

UNIVERSITE DE NANTES
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 2015

N° 058

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 9 Novembre 2015

Par Clément DUMORTIER

Conformément aux dispositions du Décret n°2012-172 du 3 février

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

*NEUTROPÉNIE AUTOIMMUNE PRIMITIVE :
CARACTÉRISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE ET COMPARAISON DE
DEUX GROUPES DE PATIENTS PRÉSENTANT DES ANTICORPS
DIRIGÉS CONTRE LES ANTIGÈNES HNA-1A OU HNA-1B*

Président : Madame Virginie FERRE, Professeur de Virologie

Membres du Jury: Monsieur Régis JOSIEN, Professeur d'Immunologie

Madame Caroline THOMAS, Praticien Hospitalier

Monsieur Jérôme MARTIN, Assistant Hospitalo-Universitaire

Madame Marie AUDRAIN, Praticien Hospitalier

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement

Madame le Professeur Virginie FERRE

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et avez toujours été présente pour faciliter et promouvoir la vie associative au sein de votre faculté

Soyez en sincèrement remerciée

Monsieur le Professeur Régis JOSIEN

Vous avez accepté de diriger ce travail.

Recevez ici toute ma reconnaissance et l'expression de mon plus profond respect

Monsieur le Docteur Jérôme MARTIN

Tu as été à l'origine de ce travail. Ton point de vue, tes aides à l'interprétation et à l'élaboration de cette thèse d'exercice ont largement contribué à ce travail. Tes connaissances et ton sens de la pédagogie ont été d'une aide non négligeable.

Trouve ici l'expression de ma profonde gratitude

Madame le Docteur Marie AUDRAIN

Vous avez accepté de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect

Madame le Docteur Caroline Thomas

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect

Merci également,

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'Immunologie et tout particulièrement à :

Marie-Hélène et à Audrey pour m'avoir laissé un bout de paillasse un grand nombre de mardi, mais aussi pour les aides précieuses que vous m'avez apportées.

Hans pour la création du protocole de cytométrie, mais aussi pour avoir passé le dernier patient de la série.

A ma famille et en particulier mes parents, pour m'avoir accompagné et soutenu pendant ces longues années d'études. C'est grâce à vous que j'en suis arrivé là.

A mon frère Baptiste, c'est aussi grâce à ton humour et à notre complicité que j'en suis là aujourd'hui.

A Céline, pour m'avoir soutenu et supporté, pour l'amour que tu me portes et le bonheur que tu me donnes. Je t'aime.

Aux amis lillois de la faculté de Pharmacie : Justine, Etienne, Pierre-Henri, Jourdan, Camille, Damien, Xavier, Julie, Céline. Et spécialement à Chloé, Yann et Jean avec qui j'ai vécu les pires mais aussi les meilleurs moments de ces années d'études

A l'ensemble des internes et anciens internes nantais et notamment : Benjamin, Mathilde, Damasie, Anne-Gaëlle, Guillaume, Arnaud, Nicolas, Elise et bien sûr Matthieu avec qui j'ai eu le plaisir de faire mes premiers pas dans la vie d'interne.

A Guillaume, qui m'a fait découvrir les joies de la vie associative

A tous les membres des bureaux 2013 et 2014 de l'Association des Internes en Pharmacie et Biologie de Nantes.

A toi, qui va prochainement arriver.

Sommaire

Liste des Figures	5
Liste des Tableaux	8
Liste des abréviations	9
Introduction	11
Généralités	12
1 Généralités sur les Neutropénies	12
1.1 Définition d'une neutropénie	12
1.2 Neutropénies constitutionnelles	12
1.3 Neutropénies acquises	13
2 La Neutropénie auto-immune primitive	15
2.1 Le système HNA (Human Neutrophil Alloantigens).....	15
2.2 Epidémiologie de la NAI I.....	22
2.3 Antigènes ciblés par les auto-anticorps dans la NAI I	23
2.4 Manifestations cliniques de la NAI I.....	24
2.5 Prise en charge	25
2.6 Diagnostic biologique des neutropénies auto-immunes primitives	25
2.7 Développement de l'auto-immunité	30
2.8 Rôle des auto-anticorps	32
Objectifs	42
1 Etude clinico-biologique	42
2 Etude physiopathologique	43
Matériel et méthodes	44
1 Constitution des groupes de patients	44
2 Etude clinico-biologique	44
3 Réactifs utilisés	45
4 Etude physiopathologique	45

4.1	<i>Isolement et préparation des polynucléaires neutrophiles</i>	45
4.2	<i>Typage des sous-classes d'immunoglobulines G</i>	46
4.3	<i>Etude de lyse par le complément</i>	47
4.4	<i>Etude du dépôt de C3c</i>	49
4.5	<i>Etude de survie</i>	50
5	<i>Exploitation des résultats</i>	51
Résultats		52
1	<i>Statistiques descriptives</i>	52
2	<i>Etudes des sous-classes d'immunoglobulines</i>	55
2.1	<i>Analyse qualitative de la répartition des sous-classes</i>	57
2.2	<i>Analyse quantitative de la répartition des sous-classe</i>	58
2.3	<i>Impact clinique de la production de chacune des sous-classes d'IgG</i>	64
2.4	<i>Cas particulier des IgG2</i>	67
2.5	<i>Etude des profils de sous-classes d'IgG produites</i>	69
3	<i>Etude des mécanismes physiopathologiques des auto-anticorps anti-HNA-1a et anti-HNA-1b dans la NAI I</i>	74
3.1	<i>Lyse des PNN par activation de la voie classique du complément</i>	74
3.2	<i>Effet sur la survie des polynucléaires neutrophiles</i>	82
Discussion et perspectives		86
1	<i>Il pourrait exister des différences physiopathologiques entre les patients produisant des anticorps anti-HNA-1a et anti-HNA-1b</i>	86
2	<i>La lyse par le complément ne serait pas le mécanisme de destruction principal responsable de la neutropénie</i>	88
3	<i>Impact des anticorps sur la survie des PNN</i>	91
4	<i>Limites et perspectives</i>	93
Conclusion		96
Bibliographie		97

Liste des Figures

Figure 1 : Structure et polymorphisme du Fc γ RIIIb.....	17
Figure 2 : Répartition des spécificités des auto-anticorps selon Bux et al.	23
Figure 3 : Principe du Granulocyte Agglutination Test	26
Figure 4 : Images d'agglutinations obtenues par GAT.	27
Figure 5 : Principe du Granulocyte Immunofluorescence test	28
Figure 6 : Principe du MAIGA.....	29
Figure 7 : Structure générale d'une immunoglobuline G.....	34
Figure 8 : Représentation schématique des 4 sous classes d'immunoglobulines G	34
Figure 9 : Conséquences de l'activation de la voie classique du complément.....	36
Figure 10 : Mécanisme de l'Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity ou ADCC	37
Figure 11 : Schéma du principe des tests de microlymphocytotoxicité	40
Figure 12 : Schéma synthétique des différents mécanismes intervenant dans le développement de la NAI I et des éventuels effets des anticorps produits.	41
Figure 13 : Principe de la technique utilisée pour la lyse par le complément.....	48
Figure 14 : Principe de la technique d'étude du dépôt de C3c.....	50
Figure 15 : Résultats des comparaisons des âge entre les groupes HNA-1a et HNA-1b.....	53
Figure 16 : Représentation schématique des taux de polynucléaires neutrophiles dans chacun des groupes HNA-1a et HNA-1b.	54
Figure 17 : Présentation du types d'infections développées dans les groupes HNA-1a et HNA-1b.....	55
Figure 18 : Exemple d'un patient du groupe HNA-1a présentant des IgG anti-CD16b de sous-classes IgG1, IgG2 et IgG3.	56
Figure 19 : Exemple d'un patient du groupe HNA-1b positif pour les IgG1 et IgG3, négatif pour les IgG2 et IgG4.....	57
Figure 20 : Représentation schématique du ratio moyen des médianes de fluorescence en IgG polyvalentes dans chacun des deux groupes	58
Figure 21 : Résultats des comparaisons des ratios moyens des médianes de fluorescence IgG1/SAB et IgG3/SAB entre les patients positifs des groupes Hna-1a et HNA-1b	60
Figure 22 : Résultats des comparaisons médianes de fluorescence IgG1 et IgG3 entre les patients positifs des groupes HNA-1a et HNA-1b.....	60
Figure 23 : Résultats des comparaisons médianes de fluorescence au sein du groupe HNA-1b chez les patients positifs en IgG1 et IgG3, entre les IgG1 et les IgG3.....	61

Figure 24: Résultats des comparaisons des ratios de fluorescence au sein du groupe HNA-1a.	62
Figure 25: Résultats des comparaisons des médianes de fluorescence au sein du groupe HNA-1a.	63
Figure 26: Résultats des comparaisons des valeurs du SAB au sein du groupe HNA-1a.	64
Figure 27: Comparaison des taux de neutrophiles entre les patients produisant des IgG2 et ceux n'en produisant pas.	68
Figure 28 : Diagramme représentatif des répartitions des infections en fonction des patients présentant ou non des IgG2 dans le groupe HNA-1a.	68
Figure 29 : Répartition des profils de sous-classes d'immunoglobulines G produites par les patients du groupe HNA-1a ou HNA-1b.	70
Figure 30 : Proportion de sujets ayant présenté des infections en fonction des profils de sous-classes d'immunoglobulines G produites.	71
Figure 31: Diagramme représentatif du nombre de sujets ayant présenté des infections dans le groupe HNA-1a, en fonction des profils de sous-classes d'IgG produites.	71
Figure 32: Diagramme représentatif du nombre de sujets ayant présenté des infections dans le groupe HNA-1b, en fonction du profil de sous-classes d'IgG produites.	72
Figure 33: Proportion de sujets ayant présenté des infections en fonction du nombre de sous-classes identifiées, les deux sous-groupes étant confondus.	73
Figure 34 : Proportion de sujets ayant présenté des infections en fonction du nombre de sous-classes identifiées dans le groupe HNA-1a.	73
Figure 35: Exemple d'image obtenue pour la technique de lyse par le complément chez un sujet du groupe HNA-1a et après réanalyse sur Flowjo™.	77
Figure 36: Exemple d'image obtenue pour la technique de lyse par le complément chez un sujet du groupe HNA-1b et après réanalyse sur Flowjo™.	78
Figure 37 : Résultats des comparaisons des ratios normalisés des proportions de cellules mortes par rapport au SAB entre les groupes HNA-1a et HNA-1b.	79
Figure 38 : Exemple d'images obtenues chez un sujet du groupe HNA-1a après réanalyse sur Flowjo™.	80
Figure 39 : Exemple d'images obtenues chez un sujet du groupe HNA-1b après réanalyse sur Flowjo™.	80
Figure 40 : Figure représentative des médianes de fluorescences obtenues pour l'étude de dépôt de C3c.	82

Figure 41: Exemple d'image obtenue chez un sujet du groupe HNA-1a après réanalyse sur Flowjo™	83
Figure 42 : Exemple d'image obtenue chez un sujet du groupe HNA-1b après réanalyse sur Flowjo™	84
Figure 43 : Résultat des comparaisons des proportions de cellules vivantes et mortes pour l'étude de survie.	84
Figure 44 : Mécanismes d'échappement à l'action lytique du complément sur les cellules nucléées	90
Figure 45 : Schéma représentatif des principales données obtenues sur la NAI I, permettant de compléter les observations décrites dans la littérature.	93

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Présentation des principales étiologies des neutropénies.....	15
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents gènes impliqués dans la génération des différents épitopes immunogènes du FcγRIIIb.....	18
Tableau 3 : Répartition des phénotypes et fréquences alléliques des variants du système HNA-1 au sein de la population mondiale.....	19
Tableau 4 : Résumé des propriétés des sous-classes d'immunoglobulines	38
Tableau 5 : Exemple de plan de plaque utilisé pour la technique de typage des sous classes d'immunoglobulines G.....	47
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des patients des groupes HNA-1a ou HNA-1b	52
Tableau 7 : Proportion de patients exprimant chacune des sous-classes d'IgG dans chacun des groupes étudiés.....	57
Tableau 8 : Valeurs des ratios moyens des médianes de fluorescence pour les IgG1 et IgG3 produites dans les groupes HNA-1a et HNA-1b.....	59
Tableau 9 : Comparaison des données clinico-biologiques en fonction de la production ou non de chacune des sous-classes d'IgG. Tout groupe confondu.....	66
Tableau 10 : Comparaison inter-groupe des données clinico-biologique en fonction de la production ou non de chacune des sous-classes d'IgG.	66
Tableau 11 : Profils de sous-classes d'immunoglobulines G produites par les patients sélectionnés pour l'étude de lyse par le complément.	75
Tableau 12 : Présentation des résultats obtenus pour l'étude de lyse par le complément.	78
Tableau 13 : Présentation des résultats obtenus lors de l'étude du dépôt de C3c.....	81
Tableau 14 : Résultats obtenus pour l'étude de survie.....	85

Liste des abréviations

ADCC : Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity
ADN : Acide DesoxyriboNucléique
ANCA : AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibody
BSA : Bovine Serum Albumin
CAM : Complexe d'Attaque Membranaire
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CMH : Complexe Majeure d'histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
CR1 : Complement Receptor Type 1
CTL-2 : Choline Transporter-like type 2
CXCR4 : C-X-C Chemokine Receptor Type 4
DAPI : 4'6'-diamidino-2-phénylindole
EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
ELANE : Elastase Neutrophile
Fc : Fragment cristallisable
FcγRI : Fc gamma Receptor Type I
FcγRII : Fc gamma Receptor Type II
FcγRIII : Fc gamme Receptor type III
FOXP3 : Forkhead box Protein P3
GAT : Granulocyte Agglutination Test
G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor
GFI1 : Growth Factor Independent 1
GIFT : Granulocyte ImmunoFluorescence Test
GPI : GlycosylPhosphatidylInositol
HAX-1 : HCLS-1 Associated protein X-1
HLA : Human Leukocyte Antigen
HNA : Human Neutrophil Alloantigen
IgA : Immunoglobuline A
IgG : immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
ISBT : International Society of Blood Transfusion
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
kDa : kiloDalton
LFA-1 : Leucocyte Function associated Antigen 1
LGL : Large Granular Lymphocyte
LSM : Lymphocyte Separation Medium
MAIGA : Monoclonal Antibody Immobilization of Granulocyte Antigens
MAIPA : Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens
NAI : Neutropénie AutoImmune
NB1 : Neutrophil antigen B1
NFATC2 : Nuclear Factor of Activated T-cell c2
NK : Natural Killer
ORL : Oto-Rhino-Laryngologique
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCR SSP : Polymerase Chain Reaction Specific Sequence Primer
PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1

PFA : ParaFormAldéhyde

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SAB : Sérum AB

SEM : Standard Error Mean (erreur moyenne standard)

TRALI : Transfusion Related Acute Lung Injury

Treg : T régulateur

VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine

WAS : Wiskott-Aldrich Syndrome

WHIM : Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokatehexis

Introduction

Une neutropénie est par définition une diminution du taux de polynucléaires neutrophiles (PNN) dans le sang. La neutropénie auto-immune primitive (NAI I) est liée à la production d'autoanticorps dirigés contre certains auto-antigènes des PNN. L'étude de cette pathologie a pu mettre en évidence le CD16b comme principale cible antigénique pour les anticorps qui sont dirigés principalement contre 2 de ses isoformes : les antigènes HNA-1a ou HNA-1b. Cette production d'autoanticorps est alors responsable d'une destruction des PNN, mais les mécanismes physiopathologiques de la destruction, dont notamment la lyse par activation de la voie classique du complément, restent controversés et assez peu étudiés. La littérature a également mis en évidence des autoanticorps dirigés contre l'antigène HNA-1a dans la très grande majorité des cas. Cependant, l'antigène HNA-1b reste le principal antigène exprimé dans la population caucasienne et la cause du développement préférentiel des anticorps anti-HNA-1a par rapport aux anti-HNA-1b n'est pas comprise à l'heure actuelle. De plus, nous ignorons actuellement si les NAI I sont similaires dans ces 2 groupes.

Le but de ce travail était donc d'étudier deux cohortes de patients, ceux développant des anticorps anti-HNA-1a et ceux développant des anti-HNA-1b, afin d'éclaircir le mode de destruction des PNN et de mettre en évidence des différences physiopathologiques ou clinico-biologiques. L'étude clinico-biologique consistait en une analyse rétrospective des dossiers de NAI adressés au laboratoire d'Immunologie du CHU de Nantes et a permis de définir les caractéristiques de chacun des deux groupes. L'étude physiopathologique consistait en un typage des sous-classes d'IgG produites dans chaque groupe, une exploration de l'activation du complément par étude de la lyse des PNN et du dépôt de C3c à leur surface, et une étude de survie des PNN opsonisés.

Généralités

1 Généralités sur les Neutropénies

1.1 Définition d'une neutropénie

Une neutropénie est définie par la diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le sang. Elle est qualifiée de sévère lorsque le taux de PNN est inférieur à 0.5G/L, modérée s'il est situé entre 0.5 et 1G/L et mineure lorsqu'il est entre 1 et 1.5G/L (Haddy et al., 1999). Il faut cependant tenir compte des fluctuations physiologiques (cycle nyctéméral, variations saisonnières, origine ethnique) pouvant influencer modérément le taux de PNN circulants. Par exemple, les sujets afro-antillais ont un taux de PNN diminué par rapport aux sujets caucasiens, sans pour autant que cela soit pathologique. Au-delà de leur profondeur, les neutropénies sont également caractérisées en fonction de leur modalité évolutive (chronique ou aiguë), de leur origine centrale ou périphérique, et de leur étiologie constitutionnelle ou acquise. Nous présenterons dans cette partie les différentes étiologies des neutropénies en les classant selon leur origine constitutionnelle ou acquise (**Tableau 1**).

1.2 Neutropénies constitutionnelles

Il est possible de séparer les neutropénies constitutionnelles selon qu'elles sont isolées ou associées à des atteintes extra-hématopoïétiques.

Les principales neutropénies constitutionnelles décrites sont celles liées aux mutations du gène de l'élastase neutrophile (*ELANE*). La destruction des PNN est alors liée à une surproduction d'élastase. Les neutropénies associées aux mutations d'*ELANE* se répartissent en 2 entités, relevant probablement d'un même continuum, selon leur caractère permanent (neutropénie congénitale sévère) ou cyclique. A noter que le terme de neutropénie congénitale sévère (NCS) regroupe un ensemble plus large de neutropénies pouvant être causées par la mutation d'autres gènes qu'*ELANE* (Berliner et al., 2004). La NCS est souvent diagnostiquée avant l'âge de 6 mois. Elle est caractérisée par un taux de neutrophiles souvent inférieur à 0.2G/L, des infections fongiques et bactériennes fréquentes, et un risque élevé de transformation leucémique. La neutropénie cyclique est souvent moins sévère, caractérisée par des infections stomatologiques (aphtes) récurrentes. Son diagnostic est donc souvent plus tardif.

De nombreuses neutropénies constitutionnelles sont également associées à des manifestations extra-hématopoïétiques. Le syndrome de Kostmann est la plus connue de ces

pathologies. Les premières descriptions présentaient des patients atteints d'infections bactériennes ou fongiques dès les premières semaines de vie, associées à une mortalité précoce. Plus tard, avec l'allongement de la survie liée à l'antibioprophylaxie, il a été démontré une association de la neutropénie à des signes neurologiques (Roques et al., 2014). Le syndrome de Kostmann est lié à la mutation du gène codant pour HAX-1, une protéine mitochondriale aux propriétés anti-apoptotiques. Il existe de nombreuses autres pathologies congénitales responsables de neutropénies sévères associées à des manifestations non hématologiques, telles que le syndrome de Schwachmann-Diamond, les anomalies du complexe Glucose-6-phosphatase, le syndrome de Cohen, la maladie de Barth, les déficits en AP14 ou le syndrome Hermanski-Pudlak de type 2 (Donadieu et al., 2011).

Finalement, il existe des neutropénies congénitales s'inscrivant dans un déficit plus large touchant l'immunité innée et/ou adaptative :

- neutropénies liées aux mutations de *GFII*. Cette mutation est responsable d'une augmentation de la production de l'élastase à l'image des mutations *ELANE*. Les conséquences cliniques sont hétérogènes (Person et al., 2003) ;
- les neutropénies liées à l'X, et causées par une mutation du gène *WAS* (Buchbinder et al., 2014) ;
- syndrome WHIM (warts hypogammaglobulinemia, infections and myelokathexis), résultant d'une mutation du gène codant pour le récepteur CXCR4, responsable d'une neutropénie liée à un défaut de mobilisation des PNN de la moelle osseuse (Gorlin et al., 2000).

1.3 Neutropénies acquises

Il est possible de classer les neutropénies acquises en neutropénies immunes d'une part et non immunes d'autre part.

Les étiologies des neutropénies non immunes sont nombreuses et résumées ci-dessous (Fioredda et al., 2011):

- origine infectieuse : les neutropénies sont contemporaines des phases aiguës d'infections virales (hépatites, rougeole, grippe, VIH, CMV, mononucléose infectieuse) et souvent associées à un syndrome mononucléosique. Certaines infections bactériennes comme la typhoïde, la brucellose ou la listériose ainsi que certaines parasitoses comme la leishmaniose viscérale peuvent également induire des neutropénies ;

- origine médicamenteuse ou toxique : souvent associées à la prise d'antithyroïdiens de synthèse ou certains neuroleptiques ;
- hypersplénisme ;
- carences : vitamine B12 et folates ;
- maladies hématologiques : aplasies médullaires, leucémies aiguës, syndromes myélodysplasiques et certaines hémopathies lymphoïdes.

Les neutropénies immunes sont quant à elles associées à la présence d'anticorps pouvant être d'origine allo- ou auto-immune.

La principale cause de neutropénie allo-immune est représentée par l'allo-immunisation foeto-maternelle au cours de laquelle la mère s'immunise contre des antigènes de PNN polymorphes portés par le système HNA (cf section 2.1), lorsque des incompatibilités avec le père et le fœtus existent. Les anticorps produits sont d'isotype IgG et passent la barrière foeto-placentaire pour induire la destruction des PNN fœtaux. Cette neutropénie est spontanément résolutive au bout d'une dizaine de semaines et les complications infectieuses sont généralement mineures.

Les neutropénies auto-immunes sont qualifiées de primitives si elles sont isolées ou de secondaires lorsqu'elles s'associent à un autre processus pathologique. Ces dernières sont de loin les plus fréquentes et parmi les étiologies les plus souvent retrouvées peuvent être mentionnées:

- le syndrome de Felty : caractérisé par la triade polyarthrite rhumatoïde d'évolution compliquée, splénomégalie et neutropénie. La neutropénie peut alors être sévère et la cause d'infections bactériennes graves ;
- le lupus systémique : la neutropénie est souvent modérée et liée aux auto-anticorps anti-PNN mais également à une augmentation de l'apoptose et une diminution de la production médullaire ;
- la leucémie à LGL (large granular lymphocytes) : la neutropénie est alors sévère et serait à la fois liée à la production d'auto-anticorps anti-polynucléaires neutrophiles et à l'élimination intramédullaire des précurseurs, via un mécanisme faisant intervenir l'apoptose induite par l'activation du récepteur de mort cellulaire Fas par le Fas-Ligand membranaire des LGL.

Enfin, la neutropénie auto-immune primitive est liée à la production d'auto-anticorps contre certains antigènes des PNN et fait l'objet de ce travail de thèse.

Neutropénies congénitales	<u>Sans atteinte extra-hématopoïétique</u>	Neutropénies congénitales sévères	liées à un déficit immunité adaptative	WAS	
				GFI-1	
				WHIM Syndrome	
				Mutations ELANE	
				Neutropénie Cyclique	
				Syndrome de Schwachmann-Diamond	
				Anomalie G6P	
Neutropénies acquises	<u>Immunes</u>	Auto-immunes		Neutropénie auto-immunes primitives	
				Neutropénies auto-immunes secondaires	
		Allo-immunes		Neutropénie néonatale alloimmune	
	<u>non-immunes</u>	Infectieuses		infections virales	
				Infections bactériennes	
				Infections parasitaires	
				Médicamenteuse	
			Hypersplénisme		
Carencielles			Vitamine B12		
			Folates		
Maladies hématologiques		Aplasies médullaires			
		Leucémies Aiguës			
		MDS			
		Hémopathies lymphoïdes			

Tableau 1 : Présentation des principales étiologies des neutropénies

2 La Neutropénie auto-immune primitive

La neutropénie auto-immune primitive (NAI I) est une pathologie caractérisée par une diminution de la numération des PNN liée à la production d'auto-anticorps dirigés contre leurs antigènes. Souvent bénigne, la NAI I touche quasi-exclusivement les enfants, est spontanément résolutive mais peut être la cause d'infections récurrentes. Son diagnostic a pour principal intérêt d'éliminer les autres causes de neutropénies de l'enfant, et notamment les neutropénies congénitales de plus mauvais pronostic et de prise en charge beaucoup plus lourde.

2.1 Le système HNA (human neutrophil alloantigens)

Les antigènes ciblés par les allo- et auto-anticorps anti-polynucléaires neutrophiles sont des glycoprotéines présentes à la surface membranaire et faisant l'objet d'un certain nombre de polymorphismes ayant fait définir le système HNA (human neutrophils alloantigens). A l'image du FcγRIIb (CD16b), certaines de ces glycoprotéines sont spécifiques des PNN alors que d'autres sont exprimées par différentes populations de

leucocytes. La nomenclature de ce système antigénique a été définie en 1998 par l'ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology (Bux, 1999) et mise à jour en 2015 (Flesch, 2015). Actuellement, 5 groupes antigéniques ont été décrits : HNA-1, HNA-2, HNA-3, HNA-4 et HNA-5.

2.1.1 *Structure et polymorphisme du système HNA-1*

L'antigène HNA-1 correspond au récepteur pour les IgG FcγRIIIb (ou CD16b). Il s'agit du système le plus fréquemment impliqué dans les neutropénies immunes, qu'elles soient d'origines allo- ou auto-immunes. Quatre épitopes ont été décrits pour l'instant : HNA-1a et HNA-1b ont été les premiers antigènes décrits. L'antigène HNA-1c a été décrit pour la première fois à la fin des années 90 et l'antigène HNA-1d n'a été découvert que très récemment, les données récentes montrent qu'il s'agirait d'un épitope antithétique de HNA-1c (Flesch, 2015).

Le FcγRIIIb est une glycoprotéine appartenant la superfamille des immunoglobulines et rattachée à la membrane plasmique par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol). La région extracellulaire est constituée de 2 domaines immunoglobulines dont le premier présente le plus de résidus polymorphes, le second étant mieux conservé et portant le site de liaison aux IgG (**Figure 1**). Il existe une différence de masse moléculaire entre les isoformes HNA-1a (50-65kDa) et HNA-1b (65-68kDa) du fait de l'existence de sites de N-glycosylations supplémentaires sur l'antigène HNA-1b. Ainsi, l'antigène HNA-1a en possède 4 contre 6 pour le HNA-1b (Ory et al., 1989). Ces 2 isoformes sont les plus représentées au sein de la population.

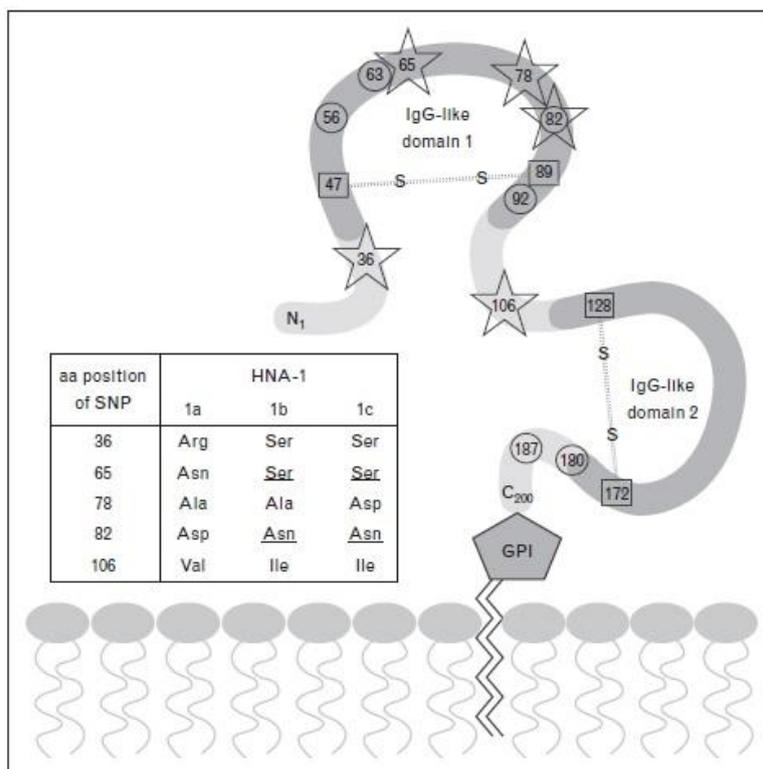


Figure 1 : Structure et polymorphisme du Fc γ RIIIb (☆) Sites de polymorphisme ; (□) Acides aminés impliqués dans la formation de ponts disulfure ; (○) Sites de N-glycosylation. (Muschter et al., 2011)

Au niveau génétique, cinq allèles responsables de ce polymorphisme ont été identifiés (Bux, 2008). Chacun de ces allèles code pour le Fc γ RIIIb, mais les différences de séquences génétiques de chacun d'entre eux peuvent coder pour des épitopes immunogènes (HNA-1a, 1b, 1c ou 1d). Ainsi, *FCGR3B*01* code pour l'antigène HNA-1a, et *FCGR3B*02* pour HNA-1b et HNA-1d. L'allèle *FCGR3B*03* correspond à une mutation de l'allèle *FCGR3B*02* et code pour un phénotype HNA-1b et HNA-1c. Les allèles *FCGR3B*04* et *FCGR3B*05* sont des SNP des gènes *FCGR3B*01* et *FCGR3B*02* codant respectivement pour un antigène HNA-1a et un variant de l'antigène HNA-1b. Il a également été décrit chez certains sujets, et notamment ceux exprimant le HNA-1c, des duplications des gènes *FCGR3B* ayant pour conséquence une expression accrue du Fc γ RIIIb. Ces duplications, engendrées par un phénomène d'enjambement (crossing-over) inégal durant la méiose (de Haas et al., 1995), auraient pour conséquence la perte du gène sur un chromosome et donc l'apparition, chez des sujets homozygotes, du phénotype HNA1-null. Les différents allèles ainsi que leurs résidus nucléotidiques polymorphiques et épitopes associés sont résumés **Tableau 2**.

