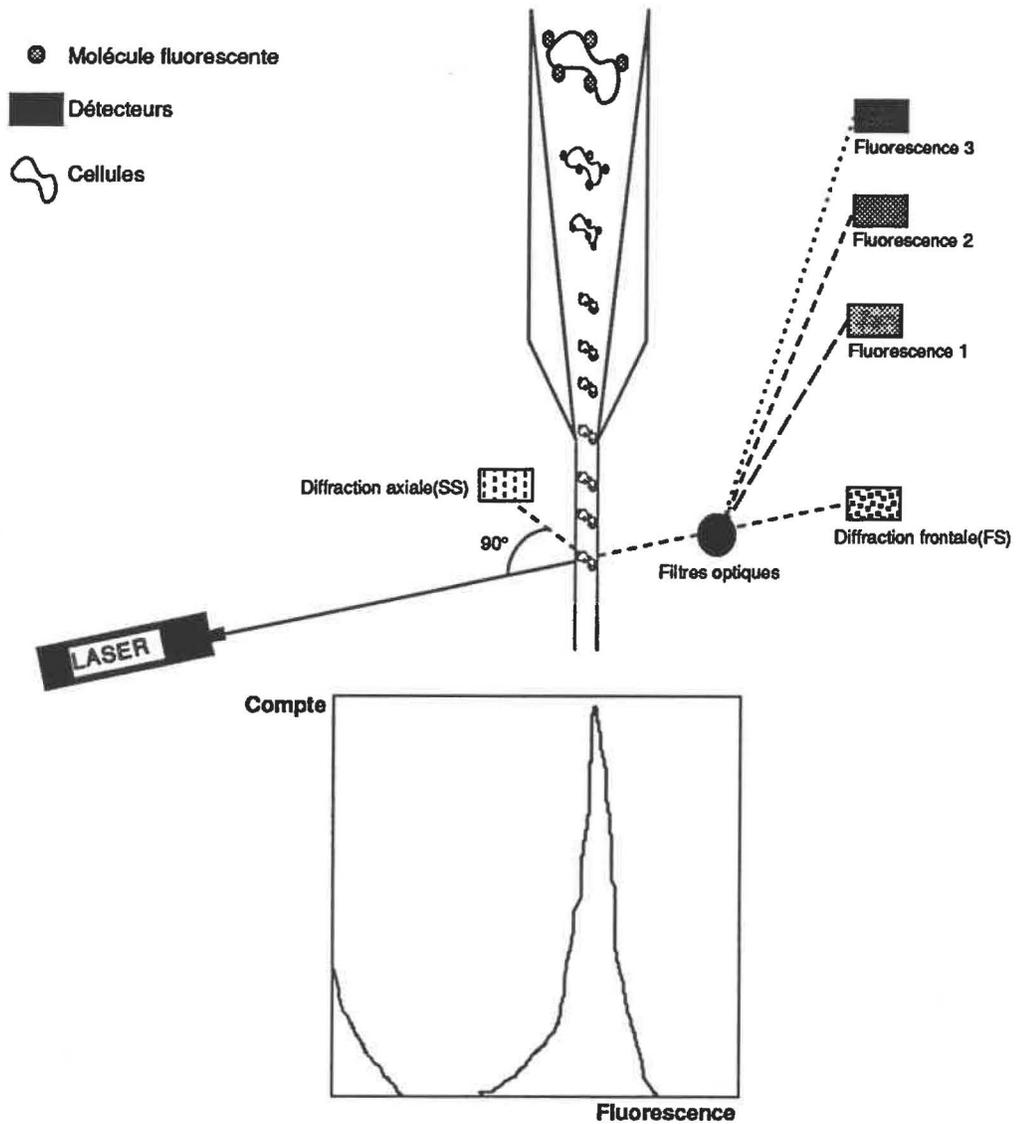


Figure 8: Schéma du cytomètre de flux.

C'est le photomultiplicateur de l'appareil qui mesure la quantité de lumière émise par les molécules fluorescentes des anticorps fixés à la surface de la cellule. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme du nombre de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence. Sur cet histogramme (figure 8) on remarque une population fluorescente et une population non-fluorescente provenant de l'analyse d'un même échantillon. La capacité de discrimination entre deux populations d'un même échantillon donne à la CMF un avantage énorme sur d'autres méthodes immunologiques (ELISA, RIA). Cette propriété est essentielle au dépistage du dopage sanguin chez l'athlète.

DEUXIÈME CHAPITRE
2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 MATÉRIEL

2.1.1 PRODUITS ET FOURNISSEURS

Tous les produits utilisés étaient de qualité analytique. Les anticorps anti-DAF (clone BRIC110) furent achetés chez Serotec Canada (Toronto, Ontario). Les anticorps anti-CR₁ (clones E11 et 44D) ont été achetés chez Serotec Canada (Toronto, Ontario) et chez Becton-Dickinson (Mountain View, California). Les anti-IgGs humains (lot 34932) et de souris (lot 081H4818) marqués au FITC furent achetés respectivement chez Organon Teknika, division Cappel Reasearch products (Durham, USA) et Sigma Immunochemicals (St-Louis, Missouri).

Les anticorps anti-IgGs humains marqués à la peroxydase et non-marqués, utilisés pour le transfert Western, furent achetés chez Organon Teknika, division Cappel Reasearch products (Durham, USA). Les marqueurs de poids moléculaire pour électrophorèse et les produits d'électrophorèse furent achetés chez BIO-RAD (Mississauga, Ontario). L'ABTS et le Percoll furent achetés chez Sigma Chemicals (St-Louis, Missouri). La colonne d'affinité anti-Gal fut obtenue de Chembiomed (Edmonton, Alberta) et celle de protéine G chez Canadian Bioclinical (Scarborough, Ontario). Et, finalement, les billes

fluorescentes de 1 μ m de diamètre furent achetées de Covaspheres-Duke Scientific (Palo Alto, California).

2.1.2 SOLUTIONS

2.1.2.1 PRÉPARATION DES ÉRYTHROCYTES

- PBS:

10mM phosphate de sodium, 155mM NaCl, pH 7.4.

- SOLUTION 10X:

0.666 ml triéthanolamine, 3.42g NaCl, 0.45g dextrose,

0.75g BSA dans 50 ml d'eau distillée.

2.1.2.2 PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES AUTOLOGUES

- SOLUTION DE LYSE:

10mM TRIS, 1mM EDTA, 1mM PMSF, pH 7.2.

- TAMPON GLYCINE:

0.1 M glycine tamponné à pH 2.3 avec HCl.

- SOLUTION DE NaOH:

1 M hydroxyde de sodium.

- SOLUTION DE SULFATE D'AMMONIUM:

sulfate d'ammonium dissout dans l'eau chaude jusqu'à sursaturation.

2.1.2.3 ELECTROPHORÈSE PAGE-SDS

-SOLUTIONS-MÈRES D'ÉLECTROPHORÈSE:

- 1.5 M TRIS ajusté à pH 8.8 avec du HCl.
- 30% p/v acrylamide, 0.8% p/v bis-acrylamide.
- 0.5M TRIS ajusté à pH 6.8 avec du HCl.
- 10% p/v persulfate d'ammonium.