Allèle	description	Positions nucléotidiques correspondantes						Epitopes
		(141)	(147)	(227)	(266)	(277)	(349)	
FCGR3B*01		108G	114C	194A	233C	244G	316G	HNA-1a
FCGR3B*02		108C	114T	194G	233C	244A	316A	HNA-1b et HNA-1d
FCGR3B*03		108C	114T	194G	233A	244A	316A	HNA-1c et HNA-1b
FCGR3B*04	FCGR3B*01 _{316G>A}	108G	114C	194A	233C	244G	316A	HNA-1a
FCGR3B*05	FCGR3B*02 _{244A>G}	108C	114T	194G	233C	244G	316A	HNA-1b var.
FCGR3B*null	gène délété	Absence d'allèle						HNA-1null

Tableau 2: Tableau récapitulatif des différents gènes impliqués dans la génération des différents épitopes immunogènes du FcγRIIIb selon Flesch, 2015.

2.1.2 Répartition des différents allèles du système HNA-1 au sein de la population mondiale

Il existe une hétérogénéité de distribution des antigènes du système HNA-1 au sein de la population mondiale. Les études de répartition alléliques au niveau de certains groupes ethniques ont permis d'évaluer ces différences (**Tableau 3**).

Nous pouvons remarquer une inversion de la fréquence allélique relative du HNA-1a par rapport au HNA-1b entre les sujets caucasiens et africains d'une part et asiatiques d'autre part. En effet, alors que l'allèle HNA-1b est plus fréquent chez les caucasiens et africains (Fréquence allélique de 0.546 à 0.668 selon les études), il est minoritaire dans les populations asiatiques (0.323 à 0.387). En revanche, concernant le variant HNA-1c, il est fréquent dans les populations africaines, moins chez les sujets européens, et quasiment absent des populations asiatiques.

Concernant la France, une seule étude d'envergure a été réalisée à ce jour (Bierling et al., 1990). Cette dernière montrait des répartitions phénotypiques comparables aux études européennes plus récentes et montrait une répartition allélique en faveur de l'allèle HNA-1b. Ainsi, la majorité de la population française est soit homozygote HNA-1b/b ou hétérozygote HNA-1a/b. Environ 12% de la population apparaîtrait homozygote HNA-1a/a.

Génotype HNA	Europe				Afrique			Asie			
	Angleterre	Danemark	Allemagne	France	Zambie	Afrique sub saharienne	Tunisie	Thaïlande	Chine (Zhejiang)	Chine (Guanghzou)	Japon
HNA-1a/1a	0,079	0,13	0,151	0,123	0,19	0,09	0,145	0,467	0,35	0,426	0,369
HNA-1a/1b	0,464	0,39	0,479	0,418	0,25	0,455	0,403	0,42	0,525	0,483	0,509
HNA-1b/1b	0,429	0,42	0,361	0,457	0,16	0,182	0,291	0,113	0,125	0,09	0,122
HNA-1a/1b/1c	0,021	0,04	NT	NT	0,03	0	0	0	0	0	0
HNA-1b/1c	0,007	0	NT	NT	0,1	0,273	0,16	0	0	0	0
Fréquences alléliques											
allèle HNA-1a	0,318	NT	0,391	0,322	NT	0,318	0,347	0,677	0,613	0,667	0,623
allèle HNA-1b	0,668	NT	0,601	0,645	NT	0,546	0,573	0,323	0,387	0,333	0,377
allèle HNA-1c	0,014	NT	0,025	NT	NT	0,136	0,08	0	0	0	0
Références											
	(Cardoso et al., 2013)	(Nielsen et al., 2012)	(Hauck et al., 2011)	(Bierling et al., 1990)	(Nielsen et al., 2012)	(Oueslati Belhaj Hassine et al., 2012)	(Oueslati Belhaj Hassine et al., 2012)	(Kaset et al., 2013)	(He et al., 2014)	(Xia et al., 2011)	(Matsuhashi et al., 2012)

Tableau 3 : Répartition des phénotypes et fréquences alléliques des variants du système HNA-1 au sein de la population mondiale. (NT) non testée.

2.1.3 Fonctions physiologiques du *FcγRIIIb*

Il existe trois classes de récepteurs pour le fragment Fc des IgG (*FcγRI* ou CD64, *FcγRII* ou CD32 et *FcγRIII* ou CD16) dont les fonctions sont la liaison et l'internalisation des particules opsonisées par des IgG ou des immuns complexes, la toxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), l'induction de l'explosion oxydative et la dégranulation des PNN (cf partie 2.8.1). Le *FcγRIII* comporte 2 isoformes. D'une part le *FcγRIIIa*, présent à la surface des cellules NK, des macrophages, de certaines sous populations de monocytes et de lymphocytes T, possède un motif ITAM intra-cytoplasmique permettant la transduction de signaux intracellulaires (Murphy et al., 2012). D'autre part le *FcγRIIIb*, qui, ainsi qu'il l'a été précisé plus haut, est exprimé spécifiquement à la membrane des PNN, à laquelle il est rattaché par une ancre GPI et est ainsi dépourvu de domaines transmembranaire et intra-cytoplasmique.

Du fait de ces caractéristiques structurales, il paraît donc improbable que le *FcγRIIIb* contribue de manière directe à la transduction de signaux intracellulaires. Cependant, la mobilité conférée par l'ancrage GPI lui permet d'interagir avec le *FcγRIIa*, spécifique des mêmes sous-classes d'IgG (IgG1 et IgG3) (Bruhns et al., 2008). Cette interaction permettrait alors une transduction du signal, par l'intermédiaire des motifs ITAM intracellulaires du *FcγRIIa* (Chuang et al., 2000). Il apparaît donc que le rôle du *FcγRIIIb* serait de favoriser la reconnaissance des IgG et le pontage des récepteurs *FcγRIIa* (Hogg, 1988).

Le pontage du *FcγRIIIb* par les IgG permettrait tout de même d'activer la dégranulation des PNN (Boros et al., 1991), d'induire un influx de calcium intracellulaire (Nazziruddin et al., 1992) et par conséquent, de favoriser la phagocytose par l'intermédiaire du *FcγRIIa* (Salmon et al., 1991). En revanche, son rôle dans l'induction de l'explosion oxydative apparaît secondaire par rapport à ce dernier (Tosi and Berger, 1988). Enfin, il se pourrait également qu'il existe une coopération du *FcγRIIIb* avec le CD11b (ou CR3 pour complement receptor 3) permettant de faciliter la phagocytose (Zhou et al., 1993).

En résumé, il apparaît donc que le *FcγRIIIb* soit un élément important, mais non indispensable aux fonctions effectrices des PNN puisque son activité semble dépendante du *FcγRIIa* avec lequel il agirait de manière synergique. Le fait que les sujets ayant un déficit complet en *FcγRIIIb* ne présentent, pour la plupart, aucune susceptibilité infectieuse particulière, permet d'étayer cette hypothèse (de Haas et al., 1995).

2.1.4 Conséquences fonctionnelles du polymorphisme du *FcγRIIIb*

Plusieurs études ont essayé d'évaluer l'impact revêtu par le polymorphisme du *FcγRIIIb* sur les propriétés fonctionnelles des PNN. Ainsi, il est suggéré que la phagocytose par les polynucléaires des sujets homozygotes HNA-1b/b soit légèrement moins efficace en regard des sujets homozygotes HNA-1a/a. Cette différence ne semble pas dépendre d'un impact du polymorphisme sur les niveaux d'expression protéique, qui sont similaires chez les sujets HNA-1a/a ou HNA-1b/b (Salmon et al., 1990). Il a en revanche été proposé par une autre équipe que l'affinité pour les IgG3 du *FcγRIIIb* codé par l'allèle HNA-1a serait 3 fois supérieure à celle de l'isoforme codée par le HNA-1b. Aucune différence ne semble par contre exister concernant l'affinité vis-à-vis des IgG1 (Nagarajan et al., 1995). Renforçant ces observations *in vitro* suggérant des propriétés fonctionnelles amoindries des polynucléaires neutrophiles exprimant uniquement l'isoforme HNA-1b, un risque plus élevé de récurrences de parodontites est associé à l'allèle HNA-1b chez les sujets asiatiques. A l'inverse, les sujets HNA-1a/a présenteraient une prédisposition accrue aux vascularites à ANCA et un pronostic plus sévère au cours des myasthénies (van Sorge et al., 2003).

2.1.5 Autres antigènes du système HNA

Au-delà du HNA-1, le système HNA comprend 4 autres groupes antigéniques ayant été impliqués dans des neutropénies auto- et/ou allo-immunes.

Tout d'abord, l'antigène HNA-2, situé sur la glycoprotéine CD177 (NB1) et dont l'expression est, comme pour le CD16b, restreinte aux PNN. Il est à noter néanmoins que contrairement au CD16b, l'expression du HNA-2 n'est pas homogène sur l'ensemble des PNN mais semble se limiter à certaines sous-populations. Par ailleurs, un certain nombre d'individus n'expriment pas le CD177 du fait d'un défaut d'épissage alternatif (phénotype HNA-2null). C'est l'existence de ce phénotype HNA-2null qui semble à l'origine du développement d'iso-anticorps pouvant notamment être responsables de neutropénies néonatales. En revanche, malgré l'existence de plusieurs SNPs du CD177, aucun d'entre eux n'a jusqu'à présent donné lieu au développement d'allo-anticorps. Fonctionnellement, le CD177 semble impliqué dans les processus d'adhérence et de diapédèse des PNN par l'intermédiaire de l'interaction avec PECAM-1 (CD31) (Bayat et al., 2010).

L'antigène HNA-3 est le plus récemment caractérisé dans la littérature (Greinacher et al., 2010). Il est porté par la première boucle extracellulaire de la protéine CTL2 (choline transporter-like protein 2), exprimée par les PNN, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les plaquettes et dans un certain nombre de tissus dont l'oreille interne, les poumons et le foie.

Deux allo-antigènes ont été identifiés et sont nommés HNA-3a et HNA-3b respectivement. Cliniquement, les allo-anticorps anti-HNA-3a (plus immunogène que HNA-3b) ont été décrits dans les réactions fébriles transfusionnelles, les neutropénies néonatales allo-immunes et les TRALI (transfusion-related lung injury) (Muschter et al., 2011).

HNA-4a est l'unique allo-antigène décrit dans le système HNA-4. Il est situé sur la sous-unité α_M (CD11b ou CR3) de l'intégrine leucocytaire $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18). CD11b/CD18 est exprimé par les cellules de la lignée myéloïde dont les neutrophiles ainsi que par les lymphocytes NK. CD11b/CD18 est un acteur majeur de l'adhérence des PNN à l'endothélium et aux plaquettes ainsi que de la phagocytose. Les allo-anticorps anti-HNA-4a sont responsables de neutropénies néonatales allo-immunes (Bux, 2008). L'existence d'un allo-antigène HNA-4b est suspectée mais encore non formellement démontrée.

Finalement, un seul allo-antigène constitue actuellement le système HNA-5 et correspond au HNA-5a, localisé sur la chaîne α_L (CD11a) de l'intégrine leucocytaire $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18). CD11a/CD18, également connu sous le nom de LFA-1 (leucocyte functional antigen 1) est exprimé à la surface de tous les leucocytes et assure des fonctions majeures dans l'adhérence et la diapédèse. Actuellement, il existe peu de situations cliniques impliquant clairement des anticorps dirigés contre l'antigène HNA-5a (Bux, 2008).

2.2 Epidémiologie de la NAI I

La principale étude épidémiologique sur la NAI I a été réalisée en 1998 par Bux J. et al (Bux et al., 1998). Dans cette série de 240 cas, il est décrit un âge moyen de diagnostic de 8 mois et un diagnostic établi dans 2/3 des cas entre 5 et 15 mois. Le patient le plus jeune diagnostiqué avait 33 jours de vie. Pour 70% des patients, la neutropénie était sévère (inférieure à 0.5G/L). Le sex ratio fille/garçon était équilibré (1.17).

Une autre série de 121 patients de Lalezari P. et al (Lalezari et al., 1986), plus ancienne, montre également un âge moyen de diagnostic de 8 mois (avec un âge de découverte allant de 3 à 30 mois), un sex-ratio fille/garçon de 1.5. Il y est décrit également une neutropénie souvent sévère (entre 0 et 0.5G/L), associée à une monocytose, avec une hyperéosinophilie décrite dans quelques cas. La moelle osseuse est hypercellulaire montrant une augmentation des précurseurs de la lignée myéloïde et une diminution, voire une absence de polynucléaires matures.

L'incidence de la NAI I est mal connue et probablement sous-évaluée du fait de son caractère bénin et parfois entièrement asymptomatique, mais il est communément admis qu'elle serait de l'ordre de 1/100 000 (Lyall et al., 1992).

2.3 Antigènes ciblés par les auto-anticorps dans la NAI I

Plusieurs études ont analysé les cibles des auto-anticorps anti-PNN au cours de la NAI I (Audrain et al., 2011; Bruin et al., 1999; Bux et al., 1998; Lalezari et al., 1986; Lyall et al., 1992).

Les premières études ont montré une spécificité des anticorps dirigés contre le CD16b dans un premier temps, puis contre une plus large diversité d'antigènes : CD11b/CD18, Fc γ RII (CD32), et le CR1 (CD35) (**Figure 2**). Les anticorps sont majoritairement de type IgG, la présence d'IgM étant peu fréquente (Bux et al. retrouvait des IgM seules chez 3% de ses patients et dans 12% des cas associées à des IgG).

Cependant, les études plus récentes ont permis de montrer que les anticorps dirigés contre le CD16b sont de loin les plus fréquemment mis en cause dans la NAI I. Chez ces patients, la majorité développe des anticorps dirigés spécifiquement contre l'isoforme HNA-1a (73 à 76%). Neuf à 10% d'entre eux développent des anticorps anti-HNA-1b.

Cette plus fréquente implication de l'antigène HNA-1a dans le développement des NAI I suscite actuellement des interrogations, notamment du fait qu'il s'agisse d'un antigène moins fréquemment exprimé au sein de la population. L'explication de cette plus forte fréquence n'a pas encore été trouvée à l'heure actuelle.

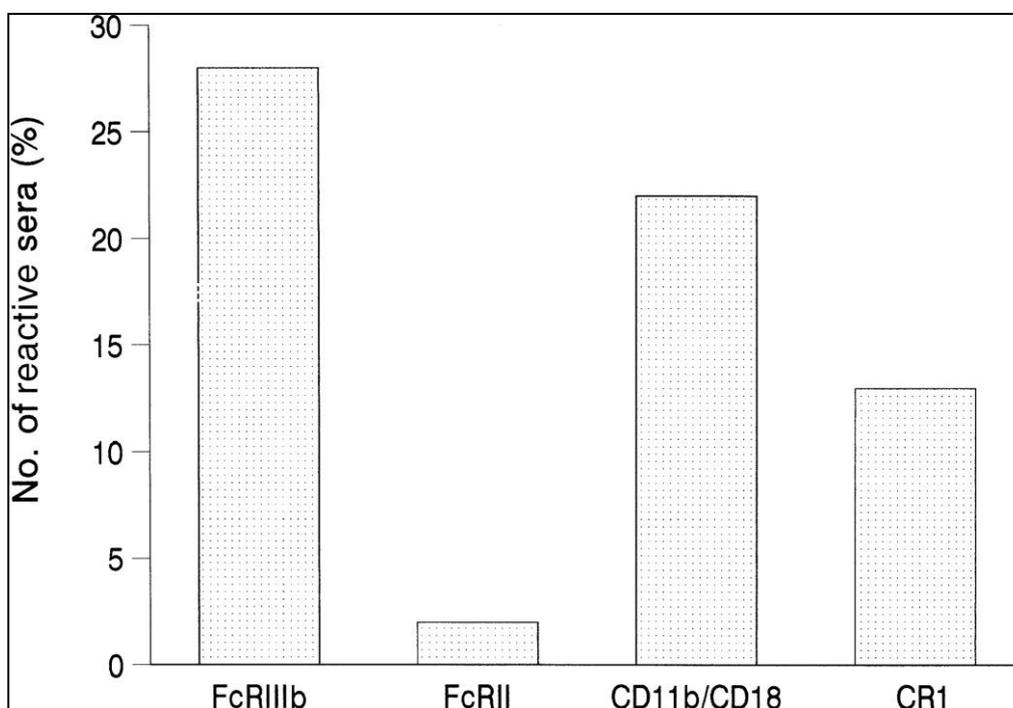


Figure 2 : Répartition des spécificités des auto-anticorps selon Bux et al. (Bux et al., 1998)

Finalement, Il est également important de noter que dans 11.5 à 40% des cas, aucun anticorps n'est détecté malgré une suspicion clinique forte de neutropénie auto-immune primitive. L'étude de Bux et al. a montré qu'il était possible d'améliorer la sensibilité de détection jusqu'à un seuil proche de 100% des auto-anticorps en répétant les recherches quelques semaines plus tard.

2.4 Manifestations cliniques de la NAI I.

La NAI I peut être complètement asymptomatique. Cependant, du fait de la profondeur importante de la neutropénie, il existe un risque infectieux non négligeable chez ces patients. Il existe quelques études qui ont étudié les manifestations infectieuses des NAI I (Bux et al., 1998; Fioredda et al., 2013; Lalezari et al., 1986; Wan et al., 2012).

Toutes ces études relèvent en majorité des infections respiratoires hautes et des infections ORL à répétition. Cependant, de nombreux types d'infections peuvent survenir au cours de ces neutropénies : infections cutanées et des tissus mous, abcès, gastro-entérites. Bux et al. relèvent une proportion assez élevée (12%) de patients présentant des fièvres d'étiologies indéterminées. Ces infections sont majoritairement bénignes. On observe en revanche, en fonction des études, une forte variabilité dans la proportion de patients développant au moins un épisode infectieux (32 à 80%). Cependant du fait de l'importance de la durée de la neutropénie dans le développement d'infections, il est plus probable que ce taux soit proche de celui retrouvé par Bux J. et al. (80%), ce dernier ayant effectué un suivi des patients sur plusieurs années.

Il ne faut également pas négliger la possibilité d'infections graves chez une minorité de patients. En effet, Bux J. et al. relèvent 3% de sepsis dans leur cohorte, proportion qui sera également relevée chez Fioredda et al. De plus, les études montrent une nécessité de prise en charge hospitalière pour une proportion non négligeable de ces épisodes infectieux (40 à 72%).

Au long cours, Lalezari P. et al décrivent la possibilité d'hypertrophie gingivale et une perte d'audition lorsque la neutropénie est prolongée au-delà de 3 ans. Cependant, ce type de séquelles n'est pas documenté dans les études plus récentes.

Globalement, même si les infections restent bénignes la plupart du temps, une proportion non négligeable d'entre elles nécessitent une hospitalisation et peuvent, dans de très rares cas, mettre en jeu le pronostic vital. Les infections respiratoires hautes et ORL semblent être les plus fréquemment décrites.

2.5 Prise en charge

Tout d'abord, il est important de rappeler que la NAI I est spontanément résolutive. Devant la nécessité d'un suivi au long cours pour évaluer la résolution de la neutropénie, il n'existe que peu d'études décrivant cette notion (Bux et al., 1998)(Lalezari et al., 1986).

En fonction des études, cette durée de résolution varie de 1 à 60 mois, avec des médianes de 17 à 30 mois. Environ 95% des patients seraient guéris avant l'âge de 4 ans.

Une remontée du taux de PNN afin de prévenir d'éventuelles infections n'est nécessaire que chez une minorité de patients (13% selon Bux et al.). Anciennement, les traitements visant à faire remonter ce taux reposaient sur les corticoïdes, l'administration de fortes doses d'immunoglobulines polyvalentes et de G-CSF qui apparaissait comme le plus efficace. Cependant, 89% des patients bénéficiaient d'une antibioprophylaxie afin de diminuer la récurrence des infections.

Les recommandations les plus récentes concernant la prise en charge de ces patients préconisent une antibioprophylaxie en cas de fièvre non expliquée et une couverture vaccinale à jour. Le G-CSF n'est recommandé qu'en cas d'infection sévère ou d'une chirurgie. L'usage de corticoïdes, d'immunoglobulines polyvalentes intraveineuses, de ciclosporine ou d'anti-CD20 n'apparaît pas nécessaire chez ces patients. Il apparaît également nécessaire de mettre en place un suivi régulier, avec une numération tous les 1 à 3 mois jusqu'à normalisation de la neutropénie. Le myélogramme n'est effectué que lorsqu'il est nécessaire de reconsidérer le diagnostic posé. Enfin, en cas de persistance pendant une durée de plus de 3 ans, il est recommandé de rechercher un autre déficit immunitaire associé avec une exploration de l'immunité humorale et cellulaire et l'existence d'autres pathologies auto-immunes susceptibles de se compliquer d'une neutropénie (Farruggia and Dufour, 2014).

2.6 Diagnostic biologique des neutropénies auto-immunes primitives

Les tests biologiques permettant la mise en évidence des auto-anticorps des NAI I se basent sur la mise en présence de polynucléaires issus de donneurs avec le sérum du patient à tester. Il existe actuellement 3 tests de routine utilisés par les laboratoires d'immunologie granulocytaire: le GAT, le GIFT et le MAIGA. Bien que le GAT et le GIFT permettent de déduire la spécificité de l'anticorps par l'intermédiaire du phénotype HNA des PNN utilisés (systématiquement homozygote pour HNA-1a ou HNA-1b), seul le MAIGA permet une identification formelle.

2.6.1 Le Granulocyte Agglutination Test (GAT)

Le GAT est un test d'agglutination indirect permettant la détection d'anticorps sériques du patient dirigés contre les PNN. Les premières descriptions de ce type de test ont été faites dans les années 1950. Cependant, les phénomènes d'auto-agglutination des PNN et leur mort rapide *in vitro* ont nécessité des ajustements techniques pour mettre en place une technique assez sensible et reproductible pour être utilisée en routine. C'est donc à la fin des années 1970 que cette méthode s'est imposée dans la détection des anticorps anti-PNN (Jiang and Lalezari, 1975).

Le test se déroule en deux phases : des PNN phénotypés de donneurs sont incubés avec le sérum du patient. Les anticorps anti-polynucléaires neutrophiles sensibilisent alors les PNN du donneur. Suite à cette sensibilisation, et par un phénomène de chimiotactisme, les PNN se rapprochent pour former des agglutinats, détectables alors par microscopie optique (**Figure 3**). Cette méthode est très sensible pour la détection des anticorps dirigés contre l'antigène HNA-3a (Lucas et al., 2002). Les images d'agglutination obtenues sont illustrées **Figure 4**.

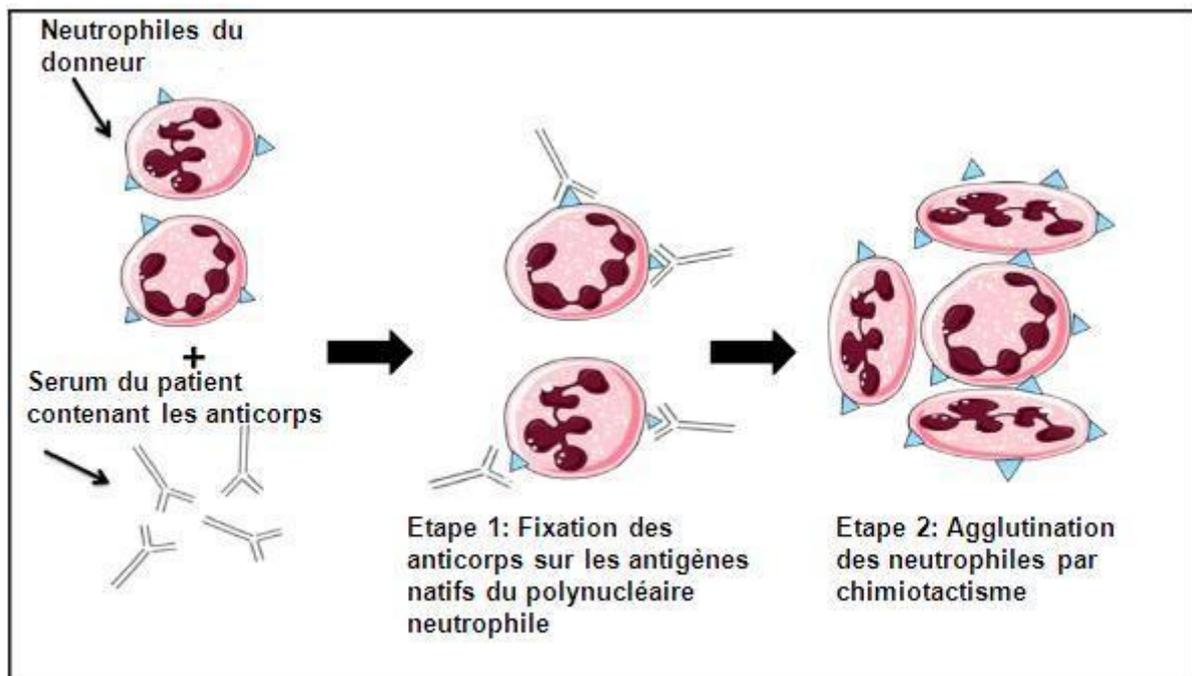


Figure 3 : Principe du Granulocyte Agglutination Test (Autrel-Moignet and Lamy, 2014)

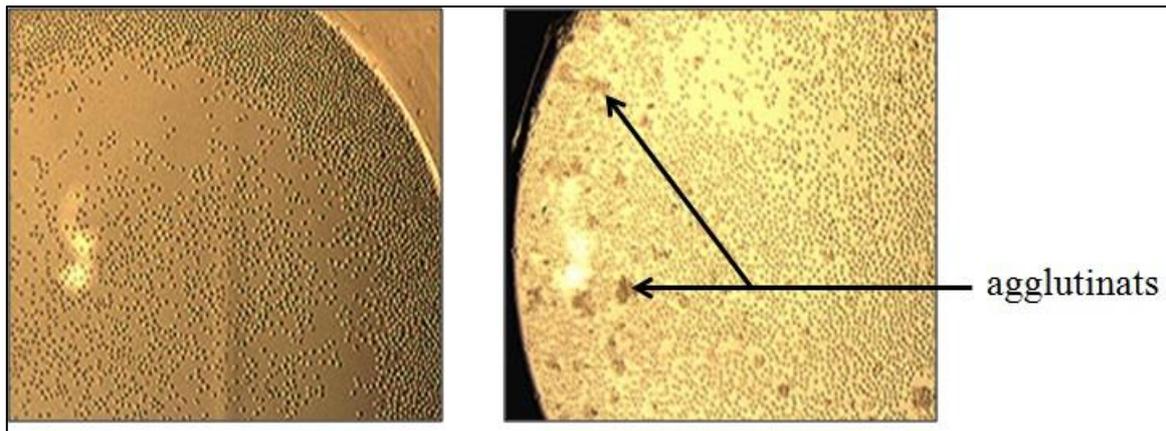


Figure 4: Images d'agglutinations obtenues par GAT. A gauche, réaction négative, à droite réaction positive (Labor für Leukozytenimmunologie - Untersuchungsergebnisse [Internet])

2.6.2 *Le Granulocyte Immunofluorescence Test (GIFT)*

Le GIFT est une méthode très sensible décrite en 1977 (Verheugt et al., 1977), réalisée de manière directe ou indirecte et permettant la mise en évidence d'anticorps anti-PNN mais ne permettant pas de déterminer leur spécificité (**Figure 5**). Cette méthode apparaît cependant plus efficace pour la détection des anticorps anti-HNA-1a, HNA-1b et HNA-2a que le GAT (Lucas et al., 2002).

Pour la méthode indirecte, les PNN fixés d'un donneur sont mis en présence du sérum à tester. Après une étape de lavage, les PNN sont incubés avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, dirigé soit contre une classe d'immunoglobuline ou contre l'ensemble des IgG, IgM et IgA. La détection de la fluorescence peut se faire par microscopie à fluorescence ou bien par cytométrie en flux. Pour la méthode directe, les PNN fixés du patient sont incubés avec un anticorps secondaire anti-immunoglobulines humaines. Le mode de détection est ensuite identique à la méthode indirecte. Cependant, cette dernière méthode peut être limitée par la profondeur de la neutropénie du patient et n'est donc pas utilisée en routine.

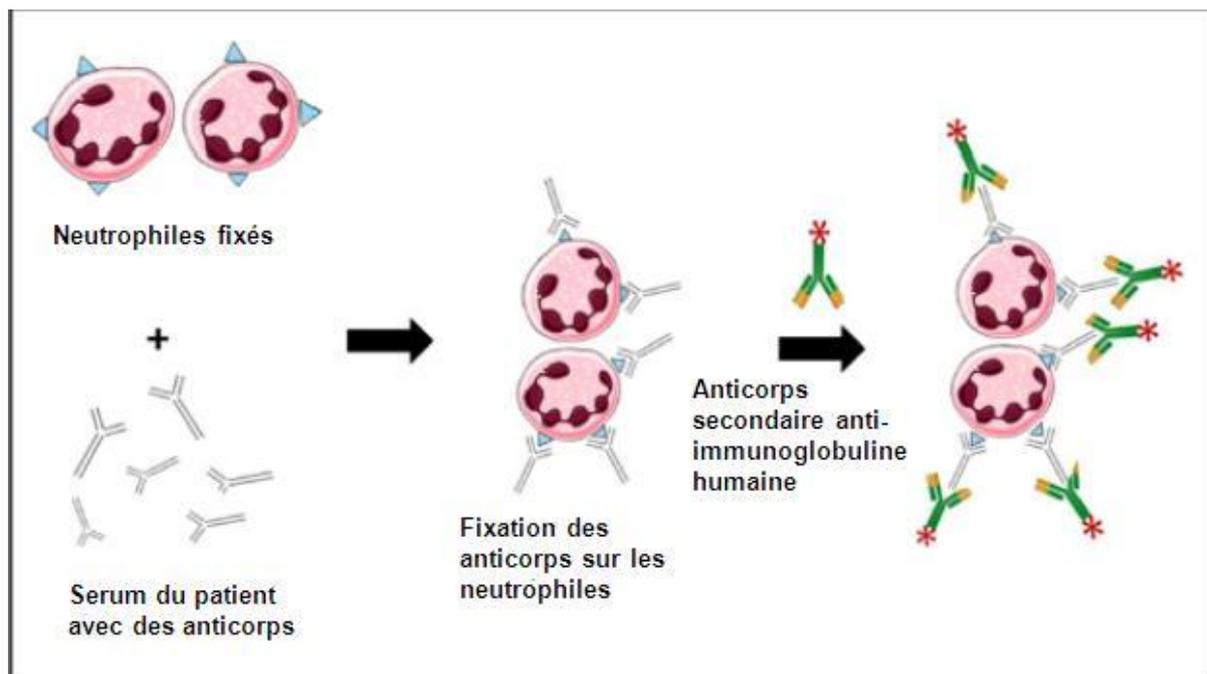


Figure 5 : Principe du Granulocyte Immunofluorescence test (Autrel-Moignet and Lamy, 2014)

2.6.3 *Le Monoclonal Antibody Immobilization of granulocyte-antigens (MAIGA)*

Bien que le GIFT et le GAT permettent la détection des anticorps dirigés contre les PNN, ils ne permettent pas de déterminer formellement leur spécificité antigénique. En 1993, Bux et al. met donc au point une technique dont le principe est calqué sur celui du MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens) : le MAIGA (Bux et al., 1993).