- TAMPON D'ÉLECTROPHORÈSE:

0.025 M TRIS, 0.192 M glycine, 0.1%p/v SDS

- TAMPON D'ÉCHANTILLON:

2 M TRIS PH 6.8, 40% v/v glycérol, 40% p/v SDS, 20% β-mercaptoéthanol, 0.4% p/v bleu de bromophénol.

- SOLUTION DE COLORATION:

25% isopropanol, 10% acide acétique, 0.05% bleu de Coomassie.

- SOLUTION DE DÉCOLORATION:

25% isopropanol, 10% acide acétique.

2.1.2.4 TRANSFERT WESTERN

- TAMPON DE TRANSFERT:

25 mM TRIS, 192mM glycine, 20% v/v méthanol.

- SOLUTION DE PONCEAU S ROUGE:

7.5% acide trichloroacétique, 0.5% ponceau S, dans H₂O

- SOLUTION DE SUBSTRAT:

À 10 ml de tampon citrate-phosphate 0.1 M pH 4.0, ajouter 4 mg d'ABTS et 50 µl de peroxyde d'hydrogène 30%.

2.2 MÉTHODE

2.2.1 PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉRYTHROCYTES

Les prélèvements sanguins furent effectués chez des sujets sains et consentants. Généralement, environ 7 ml de sang était prélevé sur EDTA puis lavé 3 fois avec 10 volumes de PBS. Les cellules, vieilles en banque de sang (CPDA-1), furent obtenues des hôpitaux locaux. Le sang fut prélevé stérilement à partir des sacs de PVC conservés à 4°C et fut traité de façon identique aux prélèvements précédents. Les cellules du culot de la dernière centrifugation furent resuspendues dans un volume équivalent de PBS (hématocrite d'environ 45%) et ensuite séparées selon leur densité par gradient de Percoll.

Le gradient de Percoll fut préparé en mélangeant 36 ml de Percoll, 5 ml de solution 10X, et complété à 50 ml avec de l'eau distillée. Dans des tubes à centrifuger de 50 ml, 25 ml de la solution de Percoll et 7 ml de la suspension de sang lavé furent déposés. Les tubes furent centrifugés à une vitesse de 13 000g pendant 30 minutes à 4°C.

Les jeunes GRs, moins denses, se retrouvent alors dans la partie supérieure du gradient et les vieux GRs, plus denses, se retrouvent dans la partie inférieure. Les cellules des couches supérieures et inférieures sont récupérées puis lavées séparément en ajoutant 20 volumes de PBS.

2.2.2 PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES AUTOLOGUES

2.2.2.1 PURIFICATION DE L'ANTI-SCA

La purification des IgGs anti-SCA fut effectuée selon la méthode de Kay⁶⁶. Les culots globulaires sont déposés dans des bouteilles à centrifuger et lavés trois fois avec du PBS en prenant soin de ne pas mélanger les culots de groupe sanguins différents. Le surnageant est retiré par aspiration. Le culot est resuspendu dans 1 litre de solution de lyse et centrifugé à 5000 rpm pendant 30 minutes, l'opération est répétée 1 fois. Le stroma est conservé et lavé avec du PBS jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair.

L'anticorps est élué du stroma cellulaire avec un volume de tampon glycine. Les stromas sont recentrifugés à 15000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant est conservé et son pH ajusté

immédiatement à 7.4 avec du NaOH 1M. Le surnageant, riche en anticorps, est concentré sur un filtre Amicon (PM 50 000). La précipitation des IgGs s'effectue en ajoutant une solution de sulfate d'ammonium à concentration finale de 50% suivi d'une incubation d'une nuit à 4°C. La solution contenant le précipité est ensuite centrifugée, le culot est redissous dans un volume minimal de PBS et dialysé dans 4 litres de PBS pH=7.4 pendant une nuit.

La colonne de protéine G est préparée par le passage de 5-10 volumes de colonne de PBS dégazé; pendant ce temps l'échantillon est filtré sur un filtre de 0.45µm. L'échantillon fut déposé sur la colonne qui était reliée à un spectrophotomètre à flux continu émettant de la lumière à 280 nm.

Une fois l'échantillon déposé sur la colonne, on ajoute environ 5 volumes de PBS, jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0. Les IgGs sont élués avec une solution-tampon glycine 0.1 M: on ajoute ce tampon jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0. La colonne fut rééquilibrée en ajoutant 2 à 3 volumes de PBS et fut conservé à 4°C en ajoutant 1 volume de PBS 0.02% d'azide de sodium. Les tubes contenant l'anticorps purifié sont neutralisés à pH 7 avec du Tris 1M et dialysés pendant une nuit dans 4 litres de PBS à 4°C.

Comme l'anti-SCA est purifié à partir d'un éluat provenant de cellules conservées à 4°C, la solution contient aussi de l'anti-Gal. L'anti-Gal est retiré de la solution par passage sur la colonne d'affinité utilisée pour purifier le Gal (voir la section 2.2.2.2: remplacer le sérum par la solution d'anti-SCA). La pureté de l'anticorps est vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE tandis que sa spécificité est vérifiée par transfert Western sur des protéines membranaires.

2.2.2.2 PURIFICATION DE L'ANTI GAL

L'anticorps autologue anti-Gal fut purifié à l'aide d'une colonne d'affinité sur laquelle est lié l'antigène Gal ($\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$). Le sérum provenant d'une phlébotomie fut inactivé à 56°C pendant 30 à 60 minutes. Suivant cette incubation, le sérum fut centrifugé à 13000 g pendant 30 minutes et le culot fut séparé du surnageant. Le surnageant fut par la suite filtré avant d'être déposé sur la colonne d'affinité préalablement préparée.

La colonne d'affinité est préparée en rincant avec 5-10 volumes de colonne de PBS dégazé; pendant ce temps, l'échantillon est filtré sur un filtre de 0.45 μm . L'échantillon est déposé sur la colonne reliée à un spectrophotomètre à flux continu émettant de la lumière à 280 nm.

Une fois l'échantillon déposé sur la colonne, environ 5 volumes de PBS sont ajoutés, jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0. Les IgGs sont élués avec une solution-tampon glycine 0.1 M: on ajoute ce tampon jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0. La colonne fut rééquilibrée en ajoutant 2 à 3 volumes de PBS et fut conservé à 4°C en ajoutant 1 volume de PBS 0.02% d'azide de sodium. Les tubes contenant l'anticorps purifié sont neutralisés à pH 7 avec du Tris 1M et dialysés pendant une nuit dans 4 litres de PBS à 4°C.

La pureté de l'anticorps est vérifiée par électrophorèse PAGE-SDS. Lorsque l'électrophorèse démontre la présence d'anticorps de type IgM, une deuxième purification sur colonne de protéine G est nécessaire. On procède alors comme décrit en 2.2.2.1.

2.2.3 ÉLECTROPHORÈSE PAGE-SDS

Le gel d'électrophorèse est préparé en mélangeant différentes solutions dans l'ordre énuméré au tableau 1 et selon la concentration désirée. Les deux derniers réactifs servent de catalyseur; ils font polymériser le gel rapidement et sont ajoutés au dernier moment précédant le moulage du gel.

La concentration utilisée pour l'analyse des IgGs (gel de 12%) permettait une meilleure séparation des chaînes lourdes et légères sur les mini-gels. Après la polymérisation, le mini-appareil est déposé dans la cuve contenant le tampon d'électrophorèse. Une fois le peigne retiré, 30 µl de la solution anticorps-tampon d'échantillon (mélangée dans un rapport de 4:1) sont déposés dans les puits pour la migration. La migration dans le gel de compression s'effectue à 100 volts et à 200 volts dans le gel de séparation. L'électrophorèse se termine lorsque le front de migration est presque sorti du gel. Le gel est retiré de l'appareil et coloré avec la solution de coloration puis décoloré dans la solution de décoloration.