Des PNN phénotypés issus de donneurs sont mis en présence du sérum à tester. Ensuite, un anticorps monoclonal murin dirigé contre la spécificité antigénique recherchée (CD16b, CD177 etc...) est ajouté. Après lyse de la membrane cellulaire, les complexes antigéniques Anticorps murins - Antigène - Anticorps humains du sérum sont transférés dans un puit tapissé d'un anticorps dirigé contre les anticorps murins. Enfin, un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dirigé contre les IgG humaines est ajouté au mélange. La détection se fait par l'ajout d'un substrat devenant coloré lorsqu'il est oxydé par la peroxydase et la mesure de la densité optique au spectrophotomètre. Le choix de l'anticorps murin monoclonal est primordial pour l'interprétation des résultats. En effet, des phénomènes de compétition entre l'anticorps murin et l'anticorps humain possédant la même spécificité antigénique peuvent produire des résultats faussement négatifs. De plus, cette méthode étant moins sensible, il est recommandé de l'associer au GIFT et au GAT pour optimiser les chances de détection des anticorps anti-polynucléaires neutrophiles.

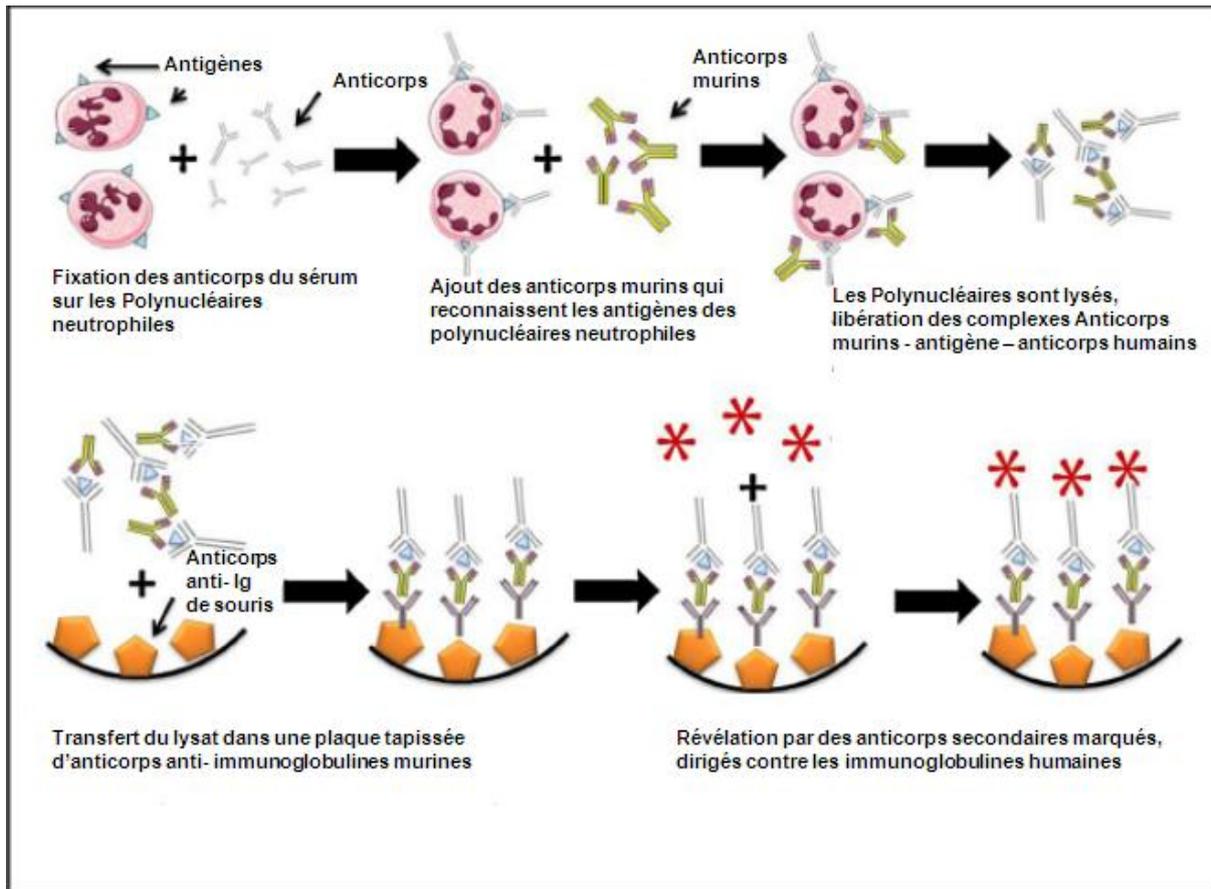


Figure 6: Principe du MAIGA selon (Autrel-Moignet and Lamy, 2014).

2.6.4 Harmonisation des pratiques

La détection des anticorps anti-polynucléaires neutrophiles possède son intérêt dans de nombreuses situations cliniques comme le TRALI, les réactions fébriles transfusionnelles, les neutropénies iatrogènes, les neutropénies néonatales allo-immunes, et les neutropénies auto-immunes de l'enfant et de l'adulte. Cependant, devant le faible nombre de laboratoires, utilisant souvent des techniques « maison », et la difficulté, dans certaines situations, de détection des anticorps, il est apparu nécessaire d'harmoniser les pratiques. C'est pourquoi, des groupes de travail internationaux ont été constitués afin d'essayer d'améliorer les procédures de détection des anticorps.

Les démarches permettant une meilleure détection et caractérisation des anticorps sont les suivantes (Lucas et al., 2002) :

- L'utilisation de deux méthodes de dépistage sur des panels phénotypés HNA pour la détection des anticorps (GIFT et GAT).
- L'utilisation d'une méthode permettant de caractériser la cible antigénique des anticorps dépistés (MAIGA)

- L'utilisation d'une méthode permettant la caractérisation des anticorps anti-HLA de classe I dont la présence peut en effet conduire à des tests de dépistage faussement positif (concerne uniquement les phénomènes d'allo-immunisation)

Dans le cas des neutropénies auto-immunes primitives, le génotypage HNA du patient par PCR SSP permettra également de confirmer le caractère auto-immun de l'anticorps, l'âge de survenue de cette pathologie pouvant parfois être compatible avec une neutropénie néonatale allo-immune.

Au laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes, la démarche retenue pour le dépistage et la caractérisation des anti-PNN dans le cadre d'une suspicion de NAI I est la suivante :

- Test de dépistage indirect des anticorps sériques par GIFT sur 2 PNN : l'un homozygote pour HNA-1a et l'autre homozygote pour HNA-1b. Si cette recherche est négative, elle est contrôlée sur 2 autres PNN également homozygotes HNA-1a ou HNA-1b. Si cette dernière est toujours négative, il est conseillé de contrôler l'absence d'anticorps anti-PNN à 3 mois.
- Si le GIFT est positif, il est reconstruit à l'aide de la même technique sur 2 PNN homozygotes HNA-1a et HNA-1b. Une identification est réalisée par MAIGA en utilisant 2 clones d'anticorps murins dirigés contre le CD16. Si ce dernier est négatif, le GIFT est refait sur 2 PNN et le MAIGA est réalisé en ajoutant d'autres clones CD16. En revanche, s'il est positif, les résultats sont contrôlés à l'aide d'un GIFT sur 2 PNN et un MAIGA.
- Si un anticorps est identifié, et après recueil du consentement. L'ADN est extrait et il est procédé à un génotypage HNA-1 pour préciser le caractère auto-immun de l'anticorps.

2.7 Développement de l'auto-immunité anti-PNN

2.7.1 *Facteurs prédisposant*

Plusieurs travaux ont suggéré des liens entre NAI I et certains facteurs de prédisposition.

Tout d'abord, les infections à parvovirus B19 ont été reliées à la survenue de neutropénies auto-immunes primitives (McClain et al., 1993). En effet, dans sa série, McClain et al. montre la présence d'anticorps anti-polynucléaires neutrophiles anti HNA-1a chez 9 des 12 patients présentant une PCR parvovirus B19 positive dans la moelle. Il suggère alors la

possibilité d'un mimétisme moléculaire à l'origine d'une réaction croisée des anticorps dirigés contre le virus avec les antigènes HNA-1a. Cependant, l'analyse moléculaire des protéines virales et de l'antigène HNA-1a ne permettait pas de mettre en évidence d'homologie structurale significative. De plus, ce lien infectieux ne sera pas retrouvé par Bux et al. (Bux et al., 1998)

En 1991, Bux et al. montre une liaison entre l'auto-immunisation HNA-1a et le phénotype HLA-DR2 (Bux et al., 1991a). Sur sa cohorte de 26 patients, 19 expriment HLA-DR2 (73% contre 35% pour le groupe contrôle). Parmi les patients présentant des anticorps non spécifiques du variant HNA-1a, un seul possédait le phénotype HLA-DR2. D'un point de vue physiopathologique, ce lien paraît cohérent. En effet, le fait que les anticorps anti-HNA-1a soient majoritairement de type IgG montre qu'il y a eu commutation isotypique. Cette commutation isotypique n'est possible que par l'intermédiaire d'une réponse humorale thymo-dépendante impliquant une coopération entre les lymphocytes T CD4+ et lymphocytes B spécifiques du même antigène. La commutation isotypique se fait alors après présentation, par les molécules de CMH-II, de peptides aux lymphocytes B. Les gènes du système HLA permettant de synthétiser les molécules de CMH, il est possible que des peptides portant l'épitope HNA-1a soient présentés par les molécules HLA-DR2.

Plus récemment, Taniuchi et al. montrent chez des patients d'origine japonaise un lien significatif entre le génotype H/H131 du FcγRIIa et la production d'anticorps anti-HNA-1a (Taniuchi et al., 2001). Cependant, cette observation ne sera pas confirmée par Audrain et al. en 2011 (Audrain et al., 2011) dans une cohorte d'origine caucasienne.

Enfin, Wang et al. décrivent également un lien entre neutropénie auto-immune primitive et l'allèle HLA-DQB1*0503 (Wang et al., 2009). La majorité de leurs patients présentant des anticorps anti-HNA-1a (73%) par rapport aux anti-HNA-1b (2%), ces derniers relèvent une immunisation préférentielle vis-à-vis de l'épitope HNA-1a, les fréquences alléliques respectives calculées étant de 0.898 et 0.523.

Les facteurs de prédisposition de la NAI I restent donc assez controversés actuellement. Cependant, ces différentes études permettent de relier certaines interrogations sur l'auto-immunisation préférentielle vis-à-vis de l'épitope HNA-1a par rapport au HNA-1b et ce, indépendamment des différences de répartitions de ces antigènes au sein de la population mondiale.

2.7.2 *Diminution des lymphocytes T régulateurs*

Les cellules Treg sont définies par la co-expression des CD4 et CD25 et du facteur de transcription FOXP3 (Buckner, 2010). Au sein de ces cellules, l'expression de FOXP3 est induite par la liaison du facteur de transcription NFATC2 sur son promoteur (Mantel et al., 2006).

La seule étude réalisée à ce sujet a été publiée en 2010 par Nakamura et al. (Nakamura et al., 2009) et relevait, chez des patients atteints de NAI I, une diminution des lymphocytes doublement marqués CD4 et CD25 et une diminution de l'expression intracellulaire de FOXP3 et de NFATC2 dans cette population cellulaire. Cependant, du fait de la méthode d'isolement utilisée n'excluant pas les monocytes et un panel d'anticorps n'utilisant pas un nombre de marqueurs suffisants pour caractériser une population de lymphocytes T régulateurs, il est nécessaire de modérer ces observations. De plus, seule la moitié des patients présentaient des anticorps anti-HNA-1 (les autres des anticorps pan-CD16) ce qui peut constituer un biais de recrutement.

Finalement, Il est possible que ces observations et interprétations soient erronées concernant cette diminution des lymphocytes T régulateurs. Il convient donc de rester modéré par rapport aux conclusions prises sur l'implication du système T régulateur dans le développement de la NAI I

2.8 Rôle des auto-anticorps

La production d'anticorps dirigés contre les PNN joue un rôle prépondérant dans l'induction de la neutropénie observée au cours de la NAI-I (Nepo et al., 1975). Les études ont montré que ces auto-anticorps sont principalement d'isotype IgG (Bux et al., 1998). Il existe 4 sous-classes d'IgG numérotées de 1 à 4 en fonction de leur abondance dans le sérum et dont les propriétés effectrices sont différentes.

2.8.1 *Structure et propriétés effectrices des différentes sous-classes d'immunoglobulines G.*

Structure

D'un point de vue structural, les IgG sont des monomères constitués de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (H) d'isotype γ_1 γ_2 γ_3 ou γ_4 selon la sous-classe et faisant environ 50kDa et 2 chaînes légères d'isotype κ ou λ d'environ 25kDa. Au sein d'un monomère d'IgG donné, les chaînes lourdes sont identiques de même que les chaînes légères. Chaque chaîne est organisée en domaine immunoglobuline, les chaînes lourdes en

comprenant 4, un variable (VH) et 3 constants (CH1, CH2, CH3), avec une région charnière entre CH1 et CH3. Les domaines CH2 et CH3 forment le fragment Fc de l'immunoglobuline, qui en assure les propriétés effectrices. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine variable (VL) et d'un domaine constant (CL). Les chaînes lourdes sont chacune associées à une chaîne légère par des ponts disulfures et sont également associées entre elles. Le rapprochement des domaines variables des chaînes lourdes et légères forment le site de reconnaissance antigénique de l'IgG. Chaque monomère d'IgG présente donc 2 sites de reconnaissance de l'antigène rigoureusement identiques. Les 2 ensembles CH1, VH, CL, VL forment le fragment Fab (Fragment antigen-binding), séparé du fragment Fc après digestion par la papaine (**Figure 7**).

Il existe peu de différences structurales entre les sous classes d'IgG (environ 90% d'homologie). La région charnière des IgG1, d'une taille à peu près équivalente à celle des IgG4, est plus longue que celle des IgG2 ce qui lui confère une plus grande flexibilité. Les IgG3 ont la région charnière la plus grande de toutes les sous-classes et ces dernières sont remarquables du fait de leur grande flexibilité alors que les IgG2 sont beaucoup plus rigides. Cette plus grande flexibilité confère alors une meilleure affinité des IgG3 aux récepteurs Fc.

Le nombre de ponts disulfures reliant les deux chaînes lourdes de chaque immunoglobuline diffère également en fonction des sous-classes. En effet, les IgG1 et 4 n'en possèdent que 2, ils sont au nombre de 4 pour les IgG2 et 11 pour les IgG3. A ce sujet, on peut également noter la particularité des IgG2 de posséder, sous certaines formes, des ponts disulfures reliant une chaîne lourde et une chaîne légère. Les IgG4 ont quant à elles tendance à former des ponts disulfures intra-chaînes plutôt qu'inter-chaînes. Les liaisons inter-chaînes sont alors souvent non covalentes et donc moins stables. Dans certaines conditions, il peut exister alors des phénomènes d'échanges entre 2 monomères d'IgG4 de spécificité différente, pouvant former une IgG4 bi-spécifique.

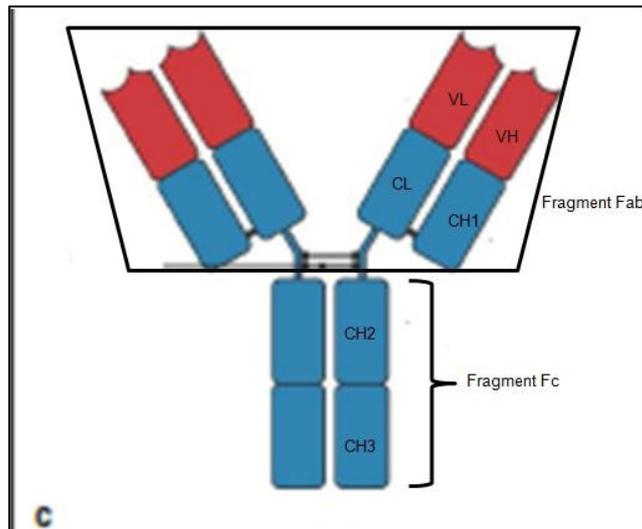


Figure 7 : Structure générale d'une immunoglobuline G (Murphy et al., 2012)

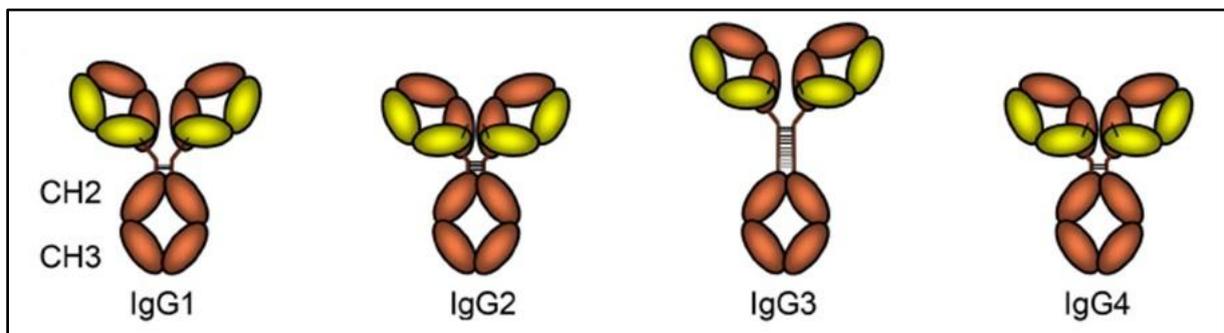


Figure 8: Représentation schématique des 4 sous classes d'immunoglobulines G (Vidarsson et al., 2014)

Propriétés effectrices

Neutralisation des agents pathogènes

Les immunoglobulines ont la capacité de neutraliser les toxines ou les agents pathogènes et notamment les virus. Ainsi, les IgG peuvent bloquer l'entrée d'un virus dans sa cellule cible en l'empêchant d'interagir avec ses récepteurs cellulaires spécifiques (par exemple anticorps anti-hémagglutinine du virus de la grippe). De plus, en bloquant certaines toxines, les IgG spécifiques de ces dernières peuvent prévenir leurs effets délétères. Globalement, toutes les sous-classes d'IgG ont un potentiel de neutralisation équivalent (Murphy et al., 2012).

Opsonisation

Dans certains cas, la seule neutralisation d'un pathogène n'est pas suffisant pour empêcher son développement. Alors que pour les virus et les toxines bactériennes, un simple

blocage par les IgG peut permettre d'empêcher leurs effets délétères, pour un grand nombre de bactéries cet effet n'est pas assez efficace. Les IgG, en reconnaissant les antigènes de certains agents pathogènes, vont tapisser sa surface et permettre, après reconnaissance de ces IgG par leurs récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules phagocytaires, son ingestion et sa destruction. Ce phénomène est alors appelé opsonisation. Parmi les différentes sous-classes d'IgG, les IgG1 et les IgG3 sont les plus efficaces pour cette fonction.

Activation de la voie classique du complément

L'activation du complément par la voie classique est initiée par la fixation du C1q. Cette activation aboutit au dépôt de C3b sur le pathogène ciblé et permet son opsonisation puis sa phagocytose via ses récepteurs spécifiques présents à la surface des phagocytes. L'activation du complément aboutit également à la formation du complexe d'attaque membranaire. Formé des fractions C5 à C9, il permet la désorganisation de la membrane et la lyse de la cellule ou du pathogène ciblé (**Figure 9**). Les IgG1 et IgG3 sont les plus efficaces pour initier cette activité par rapport aux IgG2 et IgG4.

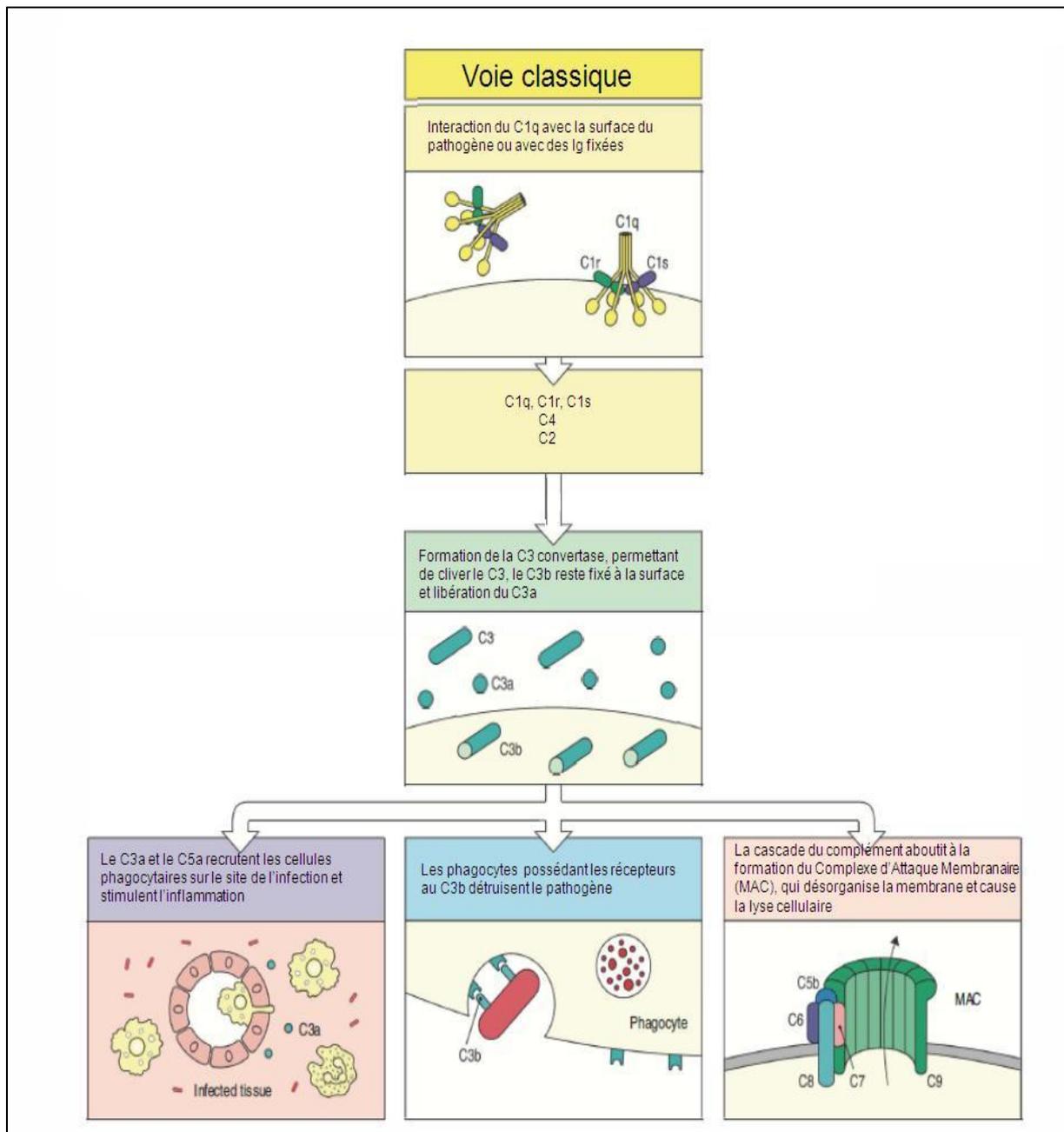


Figure 9: Principales conséquences de l'activation de la voie classique du complément (Murphy et al., 2012)

ADCC (Antibody Cellular Dependant Cytotoxicity)

Le phénomène d'ADCC est initié lorsqu'un anticorps fixé à la surface d'une cellule interagit avec les récepteurs FcγIII des cellules NK (**Figure 10**). Le mécanisme est alors analogue à celui utilisé par les lymphocytes T cytotoxiques pour détruire leur cellule cible. Une fois le Fragment Fc de l'anticorps reconnu par son récepteur spécifique sur le lymphocyte NK, ce dernier relargue le contenu de ses granulations cytoplasmiques, riches en perforine et granzyme permettant d'une part d'augmenter la perméabilité membranaire, et d'autre part l'activation de caspases qui permettent d'induire l'apoptose de la cellule ciblée.

Ce mécanisme est impliqué notamment dans l'immunité anti-virale et anti-tumorale et permet à des anticorps de recruter des cellules effectrices dépourvues de spécificité pour l'antigène ciblé. Les IgG1 et les IgG3 sont les plus efficaces pour initier les mécanismes d'ADCC.

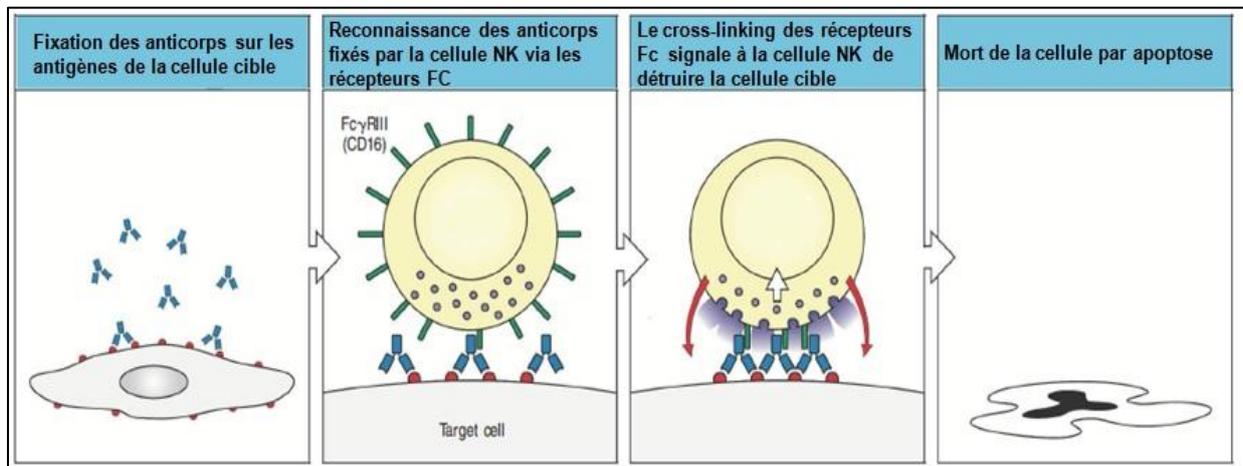


Figure 10: Mécanisme de l'Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity ou ADCC (Murphy et al., 2012)

Affinité vis à vis des récepteurs Fc

Conformément à ce qui a été mentionné plus haut, certaines fonctions effectrices importantes des IgGs nécessitent leur interaction avec les récepteurs pour le fragment Fc γ (Fc γ Rs). Il en existe plusieurs types qui se différencient par leur niveau d'expression en fonction des types cellulaires et de leurs rôles physiologiques. Le Fc γ RI lie toutes les sous classes d'IgG à l'exception des IgG2. Ce récepteur, présent sur les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles et les cellules dendritiques, induit la phagocytose et l'explosion oxydative.

Le Fc γ RIIa est un récepteur exprimé sur les macrophages, les neutrophiles et éosinophiles, les plaquettes et les cellules de Langerhans et est impliqué dans les phénomènes de phagocytose et de dégranulation. Sa particularité est de lier assez efficacement les IgG2 comparé aux autres récepteurs des immunoglobulines. Cependant, les IgG3 et les IgG1 restent les plus affines sur ce récepteur (Vidarsson et al., 2014).

Les Fc γ RIIb et IIC sont des récepteurs possédant des domaines intracellulaires ITIM à activité inhibitrice et présentent une faible affinité aux immunoglobulines. Leur affinité est similaire vis à vis des IgG1, IgG3 et IgG4 mais plus faible vis-à-vis des IgG2.

Enfin, Les Fc γ RIII sont des récepteurs de forte affinité pour les IgG1 et IgG3 et d'affinité quasi-nulle pour les IgG4 et IgG2. Situé sur les macrophages et les cellules NK, le

Fc γ RIIIa est impliqué dans les phénomènes d'ADCC des lymphocytes NK (**Figure 10**). Les fonctions du Fc γ RIIIb ont été décrites précédemment au 2.1.3.

Les propriétés effectrices sont donc largement influencées par les sous-classes produites dans une réponse immunitaire, et il est possible que le profil des sous-classes impliquées dans la neutropénie auto-immune primitive permette de mieux comprendre le mécanisme de destruction des PNN.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Général				
Masse moléculaire (kD)	146	146	170	146
Taux moyen chez l'adulte (g/l)	6,98	3,8	0,51	0,56
Abondance relative (%)	60	32	4	4
Demi-vie (j)	21	21	7 à 21	21
Transfert placentaire	++++	++	++++	+++
Réponse vis-à-vis				
Protéines	++	+/-	++	++
Polysaccharides	+	+++	+/-	+/-
Allergènes	+	(-)	(-)	++
Activation du complément				
Fixation du C1q	++	+	+++	-
Affinité vis-à-vis des récepteurs Fc				
Fc γ RI	+++	-	++++	++
Fc γ RIIIa	+++	++ OU +	++++	++
Fc γ RIIIb/c	+	-	++	+
Fc γ RIIIa	++	-	++++	- OU ++
Fc γ RIIIb	+++	-	++++	-

Tableau 4 : Résumé des propriétés des sous-classes d'immunoglobulines

2.8.2 *Actions connues des auto-anticorps dans la neutropénie auto-immune primitive*

Depuis leur caractérisation, peu d'études se sont intéressées au mécanisme précis de destruction des polynucléaires neutrophiles dans la NAI I. Les 3 principales hypothèses avancées sont principalement une phagocytose par les macrophages, une lyse par le complément ou bien une lyse par ADCC. Actuellement, 3 études ont essayé de caractériser le mode de destruction des PNN dans les neutropénies auto-immunes. Cependant, il est important de noter que ces études ne se limitaient souvent pas à l'étude des NAI I seules et incluaient souvent des patients atteints également de NAI II, ce qui peut conduire à des interprétations biaisées.