Tableau 1: Volumes des réactifs d'électrophorèse.

Réactifs:	Gel de séparation			Gel de compression
	7.5% (40-250kD)	10%	12% (10-100kD)	4%
eau distillée	4.85 ml	4.05 ml	3.35 ml	6.1 ml
Tris-HCl 1.5M, pH=8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	0 ml
Tris-HCl 0.5M, pH=6.8	0	0	0	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Acrylamide-Bis 30%p/v	2.5 ml	3.3 ml	4.0 ml	1.3 ml
persulfate d'ammonium 10%	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
TEMED	0.005 ml	0.005 ml	0.005 ml	0.010 ml

2.2.4 TRANSFERT WESTERN

Le Transfert est effectué sur un mini-gel d'électrophorèse à 12% de concentration (selon la technique décrite en 2.2.3) sur lequel avaient migré des membranes de GRs. Le gel est retiré de l'appareil d'électrophorèse et déposé dans une petite quantité de tampon de transfert pendant 30 minutes. Le tampon de transfert est versé dans l'appareil de transfert. Le transfert (durant 3h) sur un papier de nitrocellulose s'effectue à un courant constant de 0.3 A. Une fois le transfert terminé, le papier est retiré et coloré avec une solution de Ponceau S Rouge. Chaque bande est ensuite découpée et rincée à l'eau pour enlever le colorant.

La nitrocellulose est stabilisée avec du PBS/0.5%BSA pendant une nuit à 4°C et lavée trois fois avec du PBS-Tween. Le premier anticorps (anti-SCA) dilué de moitié dans du PBS/0.5%BSA et 1ml de cette solution d'anticorps est ajouté à chaque puit contenant un papier de nitrocellulose. Tous les puits furent incubés 1 heure à 37°C avec agitation. Une fois l'incubation terminée les puits sont vidés et lavés trois fois (10-20 minutes entre chaque lavage) avec du PBS-Tween sous agitation.

Le deuxième anticorps (anti-IgG humain marqué à la peroxydase) est dilué 1/500 dans du PBS/3% BSA et 1 ml est ajouté à chaque puit pour ensuite être incubé à 37°C avec agitation pendant 1 heure. Cette deuxième incubation est suivie de trois lavages de 10-20 minutes dans du PBS-Tween. Finalement, la solution de substrat (ABTS) est ajoutée et la lecture de l'absorbance est effectuée après 30 minutes.

2.2.5. CYTOMÉTRIE DE FLUX: ÉTUDES D'EXPRESSION DES ANTIGÈNES GAL, SCA, CR₁ ET DAF.

2.2.5.1 AVEC DES BILLES FLUORESCENTES

La technique de couplage de billes fluorescentes avec des anticorps (selon le protocole Duke Scientific-Covaspheres, fournisseur des billes) fut utilisée pour amplifier le signal fluorescent. Cette technique fut utilisée pour l'étude des antigènes Gal et des antigènes SCA à faible expression. En effet, ces antigènes ne pouvaient pas être mesuré par CMF avec la technique décrite en 2.2.5.2. Les billes furent soniquées pour une période minimale de 1 minute afin de bien séparer toute les sphères fluorescentes. Les billes et la biotine furent ensuite mélangées dans un rapport de 150µl de sphères pour 0.3 mg

de biotine (0.3mg dans 0.75ml de DMF à 25% avec de l'eau) avec 0.75ml de PBS. Le mélange fut alors incubé pendant 1h à 23°C.

Les billes sont centrifugées à 10000g et à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est jeté. Les sphères, resuspendues dans 1 ml de PBS/1% BSA, sont soniquées pour un minimum de 1 minute et centrifugées dans les mêmes conditions. Le surnageant est jeté. Le culot, resuspendues dans 1 ml de PBS, est soniqué pour un minimum de 1 minute. Le lavage au PBS est répété une dernière fois et les billes lavées sont conservées à 4°C dans un contenant les protégeant de la lumière. Le culot est subséquentement incubé (5×10^7 billes/ml) dans 1 ml de solution de streptavidine à 5µg/ml (dilué dans du PBS), et ce, pendant 2h à 23°C avec agitation. Les lavages au PBS sont répétés trois fois.

La liaison des billes fluorescentes à l'antigène Gal ou à l'antigène SCA s'amorce par la préparation d'une suspension cellulaire de GRs à 1×10^8 cellules/ml. 500 µl de la suspension cellulaire à 1×10^8 est incubé avec 4 µg d'IgGs anti-SCA (ou anti-Gal) à 37°C pendant 1 heure. Suite à cette incubation, les cellules sont lavées et centrifugées trois fois avec 5 volumes de PBS. Après la dernière centrifugation les cellules sont resuspendues dans le volume initial (500 µl).

On incube ensuite les cellules avec 0.25 ml d'anti-IgGs humains biotinylés, dilués 1/1000, pendant 1h à 37°C. Pendant ce temps, les billes sont lavées et centrifugées trois fois avec du PBS comme mentionné ci-haut. Approximativement 5×10^6 cellules (100 μ l) et 1×10^8 billes fluorescentes biotinylées (10 μ l) sont mélangées. Le mélange est complété à 0.3 ml avec du PBS à 1% de sérum normal humain. On centrifuge le mélange à 250g, à 4°C pendant 10 minutes et on incube pendant 30 minutes à 4°C. Le CMF est ajusté de façon à discriminer les billes fluorescentes non-liées.

2.2.5.2 AVEC DES ANTICORPS FLUORESCENTS

Les cellules furent prélevées, lavées et utilisées intactes ou séparées sur gradient de Percoll tel que décrit en 2.2.1. On dépose ensuite 2.5×10^6 cellules dans chacun des tubes où l'on ajoute différents volumes d'anticorps. Selon de l'anticorps utilisé, (anti-SCA, anti-Gal, anti-DAF, anti-CR₁), la quantité d'anticorps ajoutée varie et correspond respectivement à 100 μ l (~10 μ g), 150 μ l (~10 μ g), 50 μ l et 10 μ l. Le mélange est finalement complété à 200 μ l avec du PBS/3% BSA et incubé à 37°C pendant 1 heure.

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec 10 volumes de PBS et réincubées à 37°C pendant 1 heure avec un anticorps approprié

marqué au FITC, soit 1ml d'un anti-IgGs humain dilué 1/1000 dans du PBS/3% BSA pour l'anti-Gal et l'anti-SCA ou 25 μ l d'un anti-IgGs de souris dilué 1/160 dans du PBS/3% BSA pour l'anti-DAF et l'anti-CR₁. Après l'incubation, les cellules sont relavées trois fois et passées au cytomètre de flux. Chaque tube de cellules est accompagné d'un témoin négatif ayant subi le même traitement que les autres tubes mais sans contenir le premier anticorps.

TROISIÈME CHAPITRE
RÉSULTATS

3.1 ÉTUDE DE LA FIXATION D'IMMUNOGLOBULINES AUTOLOGUES

Le chapitre qui s'amorce présente les résultats des différentes expériences visant à développer une méthode de dépistage du dopage sanguin. Comme ces méthodes reposent sur la présence (pour le SCA et Gal ou l'absence pour le DAF et CR₁) d'antigènes à la surface de vieux érythrocytes, presque tous les résultats obtenus tentent de quantifier ces présences ou absences d'antigènes par cytométrie de flux.