La phagocytose a été un des premiers mécanismes exploré, et est considéré aujourd'hui comme le mécanisme prédominant de destruction des polynucléaires neutrophiles. Nepo et al. a été le seul à démontrer l'activité opsonisante du sérum d'une patiente atteinte de NAI I en sensibilisant des PNN de donneurs « poolés » par le sérum de cette patiente, après mesure de réduction du nitrobleu de tetrazolium après mise en présence de ces PNN opsonisés avec des macrophages alvéolaires purifiés, il arrive à montrer une activité opsonisante du serum testé (Nepo et al., 1975). Cependant, il convient de préciser que la nature des anticorps, ni la cible de ces anticorps n'était connue à l'époque, de même que ce test fonctionnel n'a été effectué que sur une patiente

L'activité cytotoxique a ensuite été plus largement étudiée. Dans leurs travaux, Bux J. et al. trouvaient alors sur 30 sérums testés une activation de la voie classique du complément par détection du dépôt de C3d à la surface de PNN opsonisés, et une lyse de ces cellules par un test calqué sur le principe de microlymphocytotoxicité mais optimisé pour des granulocytes (**Figure 11**). Cependant, il convient de préciser que cette étude portait sur des patients atteints de neutropénies autoimmunes secondaires et primitives, et que l'origine des sérums testés n'était pas non plus précisée (Bux et al., 1991b). En revanche, Nepo et al. ont testé également sur une seule patiente atteinte de NAI I l'activité cytotoxique du sérum par mesure du relargage de ^{51}Cr sur des PNN chargés en ^{51}Cr puis mis en présence de sérum non décomplémenté : ils ne retrouvaient pas alors d'activité cytotoxique. Enfin, Durand V. et al. ont étudié les effets des anticorps anti-Fc γ RIIIb et n'ont pas retrouvé de lyse par le complément. Il est à noter cependant que ces derniers évaluaient les effets des anticorps pan-CD16, les épitopes ciblés pouvant être différents du HNA-1a ou HNA-1b. La principale limite de cette dernière étude réside dans la cohorte de patients étudiée, qui incluait des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de lupus systémique (Durand et al., 2001). Globalement, l'activité lytique du complément dans les neutropénies autoimmunes reste donc controversée.

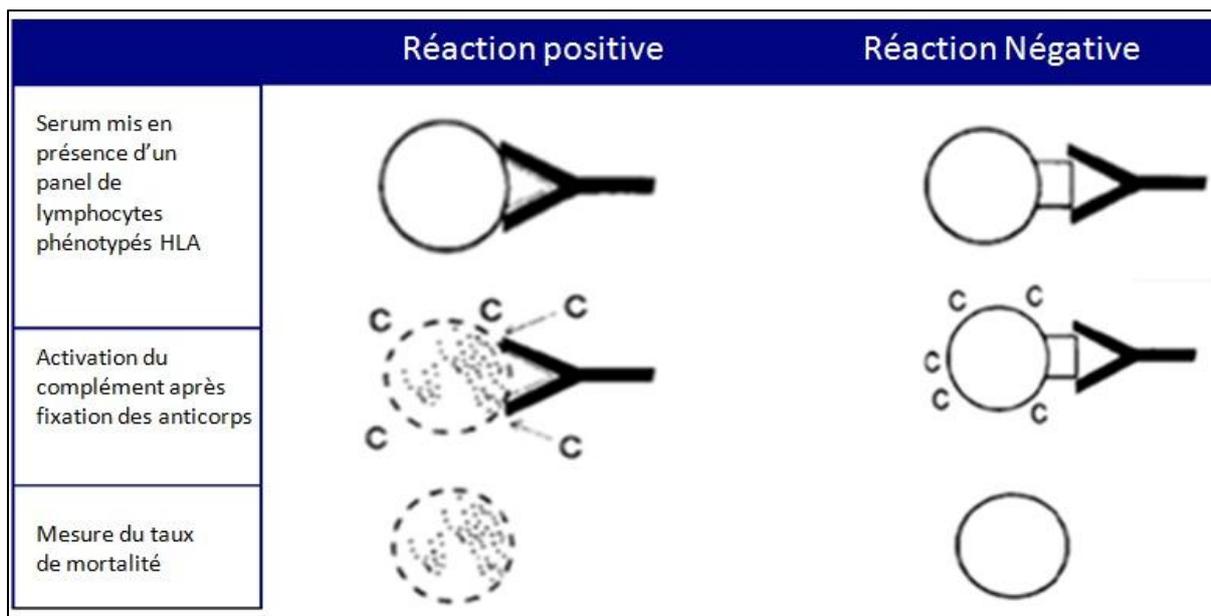


Figure 11: Schéma représentatif du principe des tests de microlymphocytotoxicité (Sun and Xi, 2014).

L'étude des sous-classes d'IgG n'a été effectuée que par Bux. J. et al. Et retrouvait des IgG1 sur les 30 serums testés et des IgG3 sur 23 d'entre eux. Aucun n'était positif pour les IgG2 ou IgG4. Les limites de l'étude étaient identiques à celles citées ci-dessus et il convient de préciser que la recherche ayant été effectuée par microscopie à fluorescence, il est possible que la sensibilité de la méthode n'eût pas été suffisante pour la mise en évidence de certaines sous-classes présentes à un taux plus faible.

Les impacts fonctionnels de la production d'anticorps contre les PNN ont également été étudiés. Nepo et al. montraient alors que les polynucléaires, après incubation avec le sérum d'une patiente atteinte de NAI I, présentait un déficit de phagocytose. Plus récemment, Durand V. et al. trouvaient une explosion oxydative et une adhérence réduite chez les polynucléaires neutrophiles opsonisés par des anticorps anti-CD16. Ils démontrent également une diminution de l'apoptose spontanée des PNN sensibilisés par ces mêmes anticorps, suggérant que le pontage du FcγRIIIb pourrait favoriser la survie des polynucléaires neutrophiles.

Les actions des auto-anticorps anti-FcγRIIIb sur les polynucléaires neutrophiles et les mécanismes par lesquels ils participent à l'établissement de la neutropénie sont donc globalement peu connus et controversés (**Figure 12**). L'analyse de ces différentes études montre que les mécanismes de destruction des polynucléaires neutrophiles au cours des NAI restent peu clairs. Ces travaux étudient en effet ces mécanismes dans leur globalité en incluant souvent des patients atteints de NAI II et de NAI I sans distinction. Or, les différences

observées dans ces 2 types de NAI, aussi bien en terme de population touchée que de spécificité des anticorps produits, suggèrent que la physiopathologie soit radicalement différente et que les conclusions de ces études puissent ne pas s'appliquer à la NAI I. Il est également possible que les conclusions apportées par certaines études sur les neutropénies autoimmunes primitives puissent être mises à jour, certaines méthodes utilisées pouvant montrer un défaut de sensibilité par rapport aux techniques actuelles (GIFT en microscopie optique par rapport à la cytométrie en flux par exemple).

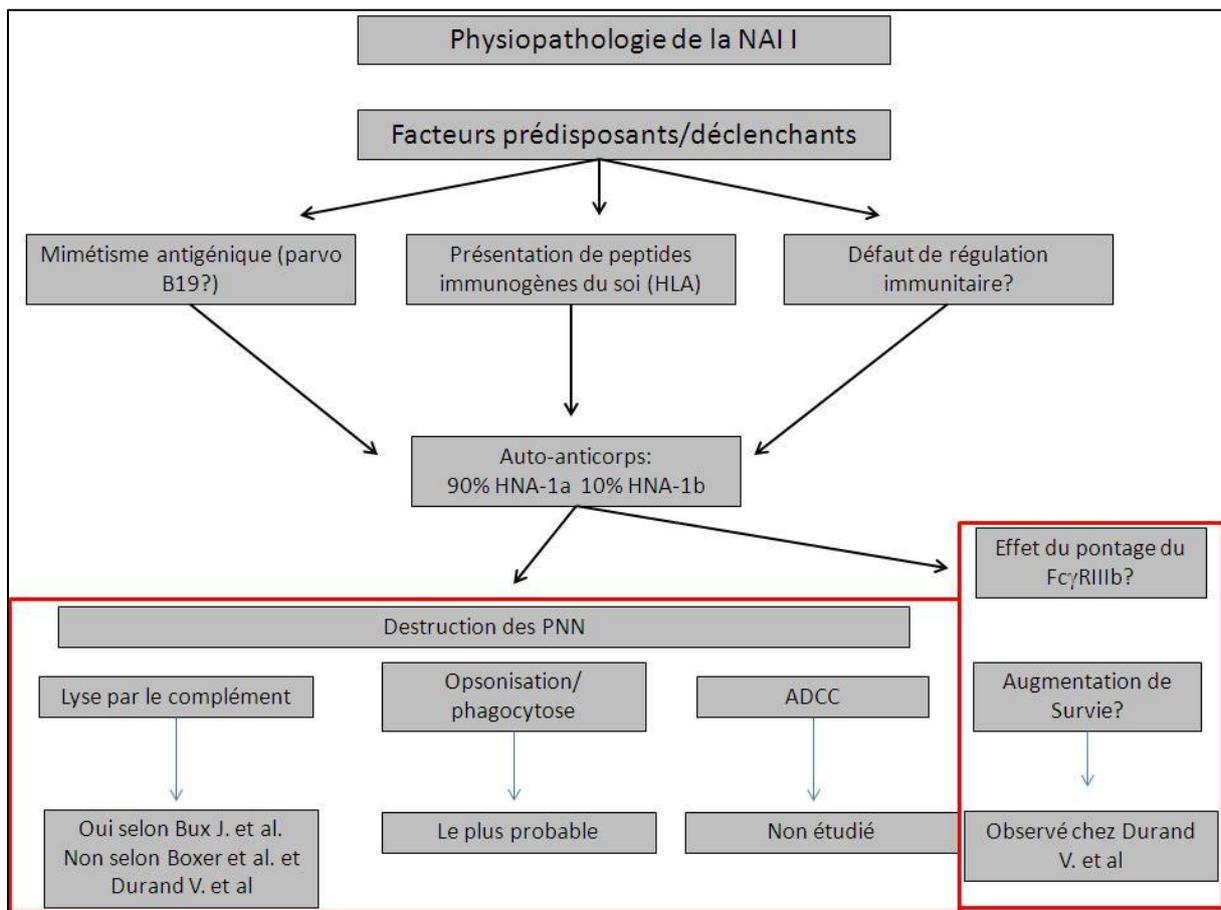


Figure 12 : Schéma synthétique des différents mécanismes intervenant dans le développement de la NAI I et des éventuels effets des anticorps produits.

Objectifs

Globalement, les travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui sur la NAI I ont permis de définir cette pathologie comme une entité claire et bien différenciée des NAI II. En effet, les études ont montré qu'elle touchait principalement les jeunes enfants, ces derniers produisant le plus souvent des anticorps spécifiquement dirigés contre l'antigène HNA-1a ou HNA-1b. Les NAI II quant à elles peuvent toucher aussi bien les adultes que les enfants, sont associées à des contextes cliniques particuliers (maladie auto-immunes ou hématologiques) et les cibles des anticorps sont beaucoup plus variées. Il est également possible de s'interroger sur les conclusions de certains travaux menés sur la physiopathologie des NAI. En effet, alors que NAI I et NAI II sont bien individualisées sur le plan clinique, les quelques études effectuées sur leur physiopathologie, et notamment sur le mécanisme de destruction des polynucléaires neutrophiles confondaient souvent ces deux populations de patients ce qui pouvait constituer un biais.

L'analyse des récentes études effectuées spécifiquement sur la NAI I a permis de soulever des problématiques qui restent actuellement inexplicées car non étudiées. En effet, alors que l'antigène HNA-1b est plus fréquent que l'antigène HNA-1a au sein de la population, les anticorps anti-HNA-1b ne sont retrouvés que dans une minorité de cas de NAI I, suggérant une immunogénicité plus faible. Il est par conséquent possible également de s'interroger sur la présence éventuelle de différences, sur le plan clinique ou physiopathologique des NAI I avec anticorps anti-HNA-1a ou anti-HNA-1b.

Ce travail a donc pour objectif de comparer deux catégories de patients atteints de neutropénie autoimmune primitive : ceux produisant des anticorps anti-HNA-1a et ceux produisant des anticorps anti-HNA-1b. Afin d'y parvenir, cette comparaison portera sur 2 grands axes : le versant clinico-biologique, et le versant physiopathologique. Cette approche aura pour but d'éclaircir le mode de destruction des PNN dans la NAI-I, ainsi que d'étudier les potentielles différences physiopathologiques existantes entre les patients produisant des anticorps dirigés contre l'antigène HNA-1a ou HNA-1b

1 Etude clinico-biologique

Elle consiste en une étude rétrospective clinico-biologique des dossiers adressés au laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes en vue d'une recherche d'anticorps anti-polynucléaire neutrophiles afin de mettre en évidence un éventuel impact clinique du développement d'anticorps anti-HNA-1a ou HNA-1b.

2 Etude physiopathologique

Le versant physiopathologique sera constitué d'une étude complémentaire des sérums de ces patients. Elle repose sur 3 principaux axes d'étude:

- l'étude des sous-classes d'immunoglobulines G produites chez ces patients ;
- l'étude de l'activation et de la lyse dépendante du complément des PNN opsonisés par des anticorps anti-HNA-1a ou HNA-1b ;
- l'étude de la survie des PNN opsonisés par ces auto-anticorps.

L'étude clinico-biologique complétée par le versant physiopathologique permettra de mettre en évidence les différences observables chez ces deux catégories de patients et d'essayer d'expliquer certaines interrogations récemment soulevées dans la littérature, notamment vis-à-vis du développement préférentiel des anticorps anti-HNA-1a par rapport aux anti-HNA-1b.

Matériel et méthodes

1 Constitution des groupes de patients

Cette étude porte sur les dossiers adressés au CHU de Nantes entre Octobre 2002 et Avril 2015 pour recherche d'anticorps anti-polynucléaires neutrophiles dans le cadre du dépistage d'une neutropénie autoimmune. Après interrogation de la base de données des analyses effectuées du laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes, étaient sélectionnés les dossiers pour lesquels il a été conclu formellement à la présence d'auto-anticorps dirigés spécifiquement contre le variant HNA-1a ou HNA-1b.

Les critères d'inclusion étaient :

- Positivité du test de dépistage GIFT ;
- Positivité du GIFT et spécificité anti-HNA-1a ou anti-HNA-1b confirmée par le test de MAIGA ;
- Caractère auto-immun de l'anticorps confirmé par le génotypage HNA des PNN par PCR ;
- Absence de maladie immunologique ou hématologique connue
- Absence de médicament (hors antibiotiques si administrés après la découverte de la neutropénie)

Les patients sélectionnés étaient ensuite divisés en 2 catégories : les patients présentant des auto-anticorps dirigés contre l'isotype HNA-1a (31 patients) et ceux dirigés contre le l'isotype HNA-1b (14 patients).

2 Etude clinico-biologique

Après analyse des dossiers et relecture des feuilles de renseignements cliniques joints aux prélèvements lors de la demande d'analyse, il a été relevé les données cliniques suivantes en fonction de leur disponibilité :

- Age au moment du prélèvement
- Les notions d'infections
- Le type d'infections développées (ORL, digestif, cutanées, urinaire, pulmonaire, génital et autres)

Il a également été relevé quelques données biologiques pour compléter l'analyse :

- Le taux de polynucléaires neutrophiles le jour de l'analyse
- Le taux le plus bas documenté de polynucléaires neutrophiles

3 Réactifs utilisés

Plusieurs réactifs ont été utilisés pour ce travail :

- Dextran 6%, from *Leuconostoc sp.* (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, Missouri) ;
- PBS isotonique (Sigma Life Science®);
- Milieu de séparation des lymphocytes, (PAA®, Linz, Autriche);
- Solution d'hémolyse froide, (Eurobio®, Courtaboeuf, France) ;
- EDTA disodium salt dihydrate, (Sigma-Aldrich®) ;
- PFA 4% (Electron Microscopy Sciences®, Hatfield, Pennsylvanie);
- BSA (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, Missouri) ;
- SAB (Biowest®, Nuaille, France) ;
- Tampon veronal (Virion/Serion®, Würzburg, Allemagne) ;
- RPMI (Invitrogen®, Carlsbad, CA) ;
- DAPI (Sigma-Aldrich®) ;
- Complément de Lapin (Sigma-Aldrich®) ;
- Anti-IgG humaines marquées au FITC (Jackson Immuno Research ®, West Grove, Pennsylvanie) ;
- Anticorps murins anti-sous-classes d'IgG humaines (SouthernBiotech®, Birmingham, Alabama) ;

4 Etude physiopathologique

4.1 Isolement et préparation des polynucléaires neutrophiles

L'isolement des PNN était réalisé à partir de sang total de donneurs volontaires phénotypés pour le système HNA-1 prélevés à l'Etablissement Français du Sang de Nantes. Selon la méthode suivante :

1. Séparation des leucocytes par ajout de Dextran 6% en PBS isotonique au sang total prélevé. Puis sédimentation pendant 20 minutes
2. Séparation des lymphocytes par dépôt du surnageant sur un milieu de séparation des lymphocytes (LSM) puis centrifugation
3. Elimination du surnageant, ajout d'une solution d'hémolyse froide au culot constitué des granulocytes et de globules rouges résiduels
4. Lavage à 2 reprises en PBS-EDTA 1 mM

5. Après reprise dans 5mL de PBS-EDTA, une numération est effectuée sur l'appareil SYSMEXTM-800i pour ajuster la concentration en fonction des besoins de la technique

Uniquement pour l'étude des sous-classes d'immunoglobulines G, il était procédé à une fixation au paraformaldéhyde (PFA) selon la procédure suivante :

1. Après centrifugation et élimination du surnageant, ajout de PFA 1% en PBS et incubation 5 minutes
2. 3 lavages en PBS-BSA 0.2%
3. Après élimination du surnageant, ajustement de la concentration à 10.10^6 cellules/mL par ajout de PBS-EDTA.

4.2 Typage des sous-classes d'immunoglobulines G

Il était procédé au typage des sous-classes d'immunoglobulines G de tous les patients inclus dans l'étude, méthode basée sur le GIFT en cytométrie en flux :

1. Le plan de plaque était préparé préalablement à la manipulation (**Tableau 5**)
2. 40 μ L de la suspension de granuleux fixés à une concentration de 10.10^6 cellules/mL étaient déposés dans une plaque à fond en U (soit 400 000 cellules) puis incubés 30 minutes à 37°C en présence du sérum du patient à tester
3. Après 3 lavages en PBS-EDTA 100 μ L d'anticorps marqués étaient ajoutés à chacun des puits puis incubés 30 minutes à température ambiante.
 - Les anticorps anti-immunoglobulines G polyvalentes étaient des anticorps murins dirigés contre le fragment F(ab')₂ des immunoglobulines G et marqués au FITC. Ces derniers étaient utilisés à une dilution de 1/100^e dans du PBS-EDTA
 - Les anticorps anti-sous-classes d'immunoglobulines G étaient des anticorps murins monoclonaux dirigés contre le fragment Fc de chacune des sous-classes et marqués à la phycoerythrine. Ces derniers étaient utilisés à une dilution de 1/50^e dans du PBS-EDTA
4. Après un dernier lavage, le contenu de chaque puit était transféré dans un tube à hémolyse pour lecture sur le cytomètre BD FACSCantoTM II. L'acquisition était stoppée lorsque 3000 évènements étaient passés dans la fenêtre de morphologie

Anti-IgG1	Anti-IgG2	Anti-IgG3	Anti-IgG4	Anti-IgG
Patient 1				
Patient 2				
Patient 3				
Patient 4				
SAB	SAB	SAB	SAB	SAB

Tableau 5 : Exemple de plan de plaque utilisé pour la technique de typage des sous classes d'immunoglobulines G (l'anti-IgG correspondait au témoin positif, le SAB permettant de déterminer le seuil de positivité)

La lecture au moment du passage des tubes était réalisée à l'aide du logiciel BD FACSDiva™ puis les données étaient enregistrées sur le réseau du laboratoire d'Immunologie. Ensuite, une analyse plus fine était effectuée à l'aide du logiciel Flowjo™ en vue de déterminer les médianes de fluorescence de chacun des puits. Un ratio des médianes de fluorescence Patient/SAB de la sous-classe testée était calculé : un ratio supérieur ou égal à 2 correspondait à un résultat positif.

4.3 Etude de lyse par le complément

Après étude des sous-classes, 8 sérums de patients du groupe HNA-1a et 6 sérums de patients du groupe HNA-1b ont été sélectionnés pour l'étude de lyse par le complément. Les patients étaient choisis de manière à constituer un échantillon représentatif de chacun des groupes. Les sérums utilisés étaient préalablement décomplémentés par chauffage à 56°C pendant 30 minutes au bain-marie.

Le mode opératoire était le suivant (**Figure 13**) :

1. 200 µL d'une suspension de polynucléaires neutrophiles à 1.10^6 /mL en solution RPMI purifiés et non fixés au PFA (soit 200 000 cellules) étaient déposés au fond d'une plaque à fond en V.
2. Après centrifugation et élimination du surnageant, les granuleux étaient resuspendus dans 25µL de sérum ou de SAB puis incubés pendant 30 minutes à température ambiante.

3. Après 2 lavages au PBS-BSA 1%, 25µL d'une solution de complément de lapin diluée au 1/3 dans du tampon véronal était ajoutée à tous les puits. Le tout était ensuite incubé 30 minutes à 37°C
4. Après 2 autres lavages, les granuleux étaient resuspendus dans 200 µL de PBS-EDTA puis transférés dans des tubes à hémolyse.
5. Après ajout de 2µL de DAPI (marqueur de mortalité), la lecture était effectuée par cytométrie en flux sur l'appareil BD FACSCanto™ II. L'acquisition était stoppée lorsqu'au moins 10000 évènements étaient enregistrés.

Le DAPI est une molécule fluorescente reconnaissant les acides nucléiques. L'augmentation de perméabilité causée par la lyse des cellules par le complément permet l'entrée du DAPI dans la cellule morte et son association à l'ADN, rendant la cellule fluorescente. La fluorescence émise est alors détectable par cytométrie en flux à l'aide du canal Pacific blue™ du BD FACSCanto™ II.

L'analyse préalable était effectuée à l'aide du logiciel BD FACSDiva™ puis les données étaient enregistrées sur le réseau du laboratoire d'Immunologie. Ensuite, une analyse plus fine était effectuée à l'aide du logiciel Flowjo™ afin de déterminer les pourcentages de cellules mortes et vivantes au moment de l'analyse.

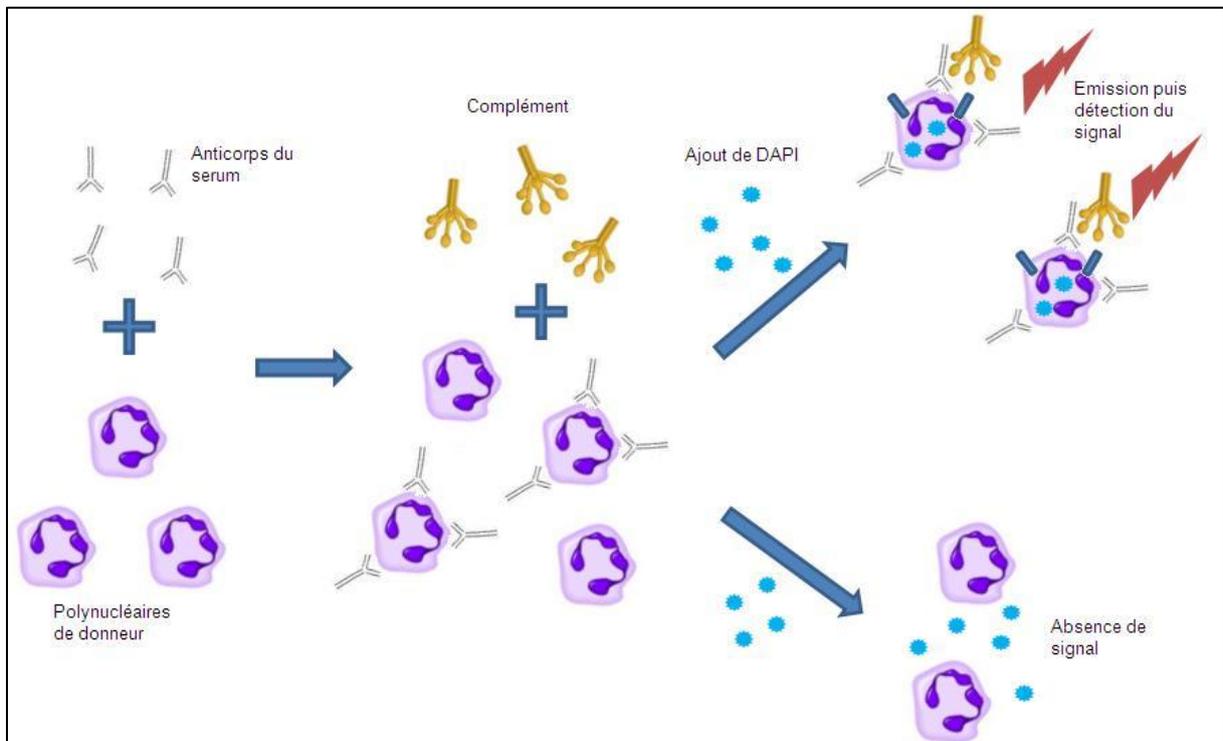


Figure 13: Principe de la technique utilisée pour la lyse par le complément

4.4 Etude du dépôt de C3c

Afin d'évaluer l'activation du complément par les anticorps, le dépôt de C3c à la surface de polynucléaires neutrophiles sensibilisés a également été étudié (**Figure 14**). Les sérums sélectionnés pour cette étude étaient les mêmes que ceux utilisés pour l'étude de lyse par le complément. La source de complément utilisée était un sérum provenant d'un donneur volontaire.

Le mode opératoire était le suivant :

1. 200 μ L d'une suspension de Polynucléaires neutrophiles à 1.10^6 /mL en solution RPMI purifiés et non fixés au PFA (soit 200 000 cellules) étaient déposés au fond d'une plaque à fond en V.
2. Après centrifugation et élimination du surnageant, les granuleux étaient resuspendus dans 25 μ L de sérum ou de SAB puis incubés pendant 30 minutes à température ambiante.
3. Après 2 lavages au PBS-BSA 1%, 25 μ L d'une solution de complément humain diluée au 1/3 dans du tampon véronal était ajoutée à tous les puits. Le tout était ensuite incubé 30 minutes à 37°C
4. Après élimination du surnageant, les polynucléaires neutrophiles étaient resuspendus dans une dilution au 1/100^e en PBS-EDTA d'immunoglobulines de souris anti-C3c humain non marquées puis incubés 15 minutes à température ambiante.
5. Après 2 lavages en PBS-BSA 1%, un anticorps secondaire de lapin, dilué au 1/100^{ème} en PBS-EDTA, dirigé contre les immunoglobulines de souris et marqué au FITC était ajouté dans chacun des puits.
6. Après 2 lavages en PBS-BSA 1%, le culot était repris dans 200 μ L de PBS-EDTA puis transféré dans des tubes à hémolyse pour lecture.

Pour le témoin négatif, la procédure était identique mais prévoyait de remplacer le sérum à tester par du SAB.

La lecture était effectuée sur BD FACSCantoTM II après ajout de 2 μ L de DAPI et l'acquisition stoppée au bout de 10000 évènements totaux. Après une première analyse effectuée sur BD FACSDivaTM, les résultats étaient enregistrés sur le réseau du CHU de Nantes puis réanalysés à l'aide du logiciel FlowjoTM.

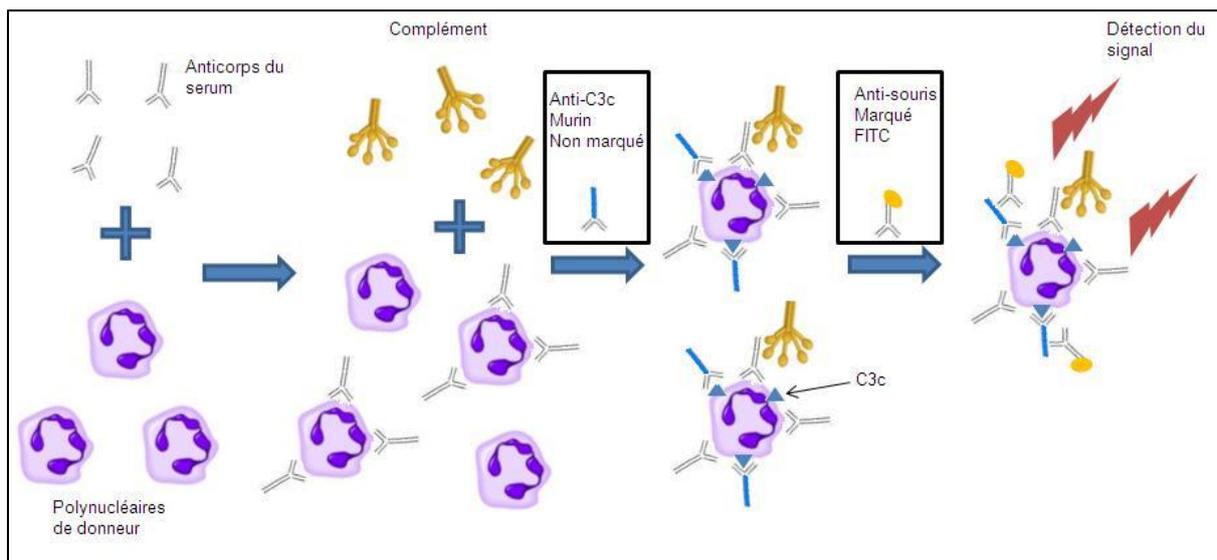


Figure 14: Principe de la technique d'étude du dépôt de C3c

4.5 Etude de survie

Afin d'évaluer l'effet des auto-anticorps sur la survie des polynucléaires neutrophiles, il a été décidé d'effectuer un test de survie des polynucléaires neutrophiles opsonisés par les anticorps anti-HNA-1a ou anti-HNA-1b.

Le mode opératoire était le suivant :

1. 200 μ L d'une suspension de polynucléaires neutrophiles issus de donneurs à une concentration de 1.10^6 /mL étaient déposés au fond d'une plaque à fond en V.
2. Après élimination du surnageant, le culot était resuspendu dans 25 μ L de SAB (témoin) ou de sérum (puit test) puis incubé 30 minutes à température ambiante.
3. Après 2 lavages, le culot était resuspendu dans 200 μ L de RPMI puis transféré dans une plaque à fond en U puis incubé pendant 24h00 à 37°C.
4. Après incubation et 2 lavages, le culot était repris dans 200 μ L de PBS-EDTA puis transféré dans un tube à hémolyse. La lecture était faite sur l'automate BD FACSCanto™ II après ajout de 2 μ L de DAPI.
5. Après une première analyse effectuée à l'aide du logiciel BD FACSDiva™, les résultats étaient enregistrés sur le réseau du CHU de Nantes puis réanalysés à l'aide du logiciel Flowjo™. L'intégralité du tube était lu.

5 Exploitation des résultats

L'ensemble des données étaient regroupées au sein d'un tableur Excel. Puis, une analyse statistique était effectuée. Plusieurs tests ont été utilisés :

Pour les données qualitatives :

- Le test du Chi2 ($n > 5$)
- La méthode exacte de Fisher ($n < 5$)

Pour les données quantitatives :

- Pour les échantillons non appariés, le test de Mann-Whitney ou le test t de Student si la distribution de la variable selon la loi Normale était vérifiée.
- Pour les échantillons appariés, le test de Wilcoxon ou le test t de Student si la distribution de la variable selon la loi Normale était vérifiée.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.00[®]. Pour ces tests, une signification statistique a été retenue pour une valeur de p inférieure à 0.05.