L'expression de l'antigène Gal et de l'antigène SCA à la surface des érythrocytes augmente avec l'âge. Puisqu'aucun anticorps commercial dirigé contre l'un ou l'autre de ces antigènes n'est disponible, la première étape de l'expérimentation consistait à purifier les immunoglobulines autologues dirigées contre ces antigènes.

3.1.1 PURIFICATION DE L'ANTICORPS ANTI-SCA

La méthode de Kay modifiée fut utilisée pour la purification de l'anti-SCA (section 2.2.2.1). Lors de la chromatographie d'affinité, l'éluat provenant de la surface des GRs fut déposé sur une colonne de

protéine G; un tampon glycine 0.1 M pH 2.3 fut par la suite ajouté pour éluer les IgGs de la colonne. Cette solution fut repurifiée sur la colonne d'affinité pour le Gal afin de retirer l'anti-Gal présent de façon normale dans l'éluat. Les profils d'élution respectifs sont illustrés à la figure 9.

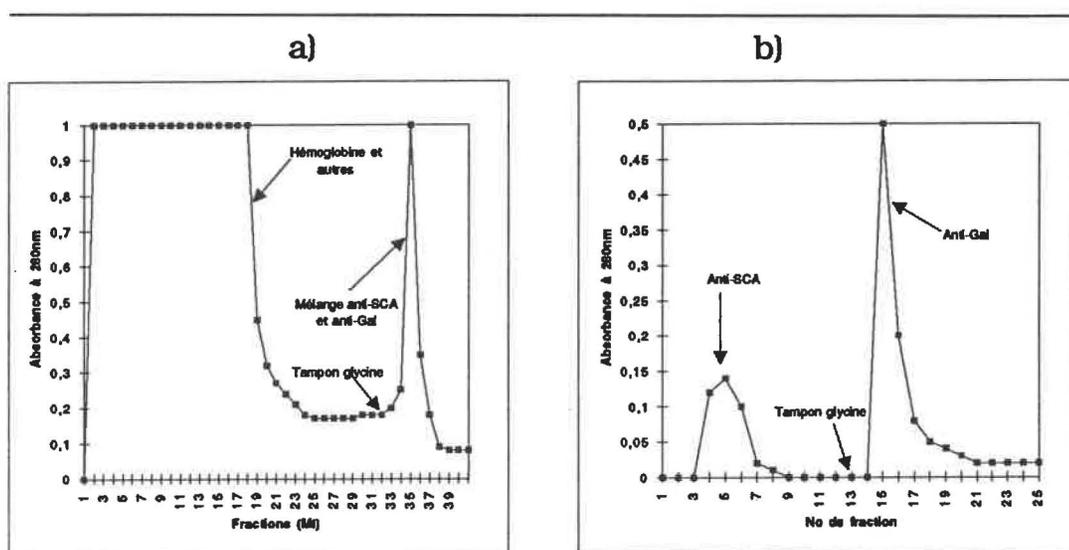


Figure 9: Profils d'élution de l'anti-SCA sur colonne de protéine G (a) et colonne d'affinité pour le Gal (b).

La figure 10 illustre un schéma de l'électrophorèse de la solution d'anticorps purifiés. L'électrophorèse révèle relativement bien les chaînes lourdes (PM~50 kDa) et légères (PM~25 kDa) caractérisant les immunoglobulines de type G. Environ 20 ml de solution d'anticorps purifiés furent obtenus. La concentration de cette solution fut dosée par technique ELISA à 0.0912 mg d'IgG/ml.

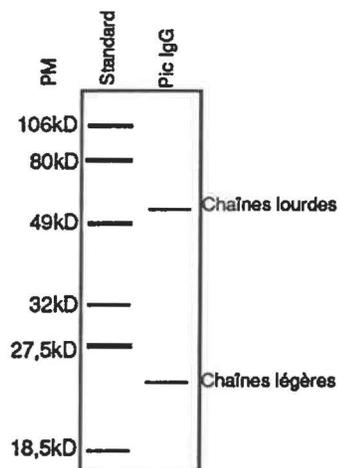


Figure 10: Schéma de l'électrophorèse SDS-PAGE de l'anti-SCA purifié par la méthode de Kay modifiée.

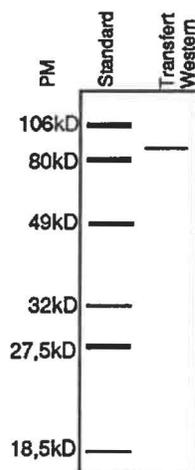


Figure 11: Schéma du transfert Western effectué sur des membranes érythrocytaires démontrant la spécificité de l'anti-SCA pour la bande 3.

La spécificité de l'anticorps purifié fut vérifiée par transfert Western (2.2.4). La figure 11 montre le résultat de cette expérience. L'anticorps purifié reconnaît une protéine d'environ 95kDa correspondant au poids moléculaire de la bande 3. Le transfert Western confirme donc la spécificité anti-bande 3 de l'anticorps purifié.

3.1.2 PURIFICATION DE L'ANTI-GAL

L'anti-Gal fut purifié par chromatographie d'affinité comme décrit à la section 2.2.2.2. Lors de la chromatographie d'affinité, le sérum fut déposé sur une colonne d'affinité Gal; un tampon glycine 0.1 M pH 2.3 fut par la suite ajouté pour éluer les IgGs de la colonne. Cette solution fut repurifiée sur la colonne de protéine G afin de retirer les contaminants retrouvés dans la solution. Les profils d'élution respectifs obtenus lors de ces expériences sont illustrés à la figure 12.

La figure 13 illustre l'électrophorèse obtenue avec la solution d'anticorps anti-Gal purifiée, le mélange anti-Gal et d'IgM et, enfin, le pic d'IgM et de contaminants. L'électrophorèse après passage sur la colonne d'affinité Gal démontre la présence d'immunoglobulines de

type G et M en plus de la présence d'albumine et d'autres protéines sériques.

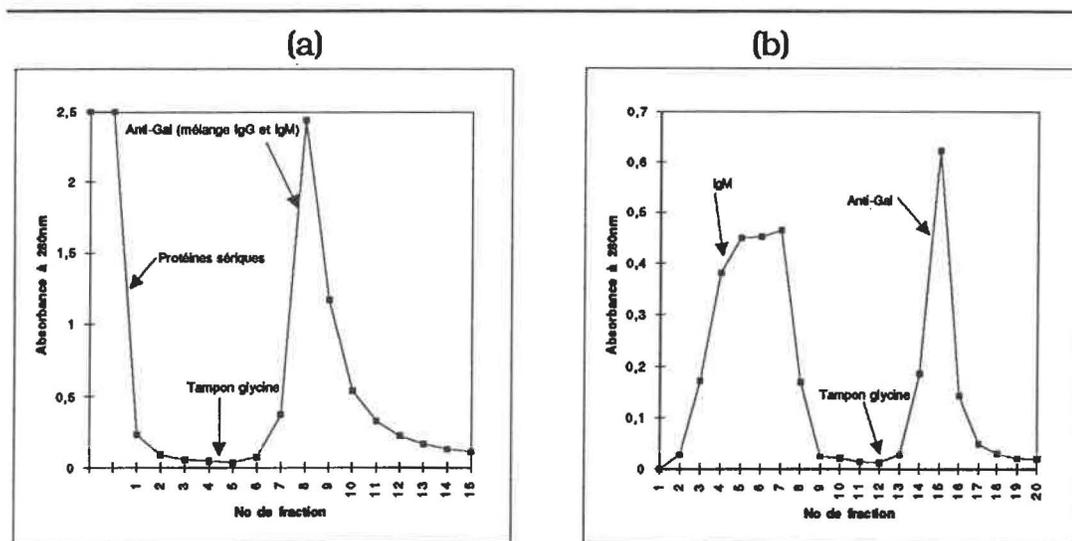


Figure 12: Profils d'élution de l'anti-Gal sur colonne d'affinité Gal (a) et colonne de protéine G (b).

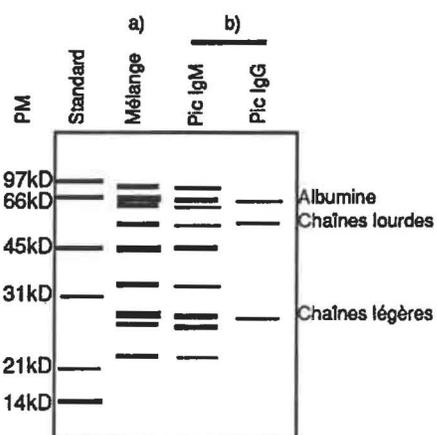


Figure 13: Schéma de l'électrophorèse SDS-PAGE de l'anti-Gal purifié par chromatographie d'affinité Gal (a) et protéine G (b).

L'électrophorèse après protéine G révèle relativement bien les chaînes lourdes (PM~50 kDa) et légères (PM~25 kDa) caractérisant les immunoglobulines de type G. Environ 14 ml de solution d'anticorps purifiée furent obtenus. La concentration de cette solution fut dosée par technique ELISA à 0.0633 mg d'IgG/ml.

3.1.3 VÉRIFICATION DE LA SPÉCIFICITÉ DES IgG S AUTOLOGUES PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX: ÉTUDES DE L'EXPRESSION DES ANTIGÈNES GAL ET SCA.

La spécificité d'un mélange d'anticorps anti-SCA et anti-Gal par ELISA et CMF fut étudiée antérieurement dans notre laboratoire⁶⁹. Les résultats de ces travaux démontrèrent que la CMF n'était pas une technique suffisamment sensible pour détecter les différences antigéniques entre jeunes et vieux GRs en utilisant un deuxième anticorps fluorescent. La difficulté se retrouvait dans l'amplification du signal de fluorescence. La non-disponibilité sur le marché de fluorochromes plus fluorescents et excitables avec le type de laser du CMF limitait les avenues de recherche. Il fallait donc utiliser les mêmes fluorochromes mais en quantités plus élevées. Ainsi des billes fluorescentes, renfermant plusieurs molécules de FITC, furent choisies comme méthode d'amplification. Ces billes pouvaient être couplées à des anticorps de spécificité déterminée (ici l'anti-Gal et

l'anti-SCA) pour ensuite réagir avec les antigènes de jeunes et de vieux érythrocytes.

Les résultats obtenus avec les techniques d'amplification, autant pour l'étude de l'antigène Gal que pour celle de l'antigène SCA, se sont avérés incohérents. Les valeurs de fluorescence obtenues pour les témoins négatifs étaient occasionnellement plus fluorescentes que celles d'échantillons positifs. La spécificité des billes pour les différents antigènes devait être remise en question. Diverses expériences entreprises afin de vérifier si les billes adhéraient aux cellules de façon non-spécifique démontrèrent précisément qu'elles se fixaient non-spécifiquement aux cellules. À titre d'exemple, le tableau 2 montre les résultats obtenus lorsque des érythrocytes furent mélangés à différents types de billes ne portant pas d'anticorps spécifiques aux antigènes Gal et SCA.

Les résultats du tableau 2 montre l'intensité et la variabilité des liaisons non-spécifiques entre les différentes billes stabilisées au BSA et les GRs. Ces liaisons non-spécifiques rendaient l'étude des antigènes Gal et SCA impossible. D'autres antigènes dont l'expression varierait avec l'âge érythrocytaire furent alors recherchés. Les antigènes DAF et CR₁ furent choisis à cet effet.

Tableau 2: Résultats obtenus pour la liaison non-spécifique des billes aux GRs (sans anticorps spécifiques).

Streptavidine liée à la bille par la biotine		Streptavidine liée directement à la bille		Biotine liée directement à la bille	
% de cellules fluorescentes	canal moyen de fluorescence	% de cellules fluorescentes	canal moyen de fluorescence	% de cellules fluorescentes	canal moyen de fluorescence
15,2	8,57	30,3	11,45	15,3	8,29
18,9	15,45	24,8	15,61	22,3	14,40
36,3	15,24	39,2	15,22	33,5	15,45
39,5	13,62	27,4	14,45	30,9	14,83
37,0	10,73	49,6	11,63	36,7	11,76
32,4	11,97	36,2	12,17	35,7	11,76
30,3	12,52	34,2	12,70	31,9	12,83
24,3	11,92	27,6	12,42	24,7	12,52
36,6	15,79	27,4	16,36	37,5	15,63

3.2 ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES ANTIGÈNES DAF ET CR₁

Les antigènes DAF et les antigènes CR₁ possèdent un avantage pour l'étude en CMF: leur expression est plus élevée que celle de l'antigène Gal et de l'antigène SCA. Toutefois, contrairement à ces derniers, leur expression diminue avec l'âge des GRs⁶⁵. En effet, l'expression des antigènes DAF et CR₁ diminuerait d'environ 40 à 60% lors du vieillissement érythrocytaire normal⁶⁵. Des études de l'antigène CR₁ démontrèrent que cette molécule était exprimée trop faiblement pour être détectée par CMF. Le tableau 3 démontre les faibles pourcentages de fluorescence associée à l'expression minimale de l'antigène CR₁.

Tableau 3: Résultats des études d'expression de l'antigène érythrocytaire CR₁ avec un anticorps marqué au FITC

% de cellules fluorescentes	Canal moyen de fluorescence
0.2	2.223
0.1	3.715
0.1	2.901

Tableau 4: Résultats des études d'expression d'antigènes érythrocytaires DAF par CMF.

Pourcentage de cellules fluorescentes			Canal moyen de fluorescence		
Jeunes	Vieux	Différence	Jeunes	Vieux	Différence
14.9	0.7	14.2	0.745	0.667	0.078
8.1	1.1	7.0	0.737	0.704	0.033
9.1	7.7	1.4	0.502	0.515	-0.013
10.5	4.8	5.7	0.712	0.683	0.029
17.5	11.6	5.9	0.783	0.723	0.060
8.7	2.8	5.9	0.705	0.630	0.075
15.5	9.8	5.7	0.788	0.698	0.090
12.8	7.7	5.1	0.723	0.675	0.048
6.6	1.0	5.6	0.305	0.446	-0.141
5.9	1.6	4.3	0.462	0.465	-0.003
14.4	4.6	9.8	0.564	0.452	0.112
8.3	2.3	6.0	0.476	0.450	0.026
14.2	4.3	9.9	0.490	0.454	0.036
19.9	9.0	10.9	0.544	0.500	0.044
9.4	4.4	5.0	0.489	0.476	0.013
16.0	6.3	9.7	0.523	0.481	0.042
11.0	4.6	6.4	0.540	0.467	0.073
5.0	0.9	4.1	0.458	0.507	-0.049
7.7	4.3	3.4	0.501	0.494	0.007
	moyenne*	6.63±3.03		moyenne*	0.03±0.06

* Moyenne ± écart-type

L'antigène DAF, plus abondant que l'antigène CR₁ (3 à 4 fois), fut décelable par CMF. Le tableau 4 montre les résultats de ces études. Les moyennes des différences de pourcentages de

fluorescence et des différences de canal moyen de fluorescence retrouvées dans ce tableau sont significatives ($p < 0.05$).