Résultats

1 Statistiques descriptives

Pour cette étude, 31 patients développant des anticorps anti-HNA-1a et 14 patients développant des anticorps anti-HNA-1b ont été inclus.

	HNA-1a	HNA-1b	p	Bux J. et al	Lalezari p. et al
Effectif	31	14		240	121
Âge au moment de l'analyse (en mois)	17,69 ± 13,74	12,61 ± 9,59	0,0735	3-15 mois (8 mois en moyenne)	3-30 mois (8 mois en moyenne)
Sex ratio (G/F)	0,63	1	0,4778	0,85	0,66
Numération des polynucléaires neutrophiles au moment de l'analyse (G/L)	0,415 ± 0,477	0,361 ± 0,345	0,5602	0-1500 (70% <0,5, 23 entre 0,5 et 1, 7% entre 1 et 1,5)	Neutropénies sévères en majorité (Numérations non précisées)
Numération des polynucléaires neutrophiles la plus faible documentée (G/L)	0,171 ± 0,175	0,150 ± 0,193	0,234	NP	NP
Proportion de sujets ayant présenté des infections	66,67% (n=18)	84,62% (n=10)	0,2338	80%	En grande partie, proportion non définie

Tableau 6: Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des patients des groupes HNA-1a ou HNA-1b. La distribution des variables est représentée par la moyenne ± écart-type. La partie droite du tableau permet de comparer nos valeurs à celles décrites par les deux principales études épidémiologiques sur la NAI I. La notification « NP » signifie que la notion n'est pas précisée dans l'étude.

L'âge moyen au moment de la mise en évidence des auto-anticorps anti-CD16b était de 17.69 ± 13.74 mois pour le groupe HNA-1a et 12.61 ± 9.59 mois pour le groupe HNA-1b.

Dans le groupe HNA-1a, le sex ratio (G/F) était de 0.63, la numération la plus faible documentée des PNN était de 0.171 ± 0.175 G/L et de 0.415 ± 0.477 G/L au moment de l'analyse. L'existence ou non d'épisodes infectieux était renseignée pour 27 des 31 patients parmi lesquels 18 (66.67%) avaient présenté au moins une infection au moment de la recherche des auto-anticorps.

Dans le groupe HNA-1b, le sex ratio était équilibré à 1.00, la numération la plus faible documentée des PNN était de 0.150 ± 0.193 G/L et de 0.361 ± 0.345 G/L au moment de l'analyse. L'existence ou non d'épisodes infectieux était renseignée pour 13 des 14 patients parmi lesquels 11 (84.62%) avaient présenté au moins une infection au moment de la recherche des auto-anticorps.

La comparaison de ces paramètres n'a pas retrouvé de différence statistiquement significative entre les groupes de patients présentant des anti-HNA-1a et anti-HNA-1b

(**Tableau 6**). Cependant, conformément aux données de la littérature, les tendances montrent une atteinte préférentielle des filles pour le groupe HNA-1a alors qu'elle ne semble pas orientée dans le groupe HNA-1b. Il semble par contre que le diagnostic soit posé plus tôt dans le groupe HNA-1b que dans le groupe HNA-1a (12.61 ± 9.59 vs. 17.69 ± 13.74 mois, $p=0.0735$) (**Figure 15**). Concernant les taux de PNN, il ne semble pas y avoir de différence entre les deux groupes que soit en terme de nadir (0.171 ± 0.175 G/L vs 0.150 ± 0.193 G/L, $p=0.2340$) ou en terme de neutrophiles du jour (0.361 ± 0.345 G/L vs. 0.415 ± 0.477 G/L, $p=0.5602$) (**Figure 16**). Ces observations mettent également en évidence une tendance aux infections plus élevée dans le groupe HNA-1b que dans le groupe HNA-1a (84.62% vs. 66.67%, $p=0.2338$).

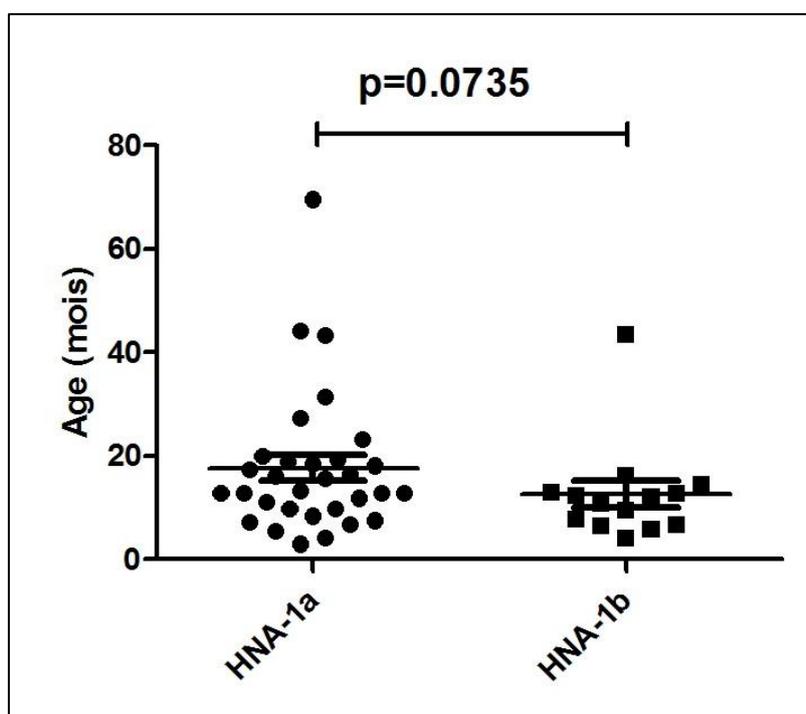


Figure 15: Résultats des comparaisons des âge entre les groupes HNA-1a et HNA-1b. La distribution est représentée selon la moyenne \pm SEM, $n=31$ pour HNA-1a et $n=14$ pour HNA-1b

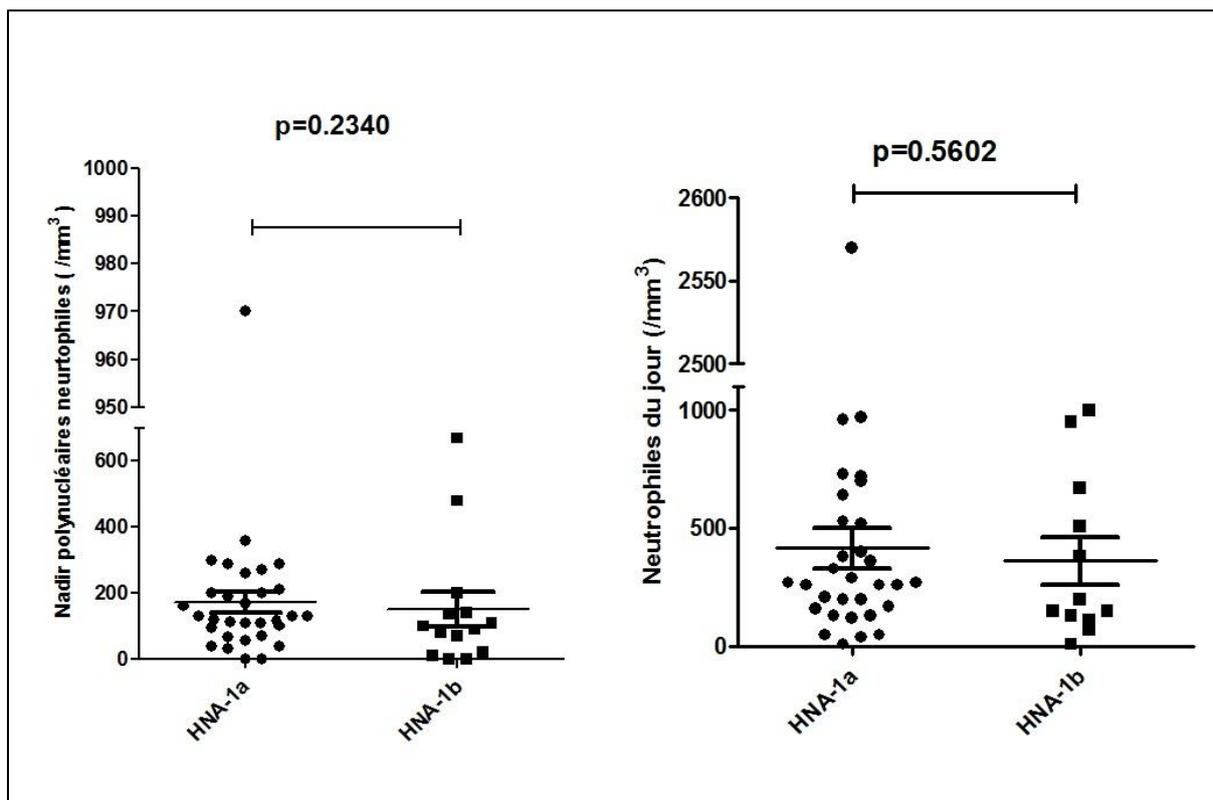


Figure 16: Représentation schématique des taux de polynucléaires neutrophiles dans chacun des groupes HNA-1a et HNA-1b. La distribution est représentée selon la moyenne +/- SEM, n= 31 pour HNA-1a et n=14 pour HNA-1b

La nature des infections au sein du groupe HNA-1a a pu être documentée pour 23 des 27 patients. Ces infections sont assez variées, dominée néanmoins par des tableaux ORL (n=9 ; 39.13%). Des infections digestives (n=3 ; 13.04%), cutanées (n=3 ; 13.04%), pulmonaires (n=4 ; 17.39%) et génitales (n=1 ; 4.35%) ont également été retrouvées (**Figure 17**).

Concernant les patients du groupe HNA-1b, la nature des infections a pu être obtenue pour 11 des 13 patients. Les mêmes tableaux infectieux que pour les patients du groupe HNA-1a sont retrouvés, affectant à nouveau majoritairement la sphère ORL (n=4 ; 36.4%). Les autres patients ont présentés des infections urinaires (n=1 ; 9.09%), cutanées (n=1 ; 9.09%), digestive (n=1 ; 9.09%), pulmonaires (n=1 ; 9.09%) et génitales (n=1 ; 9.09%).

Il semble donc que dans notre série, les profils infectieux des patients atteints de NAI I avec auto-anticorps anti-HNA-1a ou anti-HNA-1b soient assez similaires, tous deux dominés par des atteintes ORL. Nos données confirment donc les données de la littérature (Bux et al., 1998), et suggèrent qu'il n'y a pas de manifestations infectieuses spécifiques de l'un ou l'autre de nos 2 groupes. Il est par ailleurs à noter qu'aucune infection sévère n'a été relevée dans notre série.

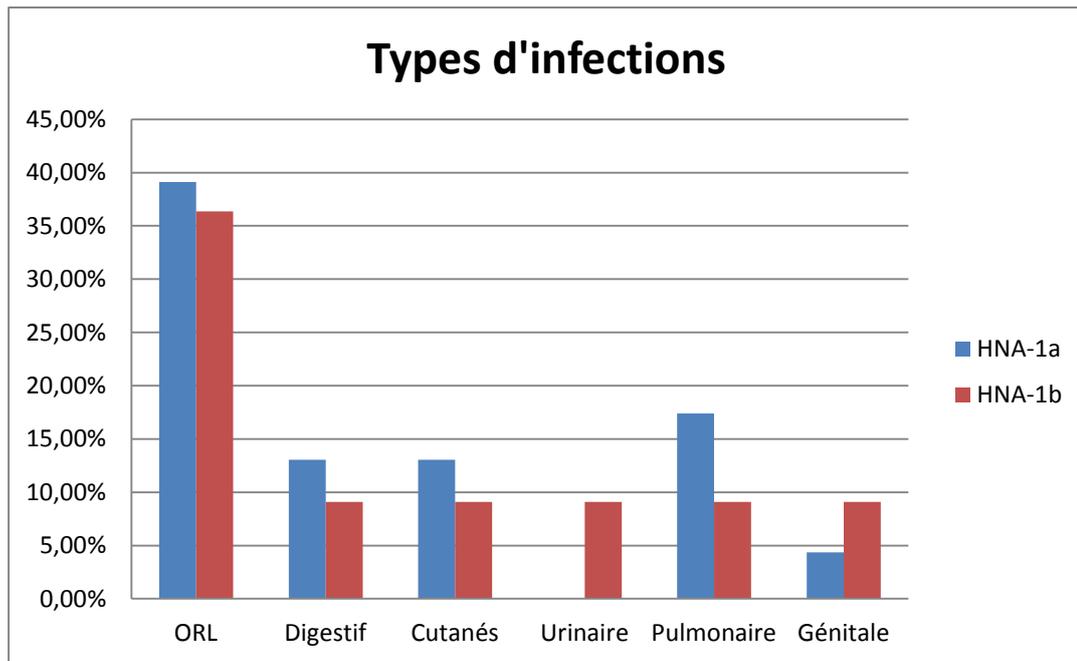


Figure 17: Présentation du types d'infections développées dans les groupes HNA-1a et HNA-1b

Finalement, cette étude de dossiers, n'a pu démontrer de différences statistiquement significatives entre ces 2 groupes de patients probablement en raison du faible effectif dans le groupe HNA-1b. Il semble cependant que le diagnostic soit évoqué plus tôt, probablement en raison d'infections plus fréquentes, dans le groupe HNA-1b. La nature des infections est par contre similaire entre les deux groupes et conforme aux données de la littérature. Concernant la numération des PNN, elle ne semble pas différer significativement entre les deux groupes.

2 Etudes des sous-classes d'immunoglobulines

Afin de tenter d'appréhender l'existence d'éventuelles différences physiopathologiques entre les patients des groupes HNA-1a et HNA-1b, une analyse comparative de la nature des sous-classes d'IgG anti-CD16b au sein des deux groupes a été réalisée. Les **Figures 19 et 20** présentent des profils représentatifs des résultats de cytométrie en flux obtenus respectivement chez les patients des groupes HNA-1a et HNA-1b.

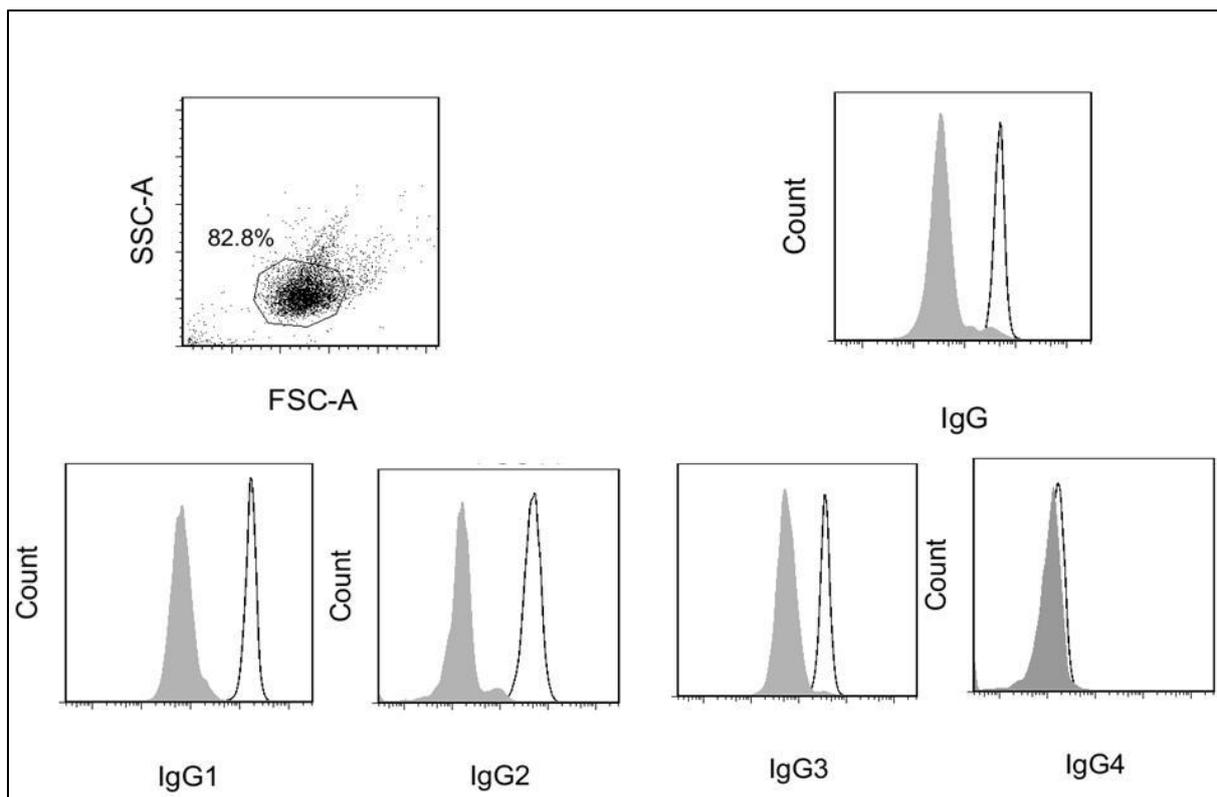


Figure 18 : Exemple d'un patient du groupe HNA-1a présentant des IgG anti-CD16b de sous-classes IgG1, IgG2 et IgG3. Les histogrammes blancs correspondent au patient testé, gris au témoin négatif (SAB).

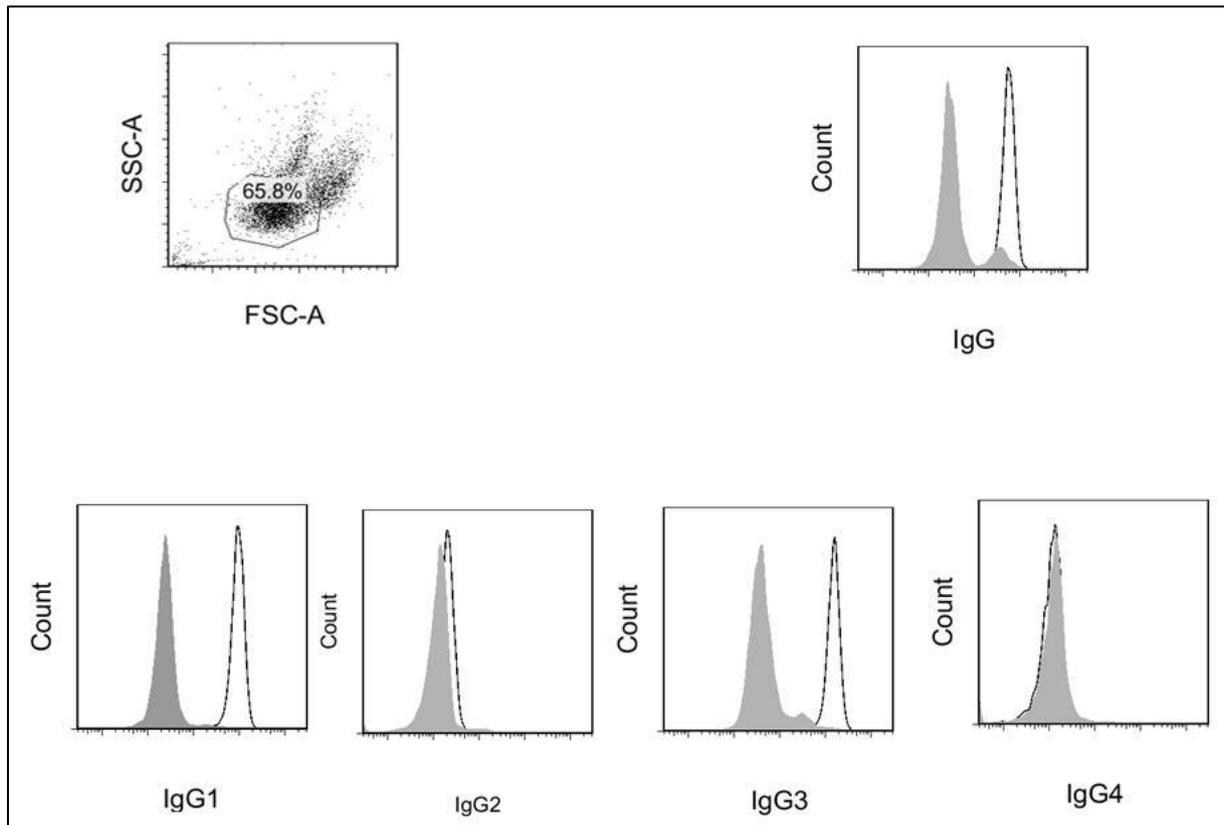


Figure 19 : Images obtenues après réanalyse sur Flowjo™. Exemple d'un patient du groupe HNA-1b positif pour les IgG1 et IgG3, négatif pour les IgG2 et IgG4. Les courbes grisées correspondent au signal du SAB.

2.1 Analyse qualitative de la répartition des sous-classes

Type de sous-classes produites	HNA-1a	HNA-1b	p
IgG1	15 (48,39%)	10 (71,43%)	0,202
IgG2	20 (64,52%)	1 (7,14%)	0,0004
IgG3	24 (77,42%)	14 (100%)	0,0806
IgG4	1 (3,23%)	1 (7,14%)	0,5303

Tableau 7: Proportion de patients exprimant chacune des sous-classes d'IgG dans chacun des groupes étudiés

Les résultats obtenus sur la répartition des sous-classes dans chacun des deux groupes sont présentés **Tableau 7**. Le principal résultat de cette étude concerne les IgG2. En effet, nous avons observé que les patients du groupe HNA-1a produisent plus souvent des IgG2 par rapport au groupe HNA-1b qui n'en synthétise que très peu (64.52% vs. 7.14% p=0.0004). En revanche, il était constaté également que les IgG3 étaient la sous-classe la plus fréquemment représentée au sein de ces 2 groupes (77.42% vs. 100% ; p=0.0806). Concernant le groupe HNA-1a, il était constaté une production de chacune des sous-classes assez équilibrée, aucune

ne semblant vraiment majoritaire par rapport à une autre. En revanche, dans le groupe HNA-1b la production des sous-classes d'IgG semblait orientée vers les IgG1 et IgG3, rarement vers les IgG2 et IgG4. Finalement, la proportion de patient produisant des IgG4 était très faible dans chacun des deux groupes (3.23% vs. 7.14% ; $p=0.5085$). L'analyse qualitative montre donc une très nette différence de production des sous-classes d'IgG entre les deux groupes

2.2 Analyse quantitative de la répartition des sous-classes

Afin d'évaluer la quantité d'anticorps produit par chacun des groupes de patients, il était tout d'abord étudié les ratios moyens patient/SAB des médianes de fluorescence en immunoglobulines polyvalentes (témoin positif) (**Figure 20**).

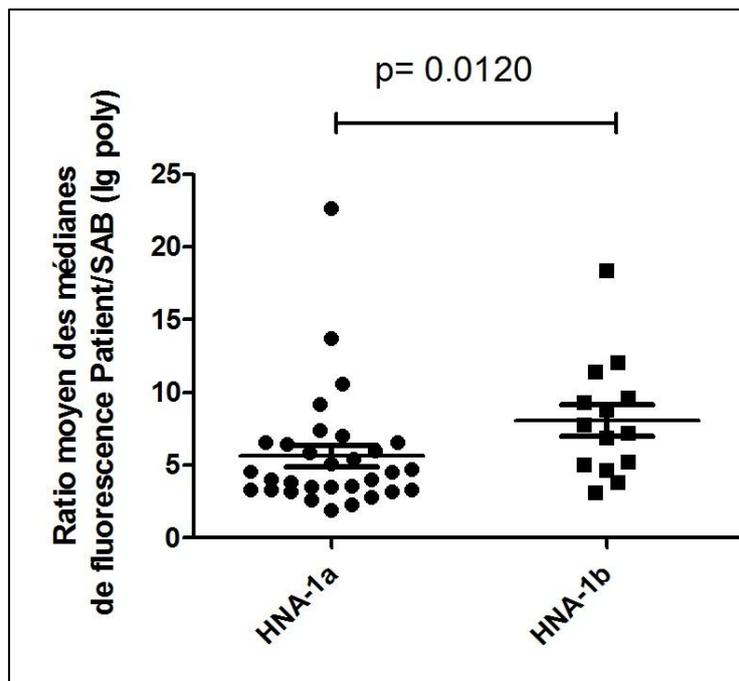


Figure 20 : Représentation schématique du ratio moyen des médianes de fluorescence en IgG polyvalentes dans chacun des deux groupes. La distribution est représentée selon la moyenne \pm SEM, $n=31$ pour HNA-1a et $n=14$ pour HNA-1b

Il était donc observé un ratio d'IgG totales statistiquement plus important dans le groupe HNA-1b par rapport au groupe HNA-1a (5.606 ± 0.73 vs 8.072 ± 1.077 ; $p=0.0120$). Il est donc possible que le groupe HNA-1b produise plus d'IgG que le groupe HNA-1a. Il est peu probable que cette différence de ratio s'explique par une différence d'expression protéique du Fc γ RIIIb. En effet, comme il a été précisé au 2.1.4 de l'introduction, les niveaux d'expression ne diffèrent pas entre les individus homozygotes HNA-1a/a ou HNA-1b/b.

Afin d'affiner ces premiers résultats, nous avons analysé ces ratio sous-classes par sous-classes, dans le but d'estimer si cette production plus importante d'IgG touchait une sous-classe en particulier d'IgG ou bien l'ensemble de ces dernières. Etant donné qu'un seul patient du groupe HNA-1b synthétisait des IgG2, et que les IgG4 n'étaient produites que chez 2 patients de notre cohorte, nous avons comparé les ratios des IgG1 et des IgG3 uniquement

Tableau 8

Sous-classe	HNA-1a	HNA-1b
IgG1	10,65 ± 8,230	10,17 ± 10,41
IgG3	7,645 ± 8,251	20,18 ± 12,29

Tableau 8: Valeurs des ratios moyens des médianes de fluorescence pour les IgG1 et IgG3 produites dans les groupes HNA-1a et HNA-1b

Chez les patients produisant des IgG1, les ratios moyens de médianes de fluorescence étaient comparables (10.65 ± 8.230 vs. 10.17 ± 10.41 $p=1.000$) laissant supposer que la quantité d'IgG1 produite par chacun des deux groupes était quantitativement similaire. En revanche, les ratios moyens des médianes de fluorescence des IgG3 étaient bien supérieurs dans le groupe HNA-1b que dans le groupe HNA-1a (20.18 ± 12.29 vs. 7.645 ± 8.251 ; $p=0.0002$) (**Figure 21**). Les médianes de fluorescences, de ces mêmes groupes mais non rapportés au signal du SAB donnaient les mêmes résultats (**Figure 22**) Ainsi, il est probable que la différence observée dans la quantité d'IgG totales produites dans chacun des deux groupes proviennent de cette sous-classe : les patients du groupe HNA-1b produiraient plus d'IgG3 que les patients du groupe HNA-1a.

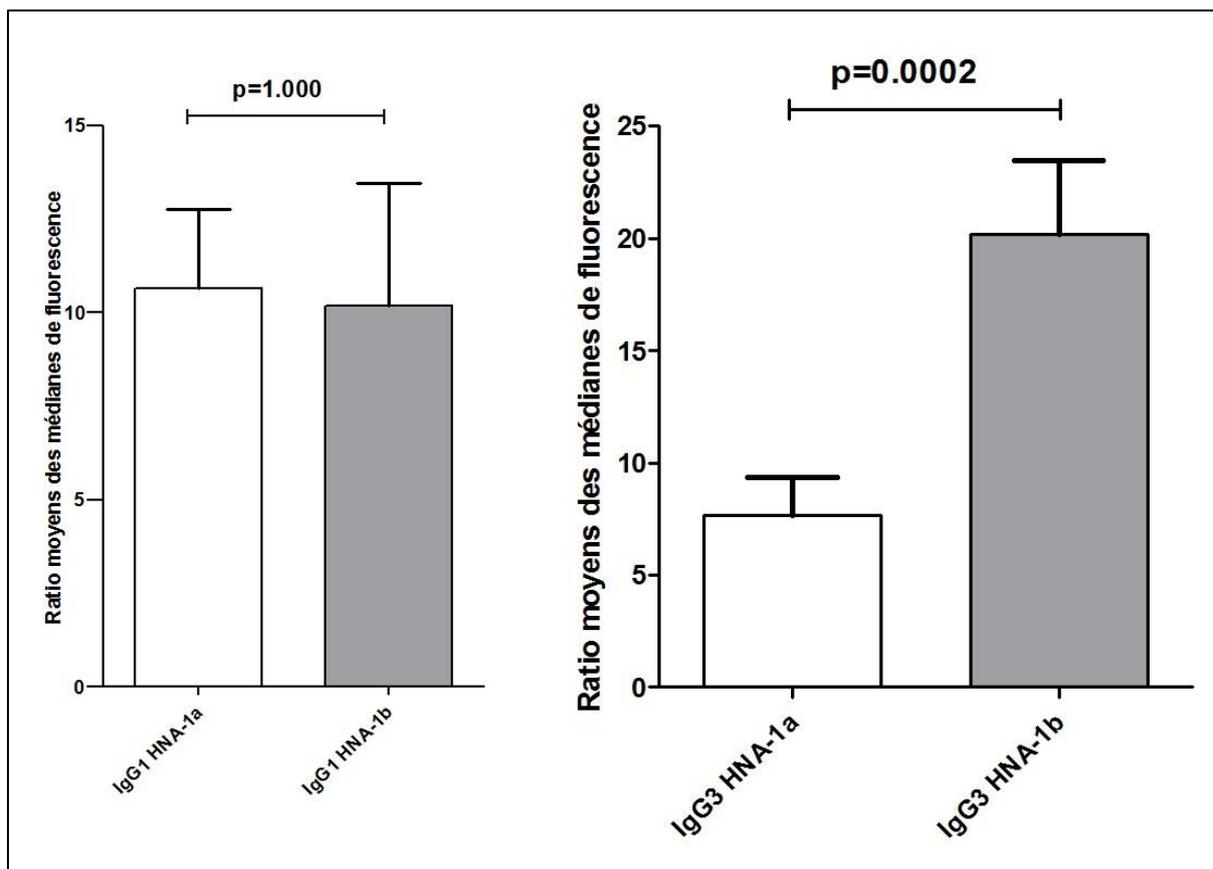


Figure 21: Résultats des comparaisons des ratios moyens des médianes de fluorescence IgG1/SAB (panneau de gauche) et IgG3/SAB (panneau de droite) entre les patients positifs des groupes HNA-1a et HNA-1b. Les histogrammes correspondent à la moyenne +/- SEM (IgG1 : n=15 pour HNA1a et n=10 pour HNA-1b ; IgG3 : n=24 pour HNA-1a et n=14 pour HNA-1b).

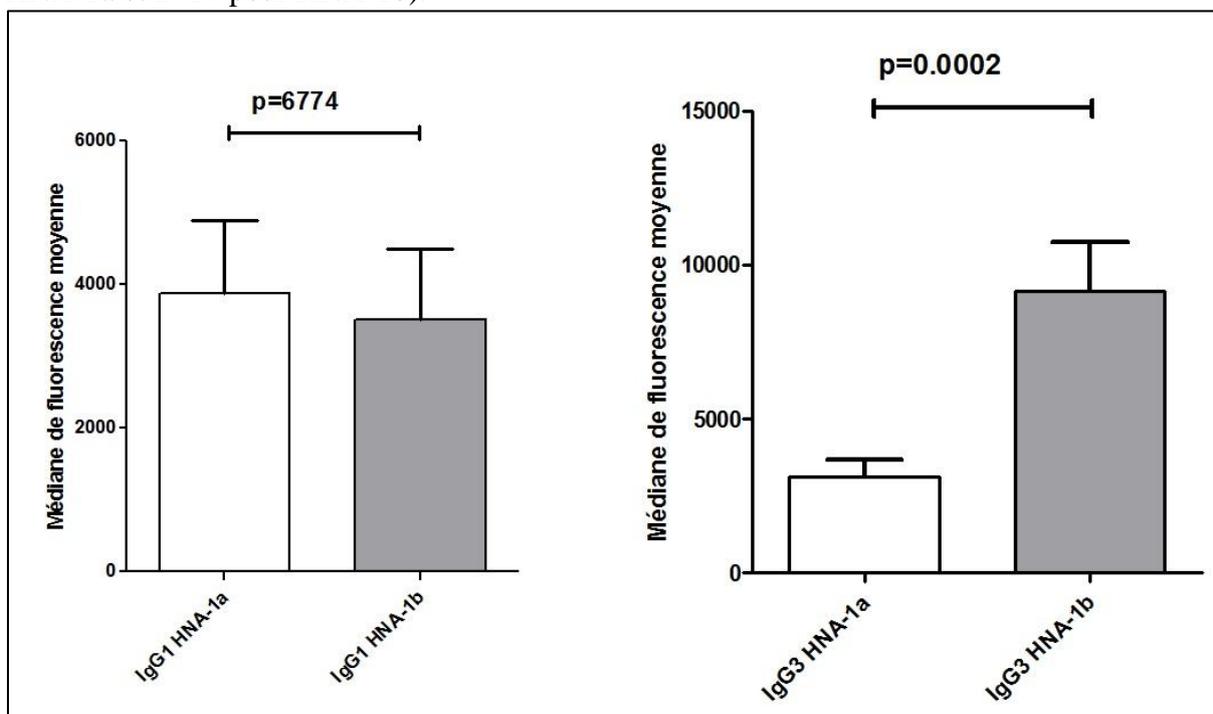


Figure 22/ Résultats des comparaisons médianes de fluorescence IgG1 (panneau de gauche) et IgG3 (panneau de droite) entre les patients positifs des groupes HNA-1a et HNA-

1b. Les histogrammes correspondent à la moyenne +/- SEM (IgG1 : n=15 pour HNA1a et n=10 pour HNA-1b ; IgG3 : n=24 pour HNA-1a et n=14 pour HNA-1b).

Au sein du groupe HNA-1b et parmi les patients synthétisant des IgG1 et des IgG3, il était observé une quantité d'IgG3 significativement plus forte que les IgG1 (**Figure 23**), renforçant l'observation faite précédemment.

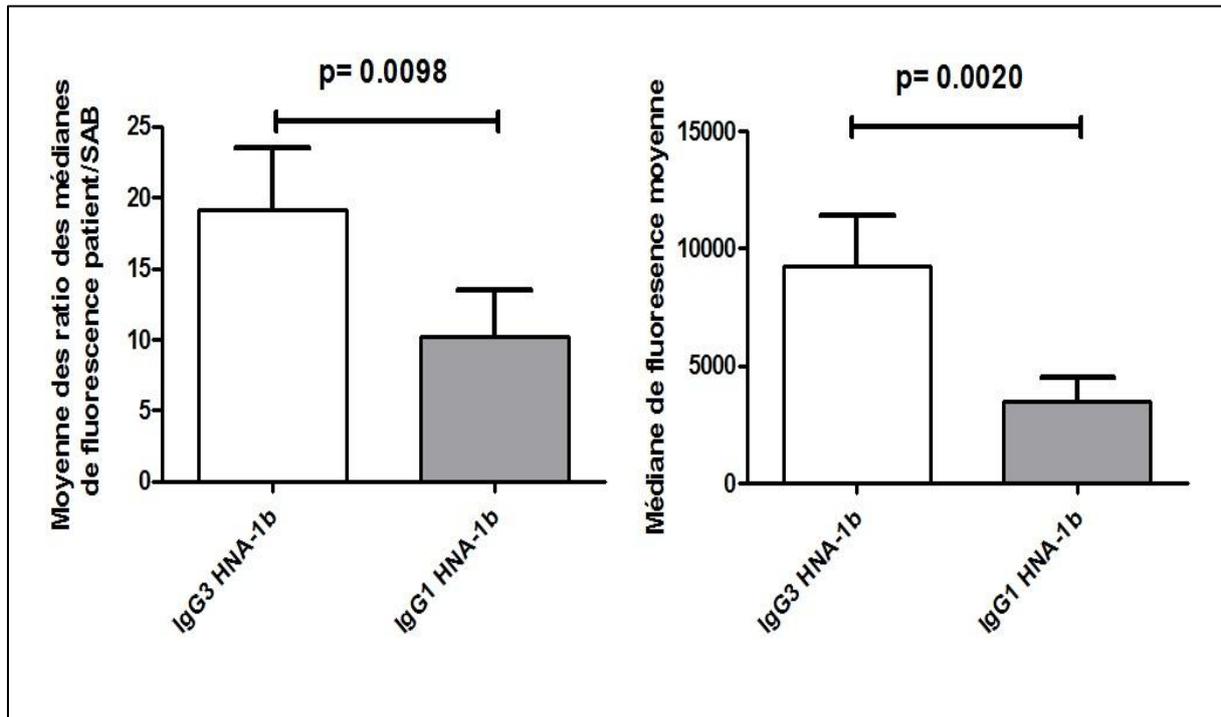


Figure 23 : Résultats des comparaisons médianes de fluorescence au sein du groupe HNA-1b chez les patients positifs en IgG1 et IgG3, entre les IgG1 et les IgG3. Le panneau de gauche représente les ratios normalisés par rapport au SAB et le panneau de droite les médianes de fluorescences mesurées. Les histogrammes correspondent à la moyenne +/- SEM (n=10).

Contrairement au groupe HNA-1b, les patients du groupe HNA-1a produisaient des IgG1 en plus grande quantité lorsqu'elles étaient associées aux IgG3 (**Figure 24**). Cependant, lorsqu'il était comparé uniquement les médianes de fluorescence pour ce même groupe, il était observé des valeurs significativement plus fortes d'IgG1 ou d'IgG3 lorsque ces dernières étaient associées à des IgG2 (**Figure 25**). Cependant, ces observations pouvaient s'expliquer par les médianes de fluorescence du SAB significativement plus élevées pour les IgG1 et les IgG3 que pour les IgG2 (**Figure 26**).

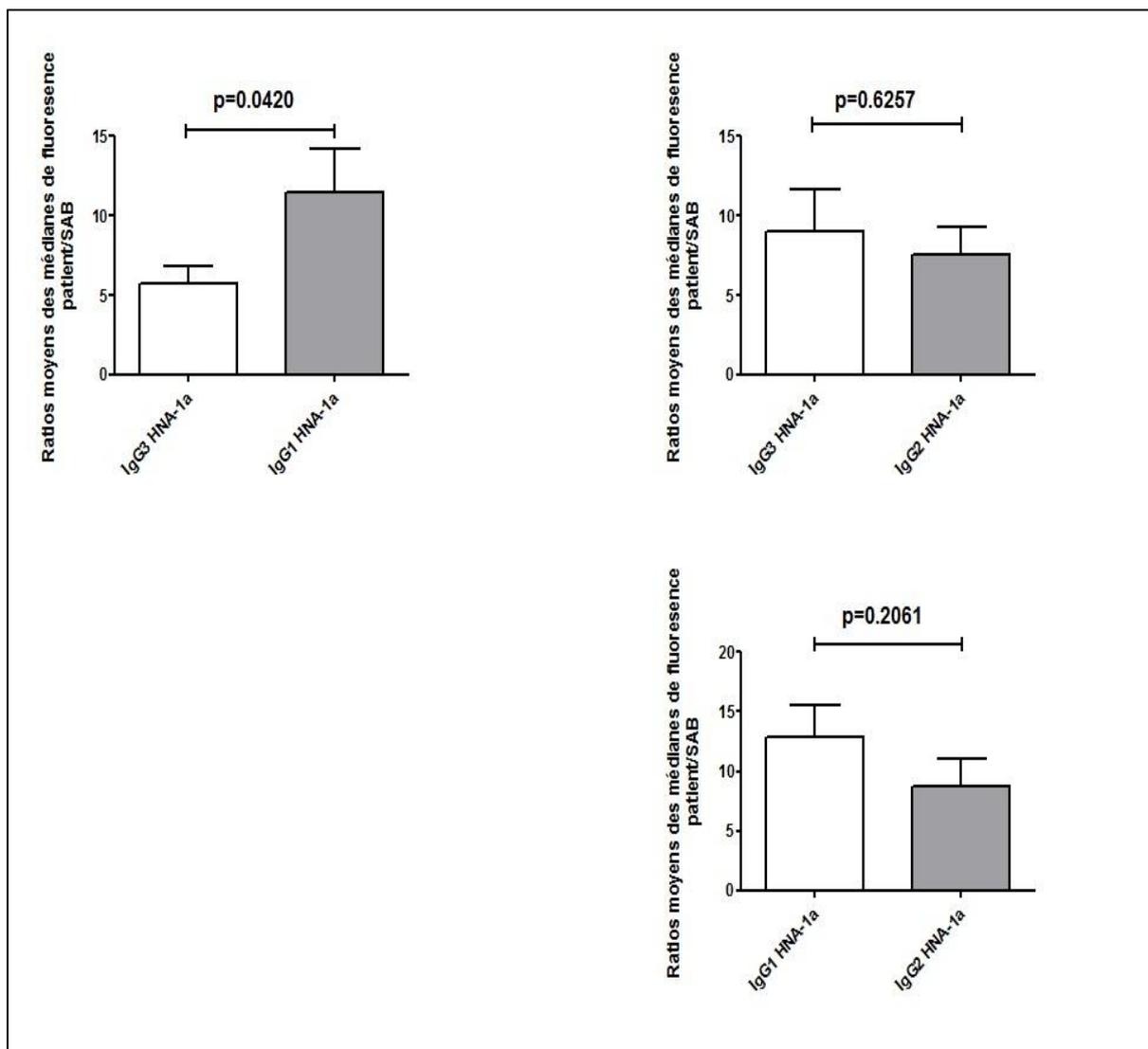


Figure 24: Résultats des comparaisons des ratios de fluorescence au sein du groupe HNA-1a. En haut à gauche, comparaison des ratios des patients produisant des IgG1 et des IgG3 (n=11), en haut à droite, ceux produisant des IgG3 et des IgG2 (n=14) et en bas à droite, comparaison des ratios des patients produisant des IgG1 et des IgG2 (n=11). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM.

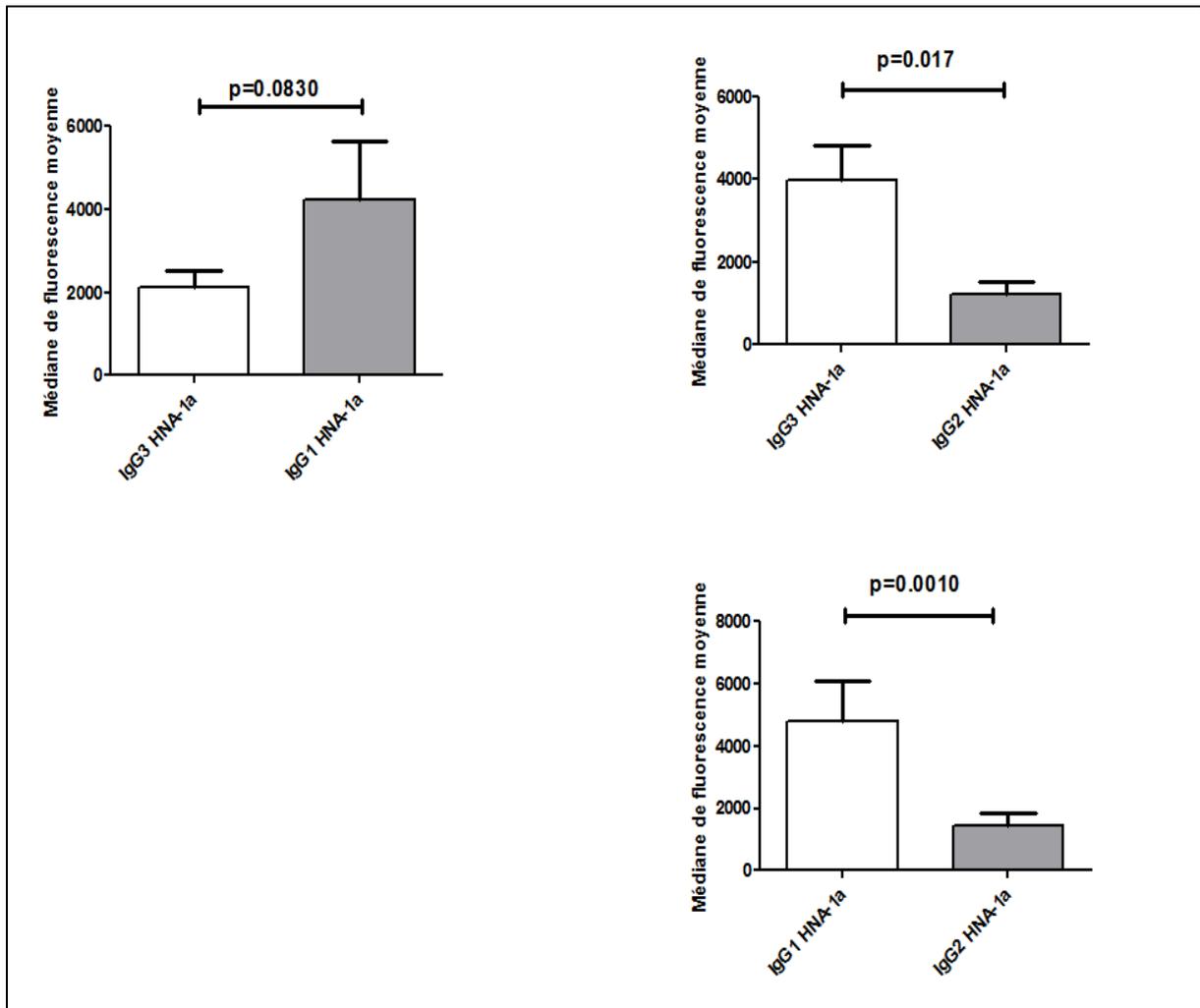


Figure 25: Résultats des comparaisons des médianes de fluorescence au sein du groupe HNA-1a. En haut à droite, les patients produisant des IgG3 et des IgG1 (n=11), en haut à gauche ceux produisant des IgG3 et des IgG2 (n=14) et en bas à droite, ceux produisant des IgG1 et des IgG2 (n=11) Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM.

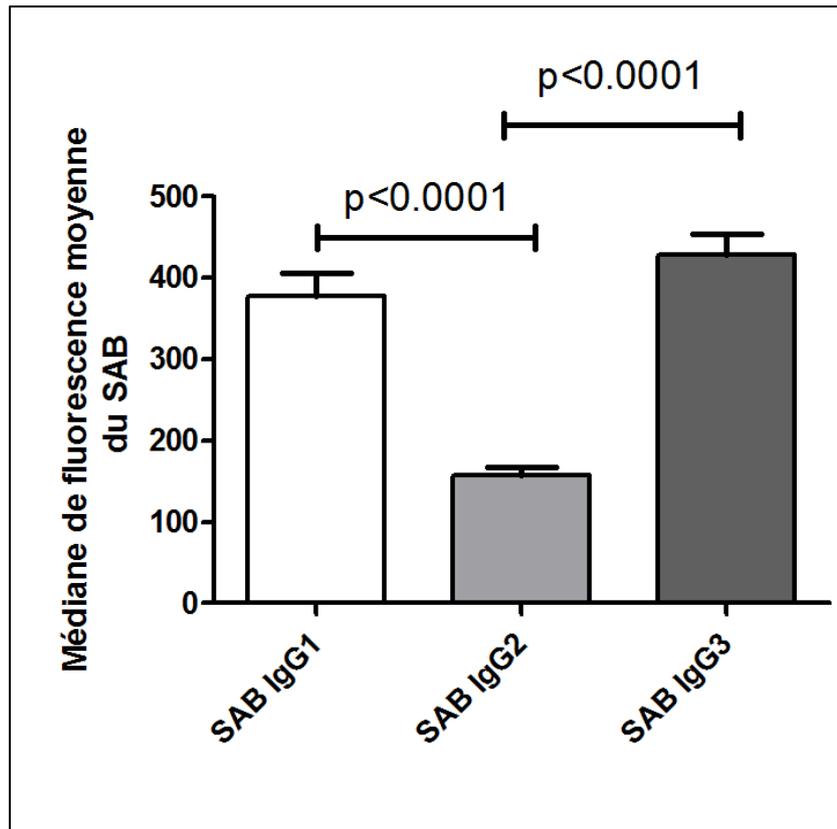


Figure 26: Résultats des comparaisons des valeurs du SAB au sein du groupe HNA-1a. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM (n=31).

En définitive, les patients du groupe HNA-1b produiraient des IgG dont la sous-classe IgG3 paraît prédominante, alors que dans le groupe HNA-1a, bien qu'il existe également une production d'IgG2, les IgG1 semblent être quantitativement plus abondantes par rapport aux IgG2 et aux IgG3.

2.3 Impact clinique de la production de chacune des sous-classes d'IgG

Afin d'évaluer l'impact clinico-biologique de la production de chacune des sous-classes d'IgG, les données collectées ont été comparées en fonction de la production ou non de chacune des sous-classes d'IgG, en confondant dans un premier temps les deux groupes afin d'évaluer l'impact global de la production de chacune de ces sous-classes sur le développement d'infection et les taux de PNN. L'âge permettant d'estimer si l'apparition de certaines sous-classes était plus ou moins rapide en fonction de l'évolution de la pathologie. Dans un deuxième temps, il était procédé aux mêmes comparaisons, afin d'estimer s'il existait des différences clinico-biologiques entre les patients des groupes HNA-1a et HNA-1b qui produiraient ou non la même sous-classe d'IgG. Etant donné que tous les patients du groupe HNA-1b produisaient tous des IgG3 et qu'un seul d'entre eux produisait des IgG2, il n'était

pas possible de comparer les patients ne produisant pas d'IgG3 ou ceux produisant des IgG2 en fonction des deux groupes. Les résultats obtenus sont présentés **Tableau 9** et **Tableau 10**.

Concernant les IgG1, il n'était pas observé de différences clinico-biologiques entre les patients produisant ou non cette sous-classe. Les âges étaient comparables tout comme la numération des PNN (le jour de l'analyse ou au nadir). Il ne semblait pas y avoir une tendance aux infections plus importante chez les patients produisant des IgG1. La comparaison entre les deux groupes HNA-1a ou HNA-1b montrait ces mêmes conclusions.

Concernant les IgG2, aucun paramètre ne semblait différer entre les deux groupes constitués. Ces paramètres semblaient également comparables chez les patients ne produisant pas d'IgG2 entre le groupe HNA-1a et HNA-1b.

La synthèse d'IgG3 ne semblait pas influencer non plus sur le taux de PNN ni sur la proportion des infections. La production d'IgG3 semblait intervenir chez des sujets également plus jeunes (15.66 ± 13.52 vs. 18.55 ± 6.979 ; $p= 0.0795$). Cependant, la puissance statistique de notre étude ne nous permettait pas de conclure à ce sujet.

Deux patients de notre étude ont montré une production significative d'IgG4 : un patient du groupe HNA-1a et un patient du groupe HNA-1b. Le patient du groupe HNA-1b était un garçon âgé de 12 mois, montrait une production d'IgG1 (ratio 5.89) et d'IgG3 (ratio 11.53) associée à la production d'IgG4 (ratio 4.51), le taux de PNN le plus faible documenté était de 0.1G/L et de 0.510G/L le jour de l'analyse. La notion d'une infection à adenovirus était documentée. Le patient du groupe HNA-1a était une fille âgée de 17 mois et montrait une production d'IgG2 (ratio 4.92) et d'IgG3 (ratio 11.53) associée à la production d'IgG4 (ratio 5.55), le taux de PNN le plus faible documenté était de 0.070G/L et de 0.720G/L le jour de l'analyse. D'un point de vue clinique, il avait présenté une adénite.

En définitive, aucune sous-classe d'IgG ne semblait corrélérer de manière significative avec des conséquences clinico-biologiques particulières.

Sous classe étudiée	IgG1			IgG2			IgG3		
	Présence d'IgG1	Absence d'IgG1	p	Présence d'IgG2	Absence d'IgG2	p	Présence d'IgG3	Absence d'IgG3	p
Age (mois)	18,08 ± 14,55	13,65 ± 9,769	0,2679	14,98 ± 8,98	17,09 ± 15,39	0,9456	15,66 ± 13,52	18,55 ± 6,979	0,0795
Taux de PNN du jour (G/L)	0,334 ± 0,280	0,476 ± 0,572	0,7337	0,440 ± 0,556	0,362 ± 0,301	0,8208	0,435 ± 0,470	0,221 ± 0,154	0,1994
Nadir des PNN (G/L)	0,128 ± 0,101	0,211 ± 0,239	0,4303	0,141 ± 0,098	0,186 ± 0,228	0,7499	0,169 ± 0,192	0,141 ± 0,082	0,6608
Proportion d'infections (%)	78,3	64,7	0,4774	68,4	76,2	0,7271	75,8	57,1	0,3694

Tableau 9 : Comparaison des données clinico-biologiques en fonction de la production ou non de chacune des sous-classes d'IgG. Tout groupe confondu. La distribution de chaque variable est représentée par sa moyenne ± écart-type.

	Présence d'IgG1			Absence d'IgG1			Présence d'IgG3			Absence d'IgG2		
	HNA-1a	HNA-1b	p	HNA-1a	HNA-1b	p	HNA-1a	HNA-1b	p	HNA-1a	HNA-1b	p
Age (mois)	20,21 ± 16,71	14,88 ± 10,53	0,3456	15,33 ± 10,23	6,91 ± 2,36	0,0805	17,44 ± 15,27	12,61 ± 9,59	0,1984	21,85 ± 19,57	12,61 ± 9,59	0,095
PNN du jour (G/L)	0,281 ± 0,223	0,433 ± 0,359	0,6046	0,542 ± 0,611	0,215 ± 0,306	0,1705	0,472 ± 0,525	0,361 ± 0,345	0,3737	0,349 ± 0,247	0,361 ± 0,345	0,622
Nadir des PNN (G/L)	0,131 ± 0,068	0,125 ± 0,141	0,3743	0,211 ± 0,232	0,283 ± 0,336	0,9553	0,181 ± 0,194	0,151 ± 0,193	0,2823	0,233 ± 0,259	0,146 ± 0,200	0,1245
Infections (%)	76,92	80	1	57	100	0,5147	70	84,6	0,4311	66,67	83,3	0,6108

Tableau 10 : Comparaison inter-groupe des données clinico-biologique en fonction de la production ou non de chacune des sous-classes d'IgG. La distribution de chaque variable est représentée par sa moyenne ± écart-type.

2.4 Cas particulier des IgG2

Du fait de leur propriétés physiologiques bien distinctes des IgG1 et IgG3 ainsi que de leur production spécifique par les patients du groupe HNA-1a, nous avons souhaité étudier plus en détail les patients testés positifs pour cette sous-classe. En effet, les IgG2 sont des IgG de faible affinité pour les récepteurs Fc des immunoglobulines, et nous avons émis l'hypothèse que la présence d'IgG2 fixées sur les PNN de ces patients pourrait avoir un effet protecteur vis-à-vis de leur destruction, cette fixation pouvant potentiellement entrer en compétition avec les autres sous-classes d'IgG produites conjointement avec les IgG2. Afin d'étudier plus précisément la conséquence de la production d'IgG2 en particulier, nous avons préféré nous limiter à l'étude des patients du groupe HNA-1a afin d'éviter un biais induit par l'intégration des patients du groupes HNA-1b

Ainsi, au niveau des taux de PNN, aucune différence significative n'était démontrée tant au niveau du taux de neutrophiles le plus bas documenté qu'au moment de l'analyse (**Figure 27**).

Les patients produisant des IgG2 semblaient être atteints plus fréquemment par des infections ORL, digestives ou pulmonaires. Cependant, aucune différence significative n'était observée dans chacun des groupes du fait des faibles effectifs observés (**Figure 28**).

Il n'était donc pas retrouvé de résultats permettant de mettre en évidence un impact de la production d'IgG2 sur les infections ou le taux de polynucléaires neutrophiles spécifiquement dans le groupe HNA-1a

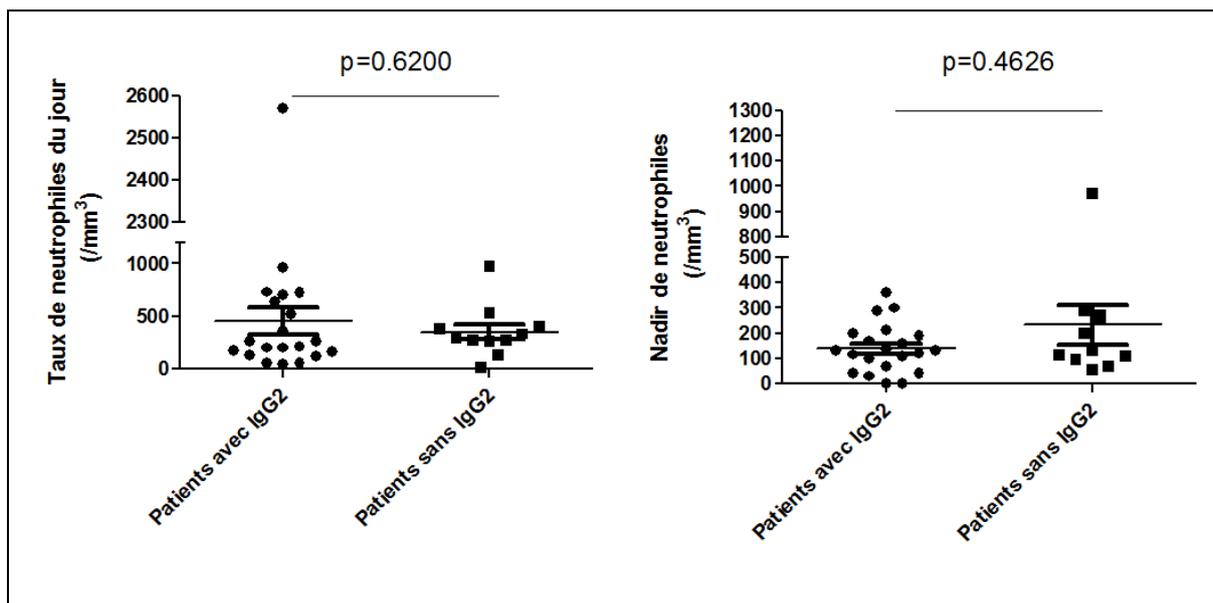


Figure 27: Comparaison des taux de neutrophiles entre les patients produisant des IgG2 et ceux n'en produisant pas. A gauche, le taux de neutrophiles au moment de l'analyse et à droite, le taux le plus faible documenté. La répartition de la variable est représentée avec la moyenne \pm SEM.

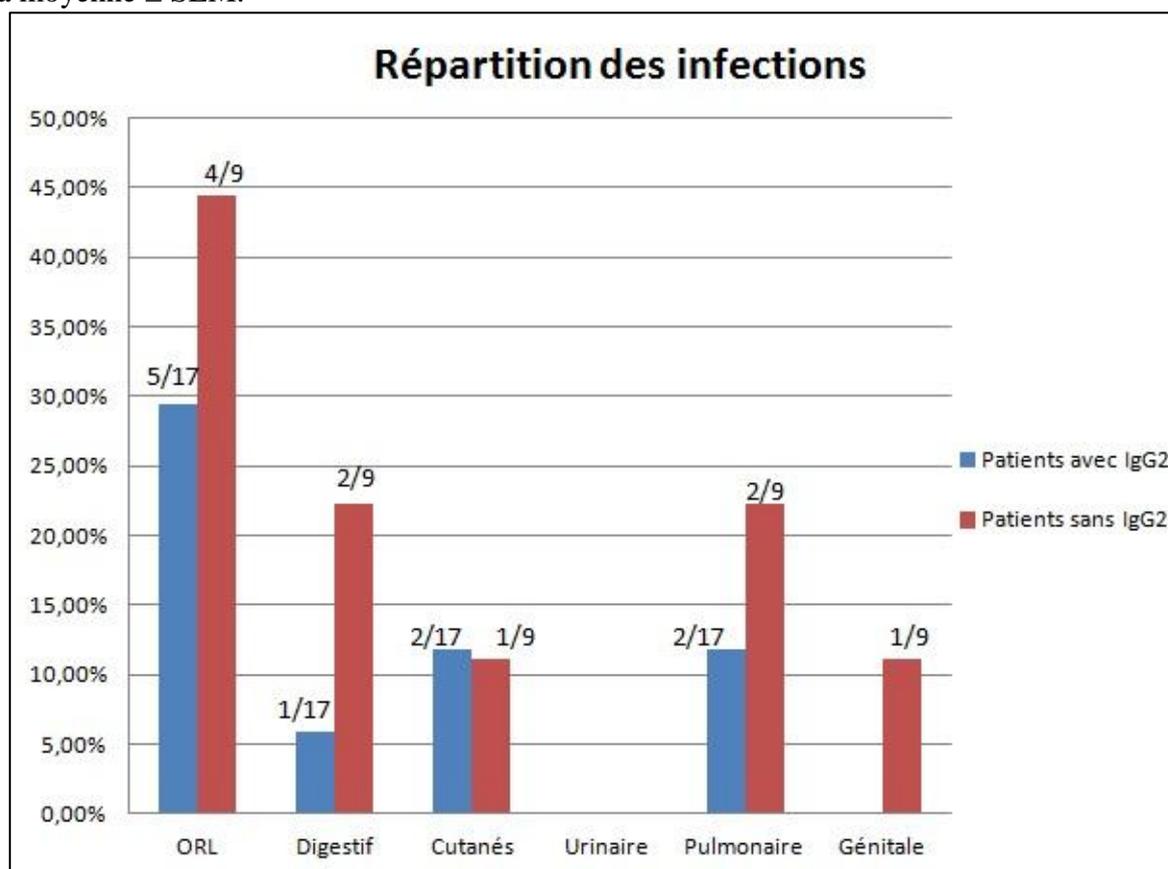


Figure 28 : Diagramme représentatif des répartitions des infections en fonction des patients présentant (en bleu) ou non (en rouge) des IgG2 dans le groupe HNA-1a. Les effectifs de chaque groupe sont représentés au sommet de chacune des colonnes. Les p obtenus étaient de 0.6673 pour les infections ORL, 0.2677 pour les infections digestives, 1.000 pour les infections cutanées, 0.5906 pour les infections pulmonaires et 0.3462 pour les infections génitales.