QUATRIÈME CHAPITRE
CONCLUSION ET DISCUSSION

4.1 DISCUSSION

Ce chapitre présente une discussion de l'ensemble des résultats figurants au chapitre précédent, de l'expérimentation et des perspectives d'avenir de cette recherche.

Les études d'antigènes SCA entreprises dans notre laboratoire⁶⁹ démontrèrent que la CMF ne possédait pas la sensibilité nécessaire pour détecter, avec l'utilisation d'un anticorps fluorescent, les différences d'expression antigénique entre jeunes et vieux érythrocytes. En effet, le faible nombre d'antigène de sénescence (jusqu'à 1000 sur des GRs conservés) correspond sensiblement à la limite de détection de l'appareil (~650 molécules de FITC). Dans ces études, il fut suggéré d'utiliser des techniques d'amplification du signal de fluorescence pour l'étude des antigènes SCA et Gal. Un travail ayant paru plus tôt en 1991 démontra que la solution d'anticorps utilisée antérieurement dans notre laboratoire⁶⁹ était constituée d'un mélange d'anti-Gal et d'anti-SCA⁶⁷. Le but premier du projet fut de mettre au point une méthode de séparation des anticorps Gal et SCA ainsi que les procédés d'amplification de fluorescence. La séparation des anticorps autologues Gal et SCA fut rendue possible par l'obtention d'une colonne d'affinité Gal.

Le couplage de billes fluorescentes aux anticorps anti-Gal et anti-SCA fut le procédé d'amplification de fluorescence choisi pour l'étude des antigènes Gal et des antigènes SCA. Ce procédé se montra rapidement inutilisable dû à la fixation non-spécifique des billes fluorescentes aux cellules (voir tableau 2). Malgré l'utilisation de différentes techniques de blocage des billes, il restait impossible de diminuer la non-spécificité. De plus, des études ultérieures confirmèrent que la fixation des billes ne s'effectue pas de façon stoïchiométrique avec l'antigène mais bien en proportion avec la quantité d'antigènes⁶⁸. Ces études utilisaient des billes fluorescentes pour détecter des antigènes plus abondants que l'antigène Gal et l'antigène SCA sur les cellules. La fixation stoïchiométrique des billes aux cellules est essentielle à l'étude des antigènes Gal et SCA dans un contexte de dopage sanguin. La non-disponibilité de moyens d'amplification de la fluorescence différents de celui utilisé limita l'étude des antigènes Gal et SCA.

Les antigènes DAF et CR₁ sont d'autres antigènes susceptibles d'être utilisés dans le dépistage du dopage sanguin. Ces antigènes sont plus abondants que l'antigène Gal et l'antigène SCA mais, contrairement à ces derniers, leur expression diminue avec l'âge des GRs. En effet, l'expression de ces antigènes diminuerait d'environ 40 à 60% lors du vieillissement érythrocytaire normal⁶⁵.

Les études de l'antigène CR₁ s'avèrent négatives en raison de la faible densité moléculaire de cet antigène à la surface des GRs (voir tableau 3). L'abondance plus élevée de l'antigène DAF permet l'étude de cet antigène par cytométrie de flux (voir tableau 4). Les moyennes des différences jeunes-vieux furent calculées à 6.63 ± 3.03 (md±Sd) pour le pourcentage de cellules fluorescentes et à 0.03 ± 0.06 (md±Sd) pour le canal moyen de fluorescence. Ces différences jeunes-vieux sont statistiquement significative à $p < 0.05$ par mesure appariée.

Une analyse plus poussée des résultats du pourcentage de cellules fluorescentes démontre qu'une quantité plus élevée de jeunes GRs portent l'antigène DAF. L'analyse des résultats du canal moyen de fluorescence donne plutôt un indice du nombre de sites antigéniques. Ces résultats démontrent une plus grande abondance d'antigènes DAF à la surface de jeunes GRs, ce qui concorderait avec les données de la littérature^{43,65}. Dans un contexte de dopage sanguin, l'antigène DAF s'avère inutilisable car les différences observées entre les jeunes et les vieux érythrocytes sont négligeables. De plus, en présence d'une variabilité élevée des niveaux d'antigènes DAF chez différents individus, toute méthode de dépistage développée dans ce contexte nécessiterait l'obtention de valeurs normales de DAF chez chacun des athlètes à dépister.

Le manque de sensibilité de la CMF rend l'élaboration d'une méthode de dépistage du dopage sanguin discutable avec ce type d'appareil. En effet, la CMF possède un degré élevé de précision pour l'analyse d'antigènes exprimés abondamment à la surface cellulaire. Lors de telles études, les quelques 650 sites, représentant le seuil de sensibilité de l'appareil, passent inaperçus. Ces 650 sites deviennent importants pour la détection d'antigènes exprimés en nombre plus restreint (de 1000 à 5000). Plusieurs cellules exprimant l'antigène à la limite de détection de l'appareil s'avèrent négatives en fluorescence sur le CMF. La sensibilité de l'appareil explique souvent l'échec des recherches effectuées dans notre laboratoire pour développer une méthode de dépistage du dopage sanguin. Il est important de comprendre que le dépistage du dopage sanguin repose sur des mécanismes naturels d'élimination des vieux érythrocytes de la circulation. Les mécanismes naturels d'élimination d'érythrocytes sénescents de la circulation sont très efficaces au niveau biologique car l'organisme peut déceler d'infimes quantités de molécules apparaissant à la surface des cellules. Le CMF ne possède pas une telle sensibilité. Ce manque de sensibilité rends l'utilisation des mécanismes naturels d'élimination inefficace pour le dépistage du dopage sanguin.

Les modèles théoriques pourraient être également responsables des difficultés rencontrés dans la mise au point d'une méthode de

dépistage du dopage sanguin. Certains modèles d'élimination naturelle des érythrocytes, présentés dans ce travail de recherche, sont remis en question dans le monde scientifique⁶⁵. En effet, l'anticorps purifié par Galili jouerait un rôle dans la phagocytose mais ne reconnaîtrait pas spécifiquement les vieux érythrocytes. De plus, la spécificité de l'anticorps proposée dans le modèle de Low serait imprécise. Les expériences de Low auraient démontré selon Lutz⁶⁵ une liaison de complexes immuns solubles aux antigènes CR₁. La présence d'antigènes CR₁ à l'intérieur d'agrégats de bandes 3 s'expliquerait par l'abondance de ces dernières dans la membrane. Dans la revue de littérature effectuée, aucune étude, à l'exclusion de celle invoquée dans les lignes précédentes, met en doute ces modèles théoriques.

Les trois modèles, présentés dans ce mémoire, suggèrent trois mécanismes différents d'élimination des érythrocytes de la circulation sanguine. Kay et Low^{14,15} rendent la bande 3 responsable de la formation d'antigènes de sénescence mais suggèrent différents mécanismes de formation de cet antigène: Kay¹⁴ propose une protéolyse médiée par l'oxydation tandis que Low¹⁵ suggère une agrégation de la bande 3 due à la fixation d'hémichromes. Galili¹⁶, pour sa part, propose l'exposition d'un antigène cryptique suite à l'action d'enzymes protéolytiques des macrophages.