2.5 Etude des profils de sous-classes d'IgG produites

L'étude qualitative nous a donc permis de voir qu'il existait des différences de production des sous-classes d'IgG en fonction des deux groupes de patients. En effet, seule une très faible proportion des patients du groupe HNA-1b présentait des IgG2, et nous avons souhaité étudier plus précisément la répartition des profils de sous-classes d'IgG produites dans chacun des deux groupes pour affiner ce constat.

La répartition des profils de sous-classes d'IgG produites dans chacun des 2 groupes est présentée **Figure 29**. Au vu de nos résultats nous avons constaté que les profils de sous-classes d'IgG produites par le groupe HNA-1a étaient beaucoup plus hétérogènes que ceux du groupe HNA-1b. En effet, dans le groupe HNA-1b, 85% des patients produisaient des IgG1 associées aux IgG3 ou des IgG3 seules contre 32% pour le groupe HNA-1a. Plus précisément, le groupe HNA-1b produisait plus fréquemment le profil IgG1 + IgG3 comparé au groupe HNA-1a (57% vs. 13% ; $p=0.0003$). D'un point de vue clinique, et tout groupe confondu, aucun profil ne favorisait les infections par rapport à un autre, le trop faible effectif de chacun des groupes ne permettant pas d'établir de relation significative (**Figure 30**). Ce constat était identique pour les patients du groupe HNA-1a (**Figure 31**) et HNA-1b (**Figure 32**)

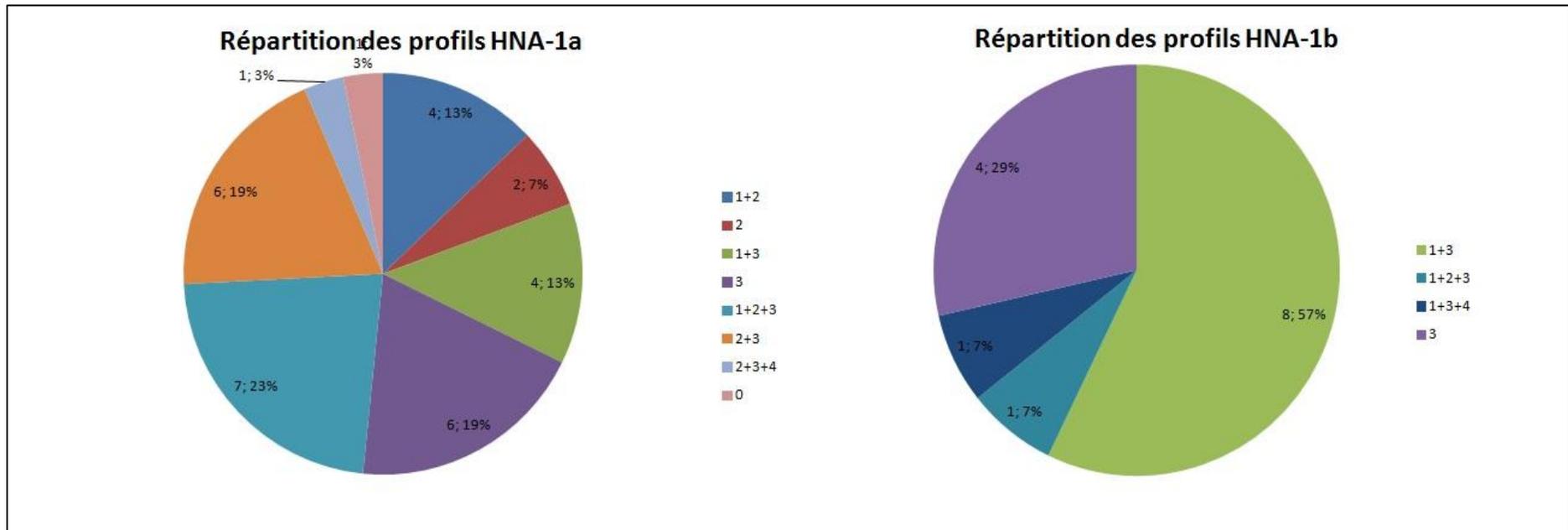


Figure 29 : Répartition des profils de sous-classes d'immunoglobulines G produites par les patients du groupe HNA-1a (panneau de gauche) ou HNA-1b (panneau de droite)

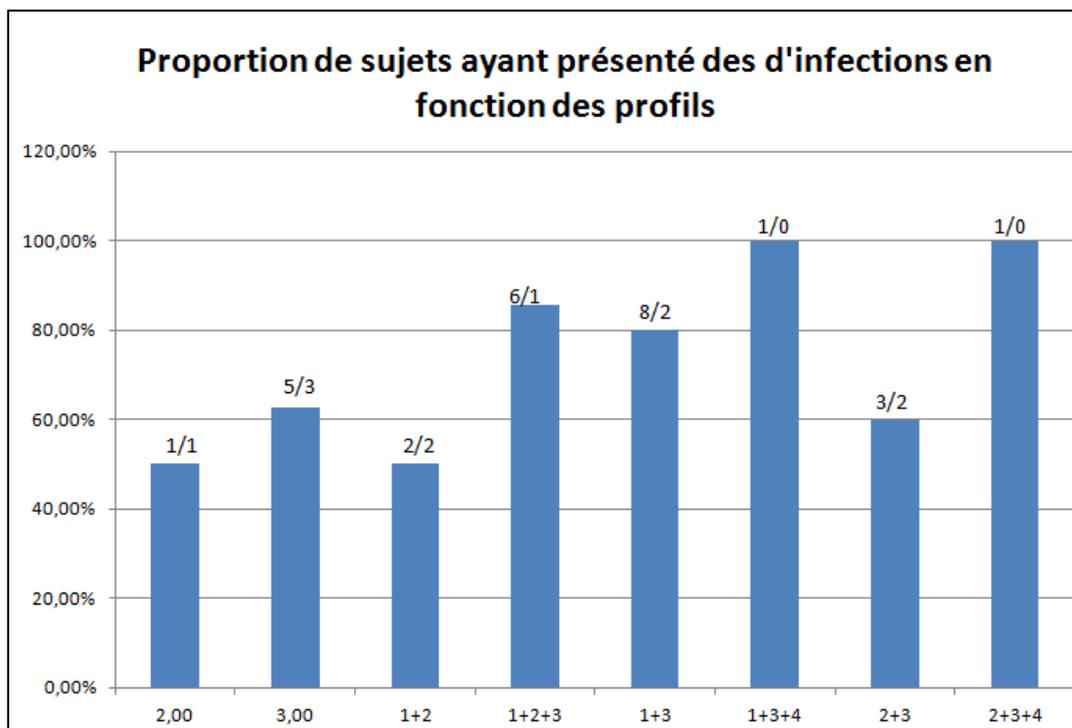


Figure 30 : Proportion de sujets ayant présenté des infections en fonction des profils de sous-classes d'immunoglobulines G produites. Au sommet de chaque colonne, les effectifs du groupe infections/absence d'infections

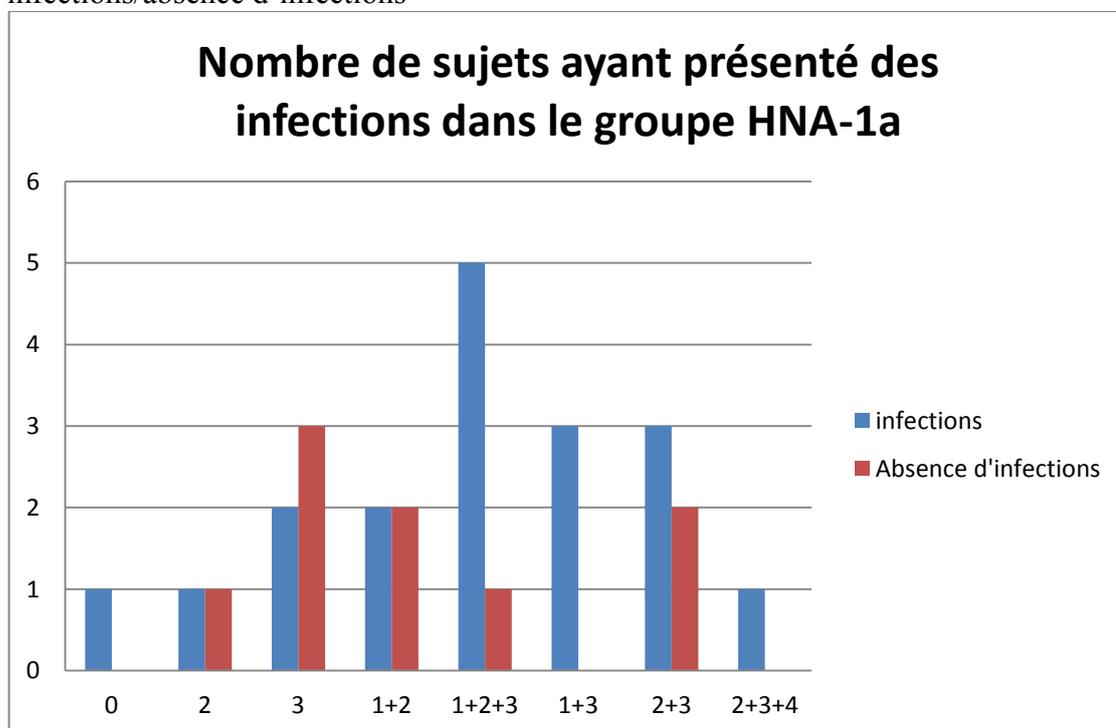


Figure 31: Diagramme représentatif du nombre de sujets ayant présenté des infections dans le groupe HNA-1a, en fonction des profils de sous-classes d'IgG produites

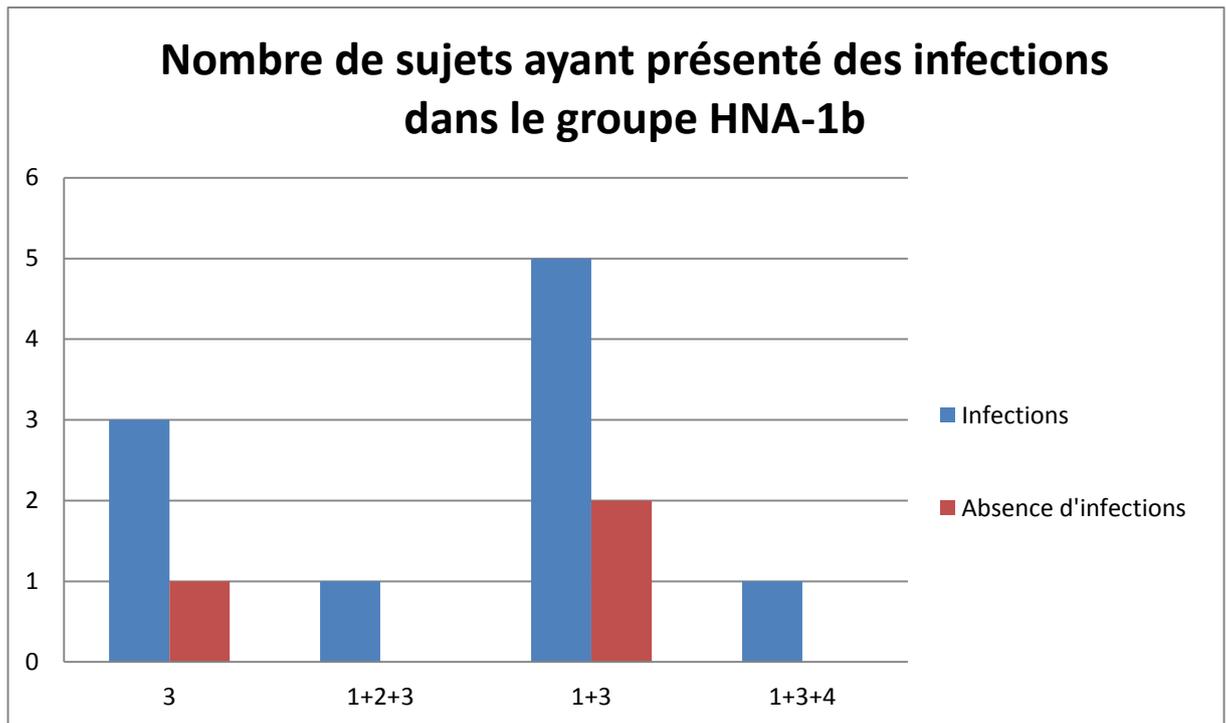


Figure 32: Diagramme représentatif du nombre de sujets ayant présenté des infections dans le groupe HNA-1b, en fonction du profil de sous-classes d'IgG produites.

Précédemment, nous n'avions pas pu démontrer l'impact de la production d'une sous-classe en particulière par rapport aux données cliniques. Nous n'avons pas non plus pu démontrer efficacement un impact clinique significatif en fonction des profils de sous-classes produites. Par conséquent, nous avons souhaité étudier l'impact clinique en fonction du nombre de sous-classes différentes produites. Globalement, il était observé des proportions d'infections plus fortes plus chez les sujets présentant une plus grande variété de sous-classes différentes (**Figure 33**). Cette tendance semblait s'accroître si nous nous intéressions uniquement au groupe HNA-1a (**Figure 34**), ce qui était prévisible du fait de la plus grande hétérogénéité des profils produits chez ces patients par rapport à ceux du groupe HNA-1b. Cependant, aucune différence statistique n'était démontrable du fait du trop faible écart dans les effectifs de chacun des sous-groupes.

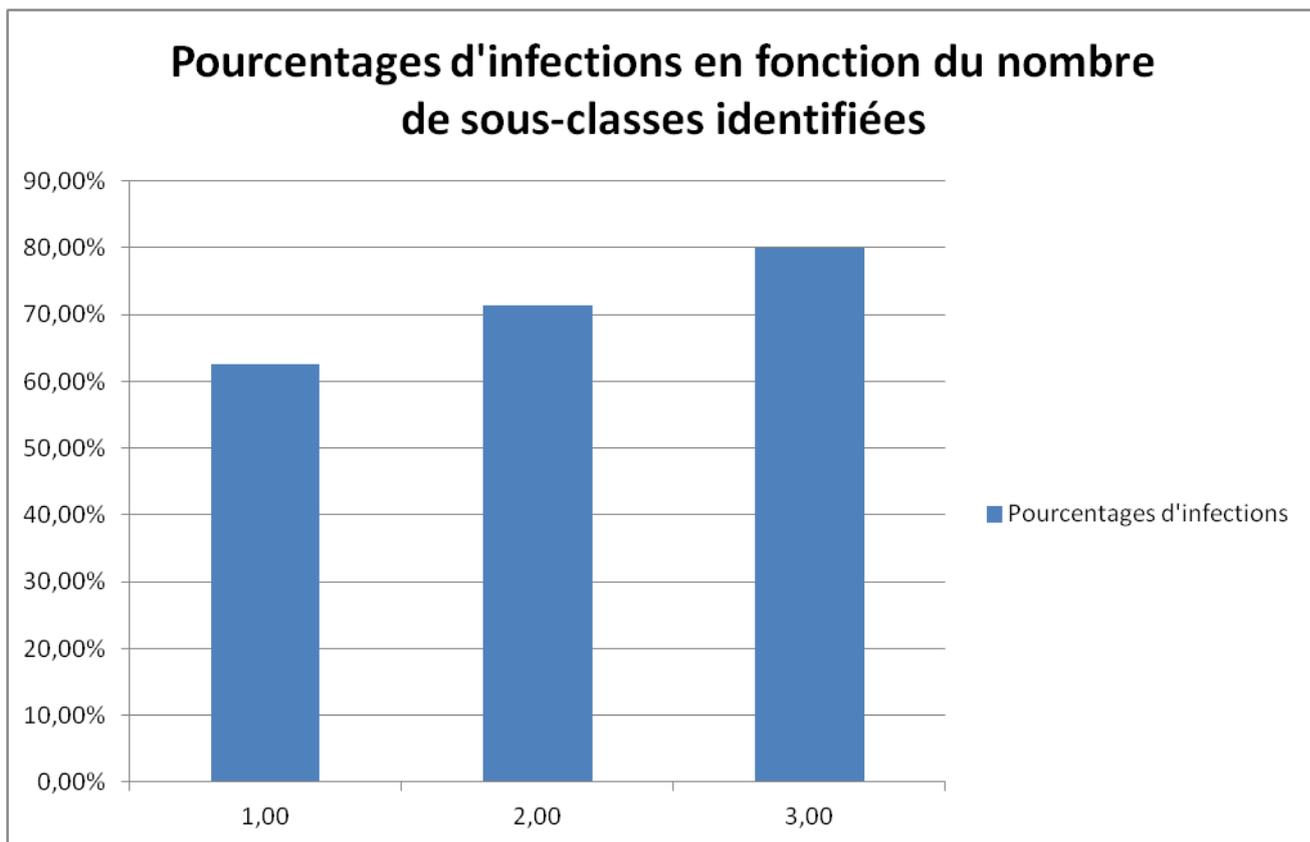


Figure 33: Proportion de sujets ayant présenté des infections en fonction du nombre de sous-classes identifiées, les deux sous-groupes étant confondus

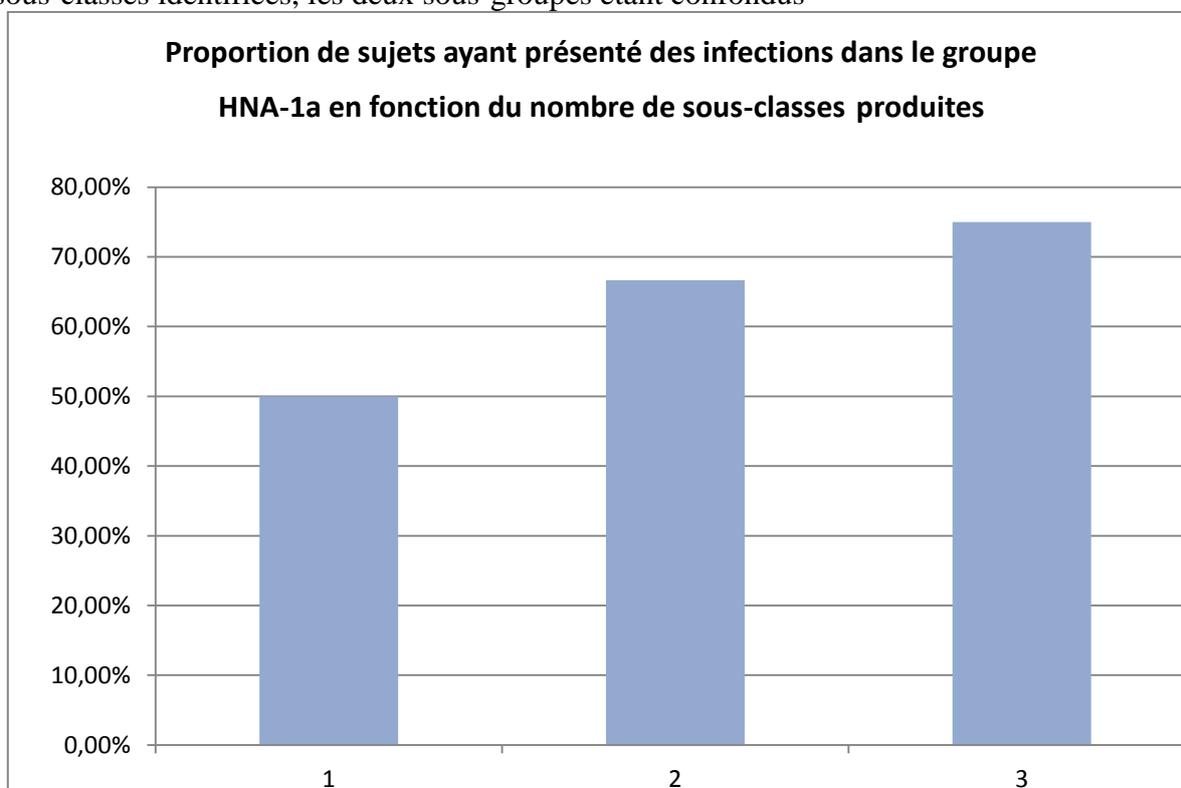


Figure 34 : Proportion de sujets ayant présenté des infections en fonction du nombre de sous-classes identifiées dans le groupe HNA-1a.

En définitive, l'étude des profils a montré une répartition des profils de sous-classes d'IgG produites beaucoup plus homogène dans le groupe HNA-1b par rapport au groupe HNA-1a, mais ces différences de répartition ne permettaient pas de mettre en évidence de conséquences cliniques significatives.

Finalement, l'étude des sous-classes d'IgG a permis de mettre en évidence des différences qualitatives et quantitatives claires entre les deux groupes HNA-1a et HNA-1b. En effet, le groupe HNA-1b présentait des profils plus fréquemment orientés vers les IgG1 et IgG3 et ne produisait que très rarement des IgG2 comparé au groupe HNA-1a, dont les profils étaient plus hétérogènes. Ces différences qualitatives se traduisaient également quantitativement : les patients du groupe HNA-1b produisaient des IgG en plus grande quantité, et l'analyse quantitative des ratio moyens des médianes de fluorescence patient/SAB calculés pour chacune des sous-classes d'IgG ont permis de définir que cette observation était liée à une production d'IgG3 en quantité significativement plus importante. Concernant le groupe HNA-1a, la quantité d'IgG1 produite semblait plus importante que les autres sous-classes. Cependant, ces différences qualitatives et quantitatives observées ne se traduisaient par aucune conséquence clinico-biologique précise.

3 Etude des mécanismes physiopathologiques des auto-anticorps anti-HNA-1a et anti-HNA-1b dans la NAI I

Les données de la littérature ont fourni des informations parfois contradictoires sur les mécanismes de destruction des PNN observés dans la NAI I. En effet, certains auteurs ont montré une lyse des PNN par le complément alors que d'autres n'ont pas retrouvé cette activité. D'autres ont même paradoxalement montré un effet d'allongement de la survie des PNN par les auto-anticorps anti-Fc γ RIIIb. Pour ce travail, nous avons souhaité explorer le mécanisme de lyse par le complément et les effets sur la survie des PNN afin de préciser ces mécanismes dans le contexte de la NAI I et d'évaluer les différences qui pourraient exister chez les patients produisant des anticorps anti-HNA-1a ou HNA-1b

3.1 Lyse des PNN par activation de la voie classique du complément

L'étude des sous-classes d'IgG nous a permis de montrer que les IgG produites étaient différentes entre les deux groupes de patients étudiés. Les principales différences observées portaient sur un profil IgG1 + IgG3 beaucoup plus marqué dans le groupe HNA-1b ainsi que des IgG3 produites en plus grande quantité. Les IgG3 et IgG1 ont comme

caractéristique d’être très efficaces dans l’activation de la voie classique du complément et nous avons souhaité évaluer si ces propriétés pouvaient se traduire par une destruction accrue des PNN par l’intermédiaire de ce mécanisme et estimer s’il était plus important pour les patients du groupe HNA-1b par rapport au groupe HNA-1a.

3.1.1 Lyse

Pour l’étude de lyse par le complément, 8 patients du groupe HNA-1a et 6 patients du groupe HNA-1b ont été testés (**Tableau 11**). Les images obtenues pour chacun des groupes sont illustrées **Figure 35** et **Figure 36** et les résultats obtenus pour chacun des patients sont présentés **Tableau 12**. Pour le groupe HNA-1a, les valeurs moyennes des proportions de cellules mortes étaient de $8.32\% \pm 0.96$, le ratio moyen par rapport au SAB de la proportion de cellules mortes était de 0.91 ± 0.105 . Pour les cellules vivantes, les proportions moyennes de survie étaient de $59.58\% \pm 2.34$, le ratio moyen rapporté au SAB était de 0.95 ± 0.037 . Pour le groupe HNA-1b, les valeurs moyennes des proportions de cellules mortes étaient de $12.30\% \pm 0.72$, le ratio moyen par rapport au SAB était de 0.95 ± 0.055 . Pour les cellules vivantes, les proportions moyennes de survie étaient de $21.15\% \pm 2.53$, le ratio moyen rapporté au SAB était de 0.79 ± 0.095 . Il n’était retrouvé aucune différence significative de lyse par le complément en comparant les ratios normalisés des deux groupes (**Figure 37**).

Patient HNA-1a	Profil	Patients HNA-1b	Profil
1	IgG1 + IgG3	1	IgG3
2	IgG2 + IgG3	2	IgG1 + IgG3
3	IgG3	3	IgG1 + IgG3
4	IgG1 + IgG2	4	IgG1 + IgG3
5	IgG3	5	IgG1 + IgG3
6	IgG2 + IgG3	6	IgG1 + IgG3
7	IgG1 + IgG2 + IgG3		
8	IgG1 + IgG2 + IgG3		

Tableau 11 : Profils de sous-classes d’immunoglobulines G produites par les patients sélectionnés pour l’étude de lyse par le complément.

Par conséquent, concernant spécifiquement la lyse par le complément, les ratios normalisés sur le SAB des proportions de survie ou de mort étaient proches de 1. Devant les images obtenues pour l’étude de lyse et l’absence de recul sur cette technique, il est difficile de conclure sur une lyse par le complément induite par les auto-anticorps anti-HNA-1a ou

anti-HNA-1b. La différence entre les deux groupes étant, de plus, non significative, ce mécanisme de destruction n'apparaît pas important dans cette étude.

Il est également intéressant de noter qu'aucune lyse par le complément des PNN n'a pu être induite significativement, que ce soit par le sérum des patients testés ou bien d'immunoglobulines monoclonales IgG2a de souris dirigées contre les variants HNA-1a ou HNA-1b :

En effet, quelques difficultés ont été observées dans la mise au point de la méthode. Dans un premier temps le témoin négatif devait être réalisé par une incubation des PNN dans du PBS pur pour la première incubation (phase d'opsonisation), puis être mis en présence de RPMI pur sans complément lors de la deuxième étape (phase d'activation et lyse du complément). Cependant, nos premiers résultats ont montré une surmortalité des PNN du témoin négatif par rapport aux puits tests (incubés avec le sérum pour la phase d'opsonisation, puis de complément dilué au tiers pour la phase d'activation du complément). De plus, les PNN semblaient mieux survivre dans du sérum pur que dans du sérum dilué (les taux de mortalité étaient croissants avec la dilution des sérums). L'hypothèse apportée alors était que la survie des PNN devait certainement dépendre de la pression oncotique du sérum différente du PBS. Afin de réduire au maximum les différences de pressions oncotiques pouvant exister entre notre témoin négatif et nos puits tests, nous avons pris la décision de réaliser l'étape d'opsonisation dans du SAB pour le témoin négatif.

Nous avons cependant constaté que cette modification ne nous permettait toujours pas d'obtenir une survie correcte par rapport à nos puits tests et avons fait l'hypothèse que la présence de notre complément (provenant de sérum de lapin) apportait une pression oncotique différente de notre RPMI pur et permettait d'augmenter la survie des PNN. Nous avons alors décidé de réaliser l'étape d'incubation dans du complément dilué au tiers dans du RPMI afin d'obtenir des conditions d'incubations les plus proches possibles de celles utilisées pour les puits tests. La survie des cellules s'en trouvait alors nettement améliorée.

Ensuite, nous avons souhaité tester l'activité du complément utilisé afin de vérifier que l'absence de lyse n'était pas due à un défaut du réactif utilisé. C'est pourquoi, nous avons testé le complément utilisé par dosage du CH50 conformément au protocole utilisé au laboratoire d'Immunologie du CHU de Nantes ce qui nous a permis de confirmer l'efficacité de notre réactif. De plus, afin de nous rapprocher des conditions de réalisation du CH50, nous ayant permis de démontrer l'efficacité du réactif, nous avons préféré réaliser les dilutions de complément dans du tampon véronal, milieu souvent utilisé dans les études de lyse par le complément.

Enfin, afin de vérifier que l'absence de lyse observée dans les puits tests était bien liée à une résistance élevée des PNN au complément, nous avons essayé de réaliser un témoin positif constitué d'IgG2a de souris (IgG murine ayant la plus forte activité d'activation du complément) dirigé contre les antigènes HNA-1a ou HNA-1b de souris. Nous n'avons alors pas non plus observé de lyse, nous confortant dans notre hypothèse initiale.

Par conséquent, alors que notre protocole de base prévoyait de réaliser une dose réponse en réalisant des dilutions des sérums à tester et de calculer une lyse spécifique en réalisant deux témoins négatifs : (l'un avec du PBS pur pour l'étape d'opsonisation et du RPMI pur pour l'étape de lyse, l'autre en ajoutant du complément dilué au tiers dans du RPMI pour l'étape de lyse), le protocole a été modifié largement pour aboutir à la réalisation d'un témoin négatif à base de SAB pour l'étape d'opsonisation, puis du complément dilué au tiers dans du tampon véronal pour l'étape de lyse. Pour les puits tests, alors qu'il était prévu de réaliser l'étape de lyse dans du complément dilué au tiers dans du RPMI, le RPMI a été remplacé par du tampon véronal pour nous assurer une bonne activation du complément.

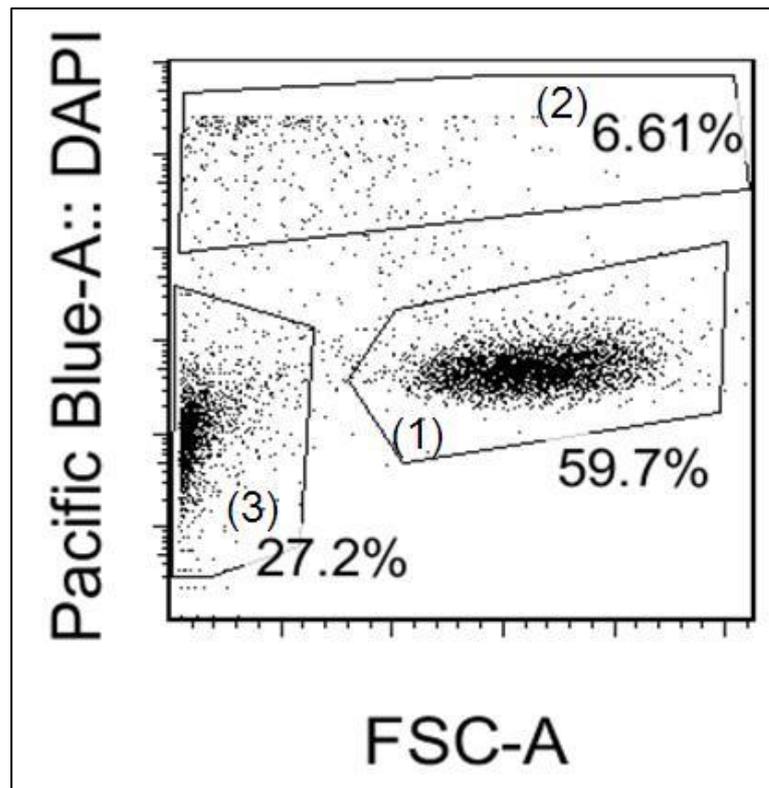


Figure 35: Exemple d'image obtenue pour la technique de lyse par le complément chez un sujet du groupe HNA-1a et après réanalyse sur Flowjo™. En (1), les cellules vivantes. (2) Cellules DAPI positives considérées mortes. (3) Débris cellulaires.