Tous ces modèles impliquent un anticorps spécifique réagissant avec un antigène formé par le vieillissement érythrocytaire. Même si les modèles diffèrent dans la façon de transmettre le signal de sénescence à travers la membrane, tous demeurent plausibles. De ces modèles, celui de Kay¹⁴ a fait l'objet d'un nombre plus élevé de recherche. En effet, Kay effectue des recherches sur l'antigène de sénescence depuis les années 1970 alors que les modèles des autres auteurs sont plus récents.

Éventuellement, la découverte de nouveaux fluorochromes et la mise au point d'appareils d'analyses plus sensibles, pourront permettre le développement d'une méthode de dépistage du dopage sanguin.

4.2 CONCLUSION

Avec les techniques expérimentales disponibles présentement et en utilisant les antigènes décrits dans ce document, il est impossible de mettre au point une méthode de dépistage du dopage sanguin par cytométrie de flux. Cette impossibilité s'explique par la faible densité des antigènes en cause, le manque de techniques d'amplification de la fluorescence et par la faible sensibilité des appareils actuels. Lorsque la sensibilité de ce type d'appareil approchera celle du corps humain, il sera alors possible d'utiliser ces mécanismes naturels pour permettre le dépistage du dopage sanguin, sans amplification de la fluorescence.

CINQUIÈME CHAPITRE
BIBLIOGRAPHIE

- 1- JACQUILLOT, C., WEIL, M., AUCLERC G., PROFIZI, N., KHAYAT D., Le sang, 1^{ère} édition, Presses universitaires de France, 1989.
- 2- PERRONE, J., Blood: The stream of life, The magazine of Rush- Presbyterian-St. Lukes medical center, 1987;9(1): 3-15.
- 3- BRIEN, A.J., SIMON, T.L., The effect of red blood cell infusion on 10-km race time, JAMA, 1987;257(20): 2761-2765.
- 4-AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDECINE, Position stand on blood doping as an ergogenic aid, Medicine, Science, Sports and Exercise., 1987; 19: 540-543.
- 5- WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., LITCHMAN, M.A., ERSLEV, A.J., Hematology, 4th Edition, McGraw-Hill, 1990, pp. 712.
- 6- CROMER, R.B., Olympic cheating. The inside story of illicit doping and the U.S. cycling team, Rolling Stone, 1985; 25 (2).
- 7- EICHNER, E.R., Blood doping: Results and consequences from the laboratory and the field, The Physician and Sportsmedicine, 1987; 15(1): 121-129
- 8- CALDWELL, F, JOPKE, T., Questions and answers: ACSM 1985-ethics of blood doping, The Physician and Sportsmedicine, 1985;13(8): 151
- 9- JONES, M., PEDOE, D.S.T., Blood doping-a litterature review, The British Journal of Sports Medicine, 1988; 23(2):84-88.
- 10- BERGLUND, B., Development of techniques for the detection of blood doping in sports, Sports Medicine, 1988; 5:127-135.
- 11- BERGLUND, B., BIRGEGARD, G., WIDE L., PIHLSTEDT P., Effects of blood transfusions on some hematological variables in endurance athletes. Medicine and Science in Sports and Exercise, 1989; 21(6):637-642.
- 12- DUDA, M., Blood doping improves endurance and heat tolerance, studies say, The Physician and Sportsmedicine, 1987; 15(8):123-127.

13- VOY, R., Vogue:Growth hormone. Blood doping and erythropoietin. Dans: Drugs, Sports and Politics, Leisure Press, 1989, pp. 57-74.

14- KAY, M.M.B., Red cell aging: Senescent cell antigen, band 3, and band 3 mutations: associated with cellular dysfunction, Dans: The Red Cell: Seventh Ann Arbor Conference, ALAN R. LISS Inc., 1989, pp. 199-223.

15- LOW, S., KANNAN, R., Effects of hemoglobin denaturation on membrane structure and IgG binding: role in red cell aging, Dans: The Red Cell: Seventh Ann Arbor Conference, ALAN R. LISS Inc., 1989, pp. 525-552.

16- GALILI, U., KOBRIN, E., MACHER, B.A., SHOHEIT, S.B., Anti-Gal and human red cell aging, Dans: The Red Cell: Seventh Ann Arbor Conference, ALAN R. LISS Inc., 1989, pp. 225-245.

17- STECK, T.L., The organization of the proteins in the human red blood cell membrane, The journal of Cellular Biology, 1974; 62: 1-19.

18- KAY, M.M.B, TRACEY, C.M., GOODMAN, J.R., CONE, J.C, BASSEL, P.S., Polypeptides immunologically related to erythrocyte band 3 are present in nucleated somatic cells, Proceedings of the national Academy of Science USA, 1983; 80: 6882-6886.

19- KAY, M.M.B, BOSMAN, G., NOTTER, M., COLEMAN, P., Life and death of neurons: the role of senescent cell antigen, Annals. N.Y. Academy of Science, 1988; 521: 155-169.

20- KELLOKUMPU, S., NEFF, L., JAMSA-KELLOKUMPU, S., KOPITO, R., BARON, R., A 115-kD polypeptide immunologically related to band 3 is present in Golgi membranes, Science, 1988; 242:1308-1311

21- SHUSTER, V.L., BONSI, S.M., JENNINGS, M.L., Two types of collecting duct mitochondria-rich (intercalated) cells: lectin and band 3 cytochemistry, American Journal of Physiology, 1986; 251: C347-C355.

22- KAY, M.M.B., Drosophila to bacteriophage to erythrocyte: the erythrocyte as a model for molecular and membrane aging of terminally differentiated cells, Gerontology, 1991; 37: 5-32.

23- MORIYAMA, R., KAWAMATSU, S., KONDO, Y., TOMIDA, M., MAKINO, S., Antigenic determinants of the cytoplasmic domain on band 3 from bovine erythrocyte membrane, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1989; 274:130-137.

24- GOODMAN, S.R., SHIFFER, K., The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes: a review, American Journal of Physiology, 1983; 244: C121-C141.

25- JENNINGS, M.R., Annual Review of Physiology, 1985; 47: 519-533.

26- JAY, D., CANTLEY, L., Annual Review of Biochemistry, 1986; 55:511-538.

27- LOW, P.S., Biochimistry and Biophysics Acta, 1986; 864: 145-167.

28- STECK, T.L., RAMOS, B., STAPAZON, E., Biochemistry, 1976; 15: 1154-1161.

29- MACARO, I.G., CANTLEY, L.C., Dans Elson, E., Frazier, W., Glaser, L. (eds) Cell Membranes, Plenum Press, New York, 1983.

30- KOPITO, R.R., LODISH H.F., Nature, 1985; 316: 234-238.

31- BENNETT, G.D., STENBUCK, P.J., The membrane attachment for spectrin is associated with band 3 human érythrocytes membranes, Nature, 1979; 280:468-473.

32- MUELLER, T.J., MORISSON, M., Detection of a variant of protein 3, the major transmembrane protein of the human erythrocyte, Journal of Biological Chemistry, 1977; 252:6573-6576.

33- KNAUF, P.A., SPINELLI, L.J., MANN, N.A., DIEFENBACH, B.L., KOZODY, D.J., RESTREPO D., Tests of the ping-pong model for anion transport in red blood cells and HL60 promyelocytic leukemic cells, The other functions of erythrocyte membrane band 3, Dans: Hamasaki, N., Jennings M.L. (eds) Anion transport protein of the red blood cell membrane, Elsevier Science Publishers, 1989, pp. 15-25.

34- HALBHUBER, K.-J., ZIMMERMANN, N., LINSS, W., Erythrocyte membrane alteration and IgG receptor expression, Acta Histochemica, suppl.-band XXXVI, 1988; S285-S299.

- 35- WEAVER, D.C., PASTERNAK, G.R., MARCHESI, V.T., Journal of Biological Chemistry, 1984; 259: 6170-6175.
- 36- RIFKIND, R.A., Blood, 1965; 26: 433-448.
- 37- BESINGER, E.A., GILLETTE, P.N., Archives of International Medicine, 133: 624-631.
- 38- LAFONTAINE, M., LEBRUN, S., Immuno-hématologie, Décarie éditeurs, Montréal, 1985; pp. 23-29.
- 39- LUBLIN, D.M., ATKINSON, J.P., Decay-accelerating factor: Biochemistry, molecular biology, and function, Annual Review of Immunology, 1989; 7:35-58
- 40- SEYA, T., FARRIES, T., NICKELLS, M., ATKINSON, J.P., Additional forms of human decay-accelerating factor(DAF), The Journal of Immunology, 1987; 139(4): 1260-1267.
- 41- HOLMES, C.H., AND AL., Preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy, The Journal of Immunology, 1990; 144(8): 3099-3105.
- 42- DANIELS, G., Cromer-related antigens-Blood group determinants on decay-accelerating factor, Vox Sanguinis, 1989;56:205-211.
- 43- KINOSHITA, T., MEDOF, M.E., SILBER, R., NESSENZWEIG, V., Distribution of decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Journal of Experimental Medecine, 1985;162: 75-92.
- 44- ZALMAN, L.S., WOOD, L.M., FRANK, M.M., MÜLLER-EBERHARD, H.J., Deficiency of the homologous restriction factor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Journal of Experimental Medicine, 1987; 165:572-577.
- 45- MEDOF, M.E., WALTER, E.I., RUTGERS, J.L., KNOWLES, D.M., NUSSENZWEIG, V., Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids, Journal of Experimental Medicine, 1987; 165:848-864.

46- ROSS, G.D., MEDOF M.E., Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3, Advances in Immunology, 1985: 37; 217-267.

47- IIDA, K., MORNAGHI, R., NUSSENZWEIG, V., Complement receptor (CR₁) deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus, Journal of Experimental Medicine, 1982: 155; 1427-1438.

48- IIDA, K., NUSSENZWEIG, V., Functional properties of membrane-associated complement receptor CR₁, The Journal of Immunology, 1983: 130(4); 1876-1880.

49- EMANCIPATOR, S.N., IIDA, K., NUSSENZWEIG, V., GALLO, G.R., Monoclonal antibodies to human complement receptor (CR₁) detects defects in glomerular diseases, Clinical Immunology and Immunopathology, 1983: 27; 170-175.

50- MOULDS, J.M., MOULDS, J.J., BROWN, M., ATKINSON, J.P., Antiglobulin testing for CR₁ related (Knops/McCoy/Swain-Langley/York) blood group antigens: Negative and weak reactions are caused by variable expression of CR₁, Vox Sanguinis, 1992: 62; 230-235

51- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., Immunology, Gower medical publishing, London-New-York, 1989, pp 13.9-13.15 et 21.1-23.8.

52- KAY, M.M.B., Isolation of the phagocytosis inducing IgG binding antigen on senescent somatic cells, Nature, 1981; 289: 491-494.

53- KAY, M.M.B, Localization of senescent cell antigen on band 3, Proceedings of the National Academy of Science USA, 1984; 81: 5753-5757.

54- KAY, M.M.B., Band 3, the predominant transmembrane polypeptide, undergoes proteolytic degradation as cells age, Monographic Developpement in Biology, 1984; 17: 245-253.

55- KAY, M.M.B, BOSMAN, G., SHAPIRO, S.S., BENDICH, A., BASSEL, P.S., Oxydation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocyte, Proceedings of the National Academy of Science USA, 1986, 83: 2463-2467.

56- LOW, P.S., Red blood cell membranes(eds) Marcel Dekker, inc., 1989; 237-260.

57- LOW, P.S., WILLARDSON, B.M., THEVENIN, B., KANNAN, R., MEHLER, E., GEAHLEN, R.L., HARISSON M., The other functions of erythrocyte membrane band 3, Dans Hamasaki, N., Jennings M.L. (eds) Anion transport protein of the red blood cell membrane, Elsevier Science Publishers, 1989, pp. 103-118.

58- GALILI, U., RACHMILEWITZ, E.A., PELEG, A., FLECHNER, I., A unique natural human IgG antibody with anti-a-galactosyl specificity, Journal of Experimental Medicine, 1984; 160:1519-1531.

59- GALILI, U., FLECHNER, I., KNYSZYNSKI, A., DANON D., RACHMILEWITZ, E.A., The natural anti-a-galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells, British Journal of Haematology, 1986; 62: 317-324.

60- GALILI, U., The two antibody specificities within human anti-blood group b antibodies, Transfusion Medical Review, 1988; 2: 112-121.

61- GALILI, U., BASBAUM, C.B., SHOHEIT, S.B., MACHER, B.A., Identification of erythrocyte Gal α 1- \rightarrow 3Gal glycosphingolipids with a mouse monoclonal antibody Gal-13, Journal of Biological Chemistry, 1987; 262: 4683-4688.

62- GALILI, U., BUEHLER, J., SHOHEIT, S.B., MACHER, B.A., The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between anti-Gal and anti-B antibodies, Journal of Experimental Medicine, 1987; 165: 693-704.

63- RIPOCHE, J., SIM, R.B., Loss of complement receptor type 1 (CR₁) on ageing of erythrocytes. Studies of proteolytic release of the receptor, Biochemistry Journal, 1986; 235: 815-821.

64- MOLDENHAUER, F., BOTTO, M., WALPORT, M.J., The rate of loss of CR₁ from ageing erythrocytes in vivo in normal subjects and SLE patients: No correlation with structural or numerical polymorphisms, Clinical and Experimental Immunology, 1988; 72: 74-78.

65- LUTZ, H.U., Erythrocyte clearance. Dans Blood cell biochemistry, volume 1, Erythroid cells, Chapitre 4., J.R. Harris éditeur, Plenum Press, New York et Londres, 1990, pp. 81-120.

66- KAY, M.M.B., Role of physiologic autoantibody in the removal of senescent human red cells, Journal of Supramoleccular Structure, 1978; 9: 555-567.

67- SORETTE, M.P., GALILI, U., CLARK M.R., Comparaison of serum anti-band 3 and anti-Gal antibody binding to density-separated human red blood cells, Blood, 1991; 77(3): 628-636.

68- COSIO, F.G., XIAO-PING, S., HÉBERT, L.A., Immune complexes bind preferentially to specific subpopulations of human erythrocytes, Clinical Immunology and Immunopathology, 1990; 55: 337-354.

69- GOULET, H., Détection du dopage sanguin par transfusion autologue: étude du vieillissement érythrocytaire, mémoire INRS-Santé, novembre 1991.