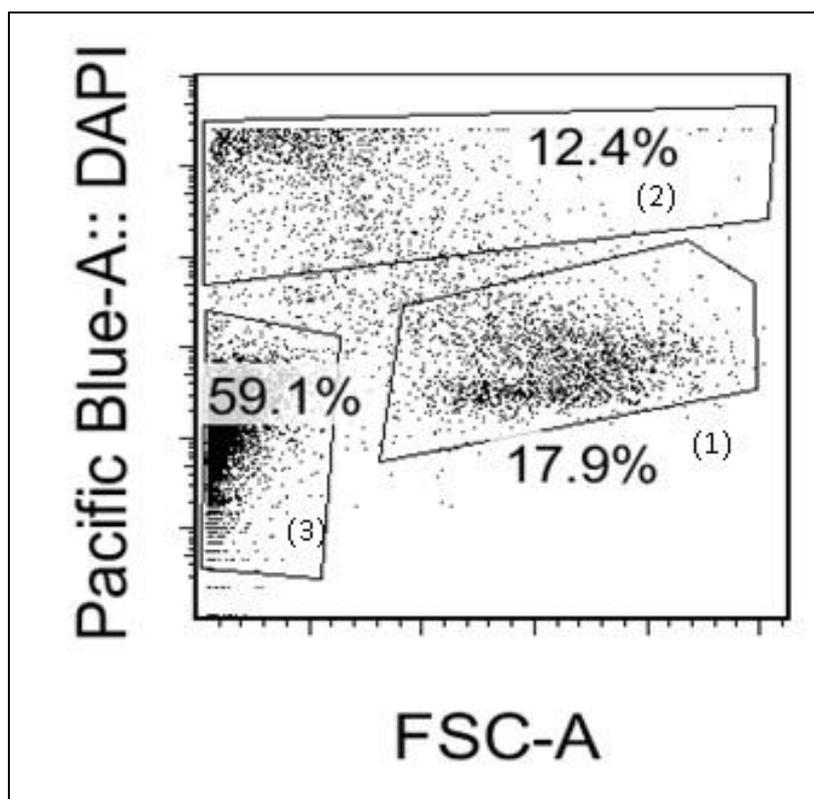


Figure 36: Exemple d’image obtenue pour la technique de lyse par le complément chez un sujet du groupe HNA-1b et après réanalyse sur Flowjo™. En (1), les cellules vivantes. (2) Cellules DAPI positives considérées mortes. (3) Débris cellulaires

Patient	Groupe HNA-1a				Groupe HNA-1b			
	Mortes		Vivantes		Mortes		Vivantes	
	Valeur (%)	Ratio/SAB	Valeur (%)	Ratio/SAB	Valeur (%)	Ratio/SAB	Valeur (%)	Ratio/SAB
1	7,35	0,80	62,20	0,99	11,5	0,891472868	31	1,16541353
2	5,55	0,61	64,20	1,02	12,4	0,96124031	17,9	0,67293233
3	11,80	1,29	60,00	0,95	14,3	1,108527132	21,1	0,79323308
4	5,90	0,64	66,30	1,05	12,7	0,984496124	13,7	0,51503759
5	8,64	0,94	47,60	0,76	9,32	0,72248062	17,8	0,66917293
6	7,69	0,84	64,90	1,03	13,6	1,054263566	25,4	0,95488722
7	6,61	0,72	59,70	0,95				
8	13,00	1,42	51,70	0,82				
SAB	9,17		63		12,9		26,6	

Tableau 12: Présentation des résultats obtenus pour l’étude de lyse par le complément.

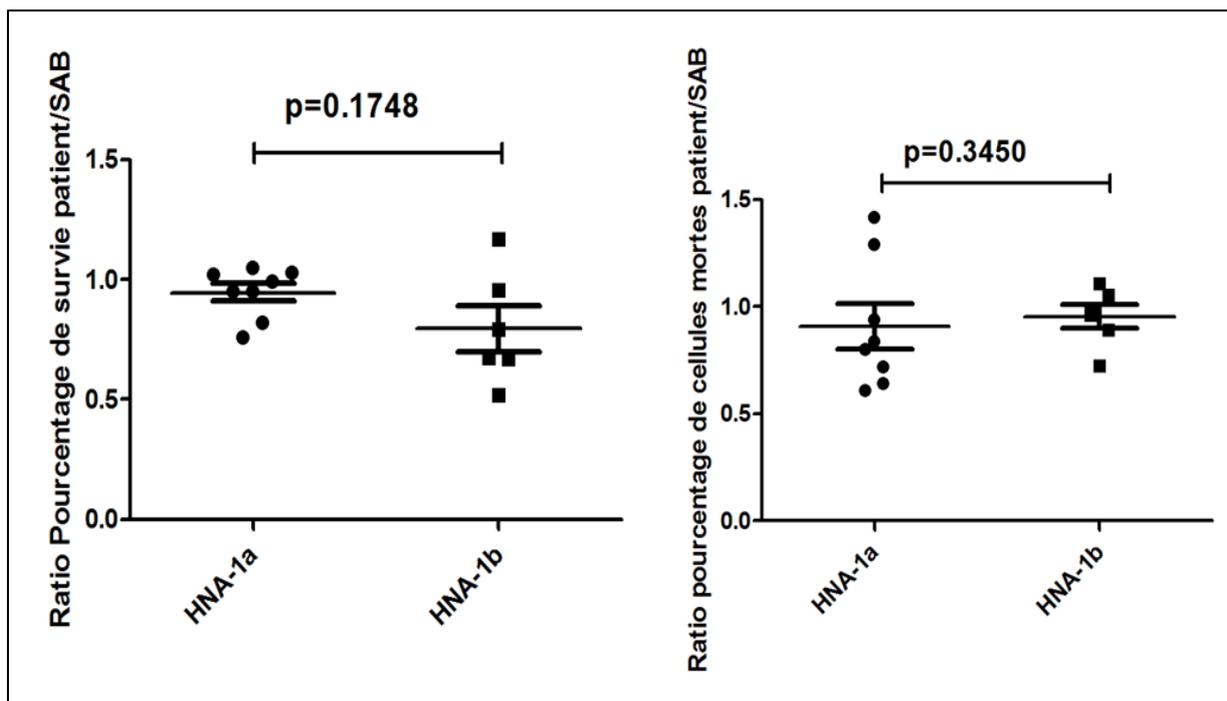


Figure 37: Résultats des comparaisons des ratios normalisés des proportions de cellules mortes par rapport au SAB entre les groupes HNA-1a et HNA-1b. La distribution est représentée par la moyenne \pm SEM.

3.1.2 Dépôt de C3c

Devant l'absence de lyse franche observée lors de l'étude de lyse par le complément, nous avons décidé d'évaluer l'activation du complément. Cette activation était explorée par détection de dépôt de C3c à la surface des PNN préalablement opsonisés par des anticorps anti-HNA-1a ou HNA-1b.

Les images obtenues suite à la technique sont présentées **Figure 38** et **Figure 39**

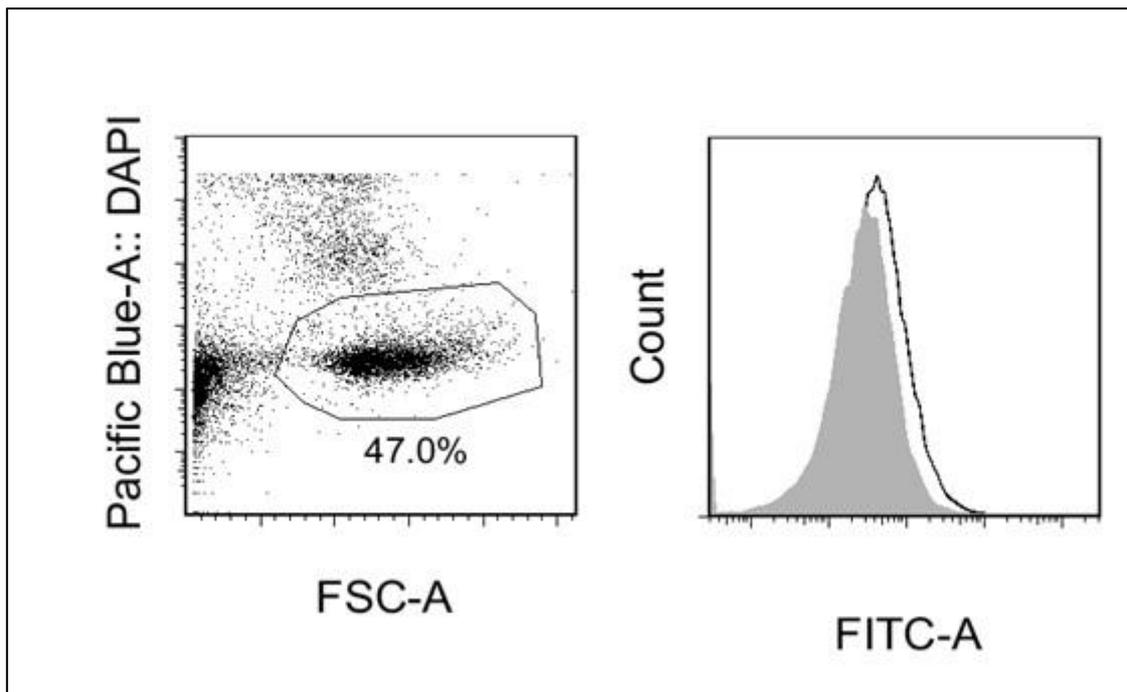


Figure 38 : Exemple d'images obtenues chez un sujet du groupe HNA-1a après réanalyse sur Flowjo™. Le fenêtrage était centré sur les cellules vivantes. La courbe grisée correspondait au signal du SAB. La courbe patient apparaît ici en blanc et noir.

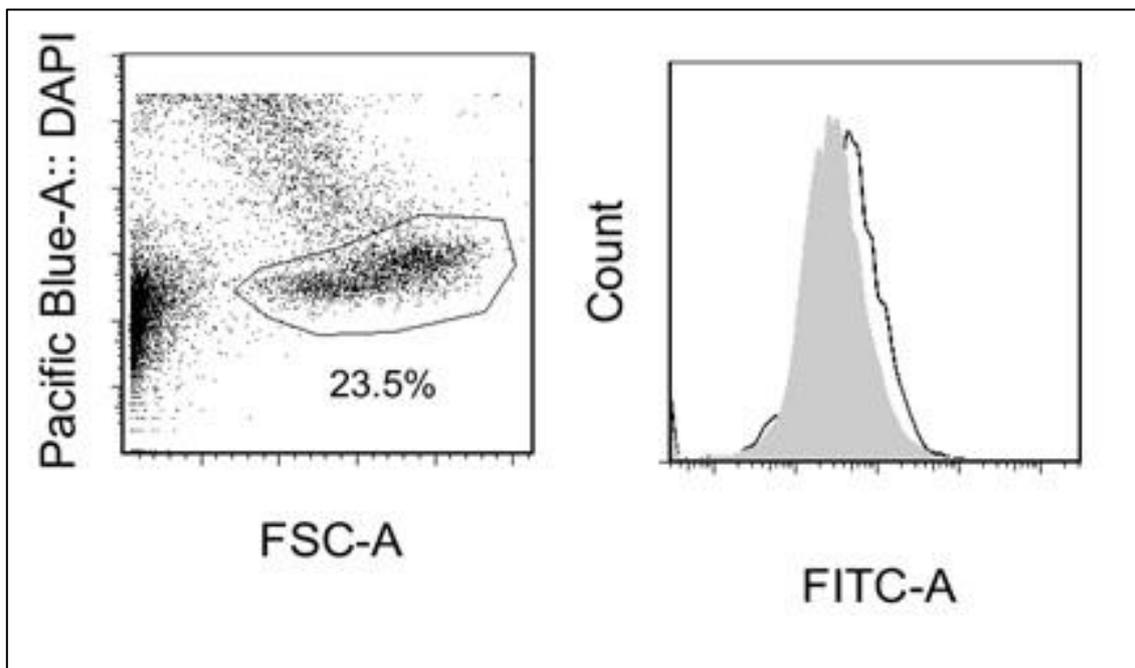


Figure 39 : Exemple d'images obtenues chez un sujet du groupe HNA-1b après réanalyse sur Flowjo™. Le fenêtrage était centré sur les cellules vivantes. La courbe grisée correspondait au signal du SAB. La courbe patient apparaît ici en blanc et noir.

Les résultats de détection du dépôt de C3c sont présentés **Tableau 13**. Pour le groupe HNA-1a, les ratios moyens de fluorescence par rapport au SAB étaient de 1.574 ± 0.467 . Un seul patient de ce groupe semblait présenter un ratio patient/SAB significatif.

Pour le groupe HNA-1b, le ratio moyen de fluorescence par rapport au SAB était de 1.254 ± 0.043 . Aucun patient ne semblait présenter de ratio significativement positif par rapport au signal du SAB. Cependant, un très léger décalage des médianes de fluorescence patients était observé. Ainsi, pour ce groupe, tous les ratios patients/SAB étaient supérieurs à 1.

En terme de comparaison, aucune différence significative n'était observée entre les ratios patients/SAB obtenus pour chacun des groupes HNA-1a ou HNA-1b (**Figure 40**).

Finalement, cette partie du travail a permis de montrer une activation du complément chez un seul des patients testés. L'activation du complément semble donc être présente de façon significative chez certains patients. Cependant, la plus grande majorité d'entre eux ne semble pas activer le complément de manière très franche.

HNA-1a		HNA-1b	
Médiane de fluorescence	Ratio/SAB	Médiane de fluorescence	Ratio/SAB
1291	4,6606498	353	1,242957746
486	1,7545126	345	1,214788732
413	1,4909747	331	1,165492958
299	1,0794224	391	1,376760563
420	1,5162455	323	1,137323944
273	0,9855596	394	1,387323944
159	0,5740072		
147	0,5306859		
277		284	

Tableau 13 : Présentation des résultats obtenus lors de l'étude du dépôt de C3c La dernière ligne correspond aux valeurs du SAB

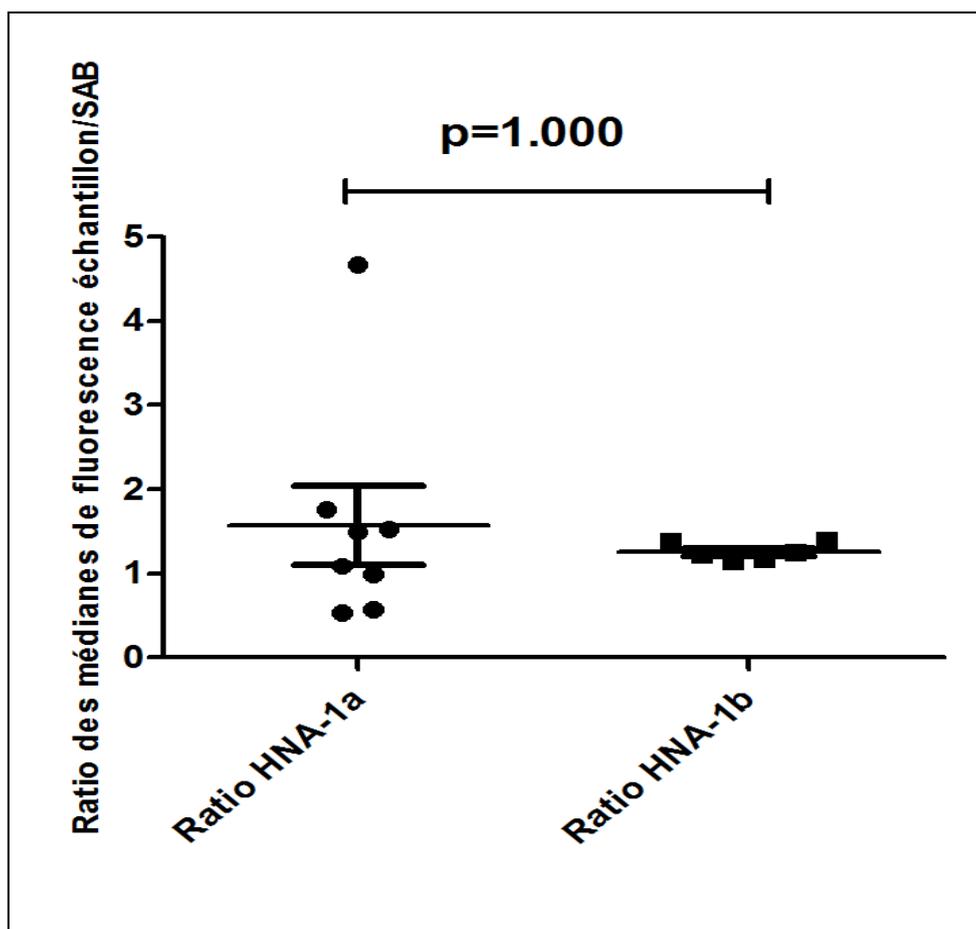


Figure 40 : Figure représentative des médianes de fluorescences obtenues pour l'étude de dépôt de C3c. La distribution est représentée par la moyenne \pm SEM

3.2 Effet sur la survie des polynucléaires neutrophiles

Durand V. et al, lors de leur étude des effets des anticorps anti-Fc γ RIIIb avaient paradoxalement retrouvé une survie accrue des PNN opsonisés. Nous avons décidé d'évaluer cette survie dans notre cohorte, afin de déterminer si leurs résultats étaient reproductibles chez des patients atteints de NAI I.

Les résultats obtenus sont présentés **Tableau 14**. Les images obtenues pour chacun des deux groupes sont illustrées **Figure 41** et **Figure 42**. Pour le groupe HNA-1a, les valeurs moyennes des ratios de proportion cellules mortes par rapport au SAB étaient de 0.55 ± 0.097 , pour les cellules vivantes, ces valeurs étaient de 1.60 ± 0.55 .

Pour le groupe HNA-1b, les valeurs moyennes des ratios de proportion de cellules mortes par rapport au SAB étaient de 0.59 ± 0.11 . Pour le pourcentage de survie, les valeurs moyennes des ratios par rapport au SAB étaient de 3.46 ± 0.48 .

Globalement, aucun effet bénéfique sur la survie n'était démontré de manière significative. Les valeurs de survie des cellules incubées avec du SAB étaient très faibles,

notamment du fait de la durée de vie raccourcie des PNN non fixés in vitro, il était donc difficile de conclure sur une survie significative liée aux auto-anticorps testés.

En termes de comparaison, aucun auto-anticorps ne semblait favoriser la survie des polynucléaires opsonisés par rapport à un autre (**Figure 43**).

Globalement les anticorps anti-HNA-1a ou anti-HNA-1b ne semblaient pas favoriser la survie des PNN opsonisés.

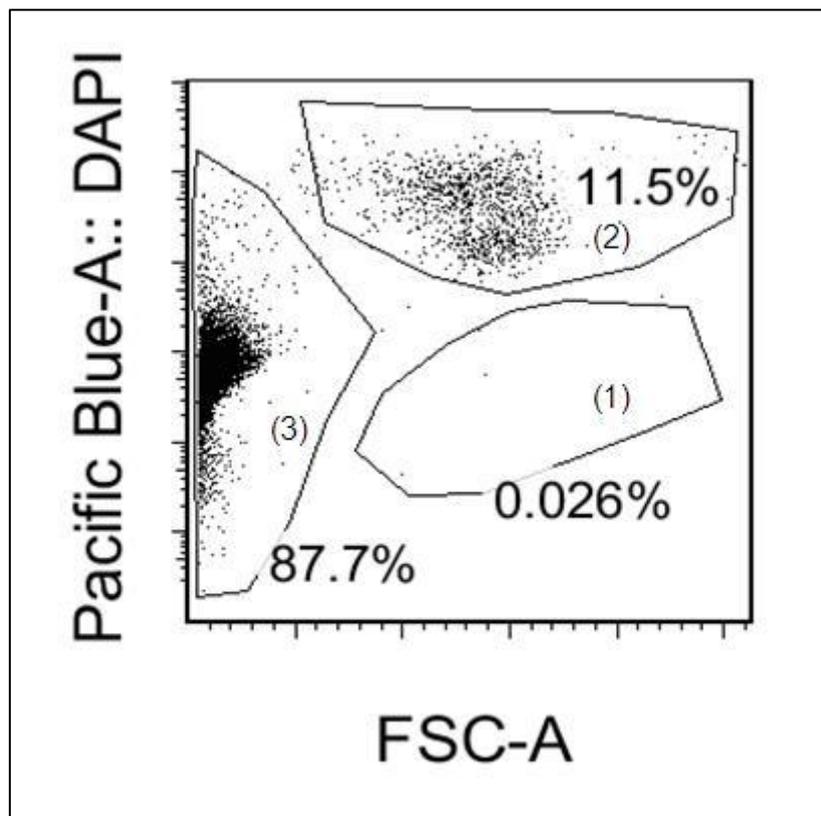


Figure 41: Exemple d'image obtenue chez un sujet du groupe HNA-1a après réanalyse sur Flowjo™. (1) Cellules vivantes ; (2) Cellules DAPI positives considérées mortes ; (3) Débris cellulaires.

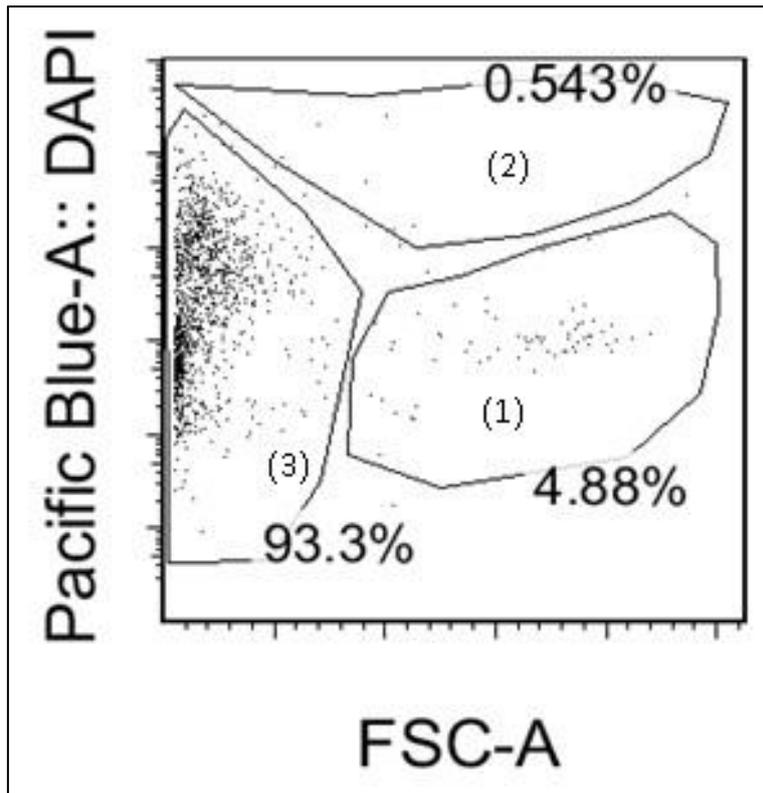


Figure 42 : Exemple d'image obtenue chez un sujet du groupe HNA-1b après réanalyse sur Flowjo™. (1) Cellules vivantes ; (2) Cellules DAPI positives considérées mortes ; (3) Débris cellulaires.

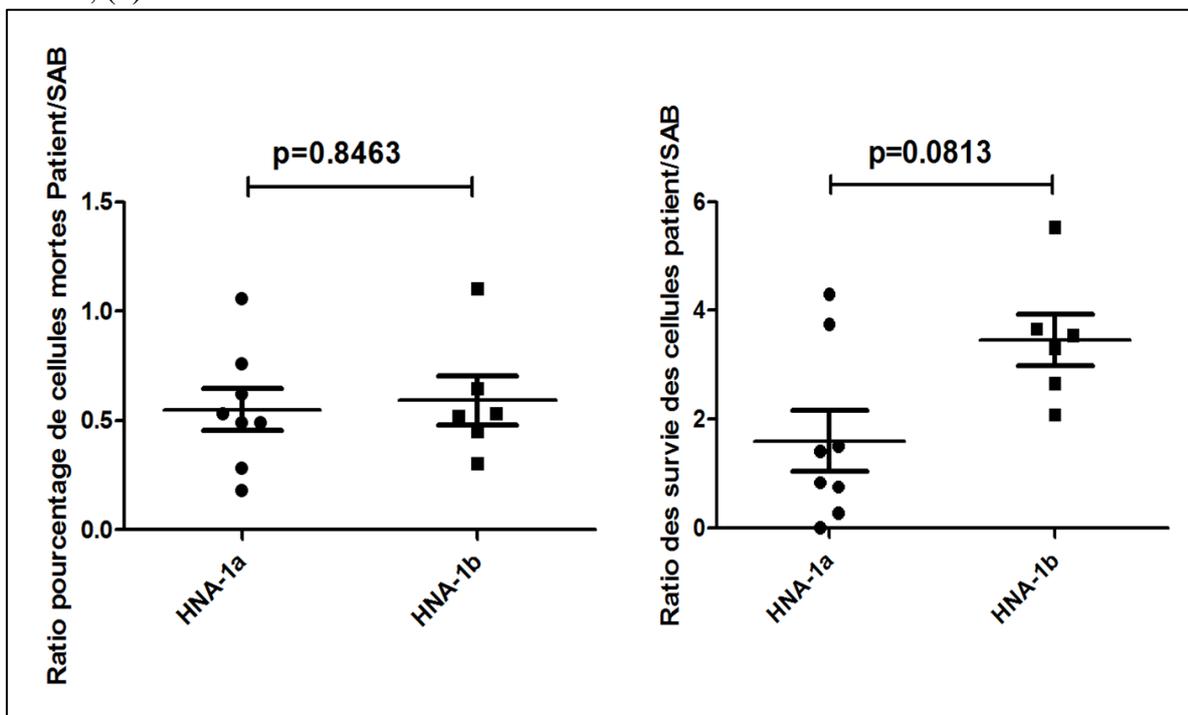


Figure 43 : Résultat des comparaisons des proportions de cellules vivantes (panneau de droite) et mortes (panneau de gauche) pour l'étude de survie. La distribution est représentée par la moyenne \pm SEM.

Groupe HNA-1a				Groupe HNA-1b			
Mortes		Vivantes		Mortes		Vivantes	
Valeur (%)	Ratio/SAB	Valeur (%)	ratio/SAB	Valeur (%)	Ratio/SAB	Valeur (%)	Ratio/SAB
4,02	0,53	0,00	0,00	0,54	0,52	4,88	3,54
1,33	0,18	1,33	4,29	1,16	1,10	3,67	2,66
5,68	0,76	0,26	0,83	0,56	0,53	7,63	5,53
4,65	0,62	0,08	0,27	0,68	0,65	5,04	3,65
3,72	0,49	0,23	0,75	0,32	0,30	4,55	3,30
2,09	0,28	0,47	1,50	0,47	0,45	2,87	2,08
3,71	0,49	0,44	1,41				
7,95	1,06	1,16	3,74				
7,52		0,31		1,05		1,38	

Tableau 14 : Résultats obtenus pour l'étude de survie. La dernière ligne correspond aux valeurs obtenues pour le SAB

Finalement, les résultats obtenus sur la lyse, l'activation du complément et la survie des PNN ne montrent pas d'activation nette du complément. L'exploitation des résultats n'a pas permis de mettre en évidence une activation claire de la voie classique du complément par les anticorps, ni d'effet sur la lyse des PNN. Il n'était pas démontré non plus d'effets significatifs sur la survie des PNN opsonisés. Aucune différence significative n'était obtenue en comparant les résultats des deux groupes de patients testés.

Discussion et perspectives

L'étude présentée avait pour but de préciser les mécanismes de destruction des polynucléaires neutrophiles dans la NAI I, et d'étudier les différences physiopathologiques pouvant exister entre les sujets produisant des anticorps anti-HNA-1a et ceux produisant des anti-HNA-1b.

L'analyse rétrospective des dossiers a permis d'évaluer les différences clinico-biologiques existant entre les deux groupes de patients. Les résultats obtenus ne permettaient pas de mettre en évidence de différences statistiquement significatives mais montraient une tendance à la neutropénie un peu plus marquée chez les sujets du groupe HNA-1b, un âge de diagnostic plus précoce et une tendance aux infections légèrement plus élevée.

L'étude physiopathologique nous a permis de mettre en évidence des différences entre les sous-classes produites par les patients de chacun des deux groupes et nous permettent d'émettre des hypothèses par rapport au développement de la neutropénie. Concernant le mode de destruction des polynucléaires neutrophiles, il apparaît que la lyse par le complément ne joue pas un rôle majeur dans ce mécanisme. Enfin, les anticorps ne paraissent pas provoquer une augmentation de la survie des PNN.

1 Il pourrait exister des différences physiopathologiques entre les patients produisant des anticorps anti-HNA-1a et anti-HNA-1b

Les résultats obtenus dans le typage des sous-classes sont légèrement différents des seuls décrits dans la littérature. En effet Bux J. et al. retrouvaient des IgG1 chez tous les patients testés et des IgG3 chez 75% d'entre eux, aucun ne présentaient des IgG2 ou des IgG4 (Bux et al., 1991b). Cependant, les deux principales limites de son étude étaient, tout d'abord, le fait d'avoir recruté des patients atteints de NAI I et de NAI II sans distinctions, dont les profils pouvaient être différents puis le fait d'avoir fait cette recherche par microscopie optique, la sensibilité de la méthode étant probablement inférieure à celle obtenue en cytométrie en flux. Nos résultats ont montré des médianes de fluorescence d'IgG2 assez faibles, il est donc possible que le mode de détection utilisé par Bux J. et al n'ait pas été assez sensible pour détecter cette sous-classe. L'étude étant ancienne, et les modes de détection et de recrutement de nos patients étant spécifiquement ciblés sur les patients atteints de NAI I, nos résultats permettent de mettre à jour les observations données à ce sujet.

Le principal résultat de notre étude a montré des différences de répartition des profils de sous-classes d'IgG produites par les patients des 2 groupes constitués. En effet, nos résultats ont montré clairement que les patients du groupe HNA-1b ont un profil de sous-classes orienté vers une production préférentielle d'IgG1 et d'IgG3, alors que les patients du groupe HNA-1a ont des profils de production d'IgG beaucoup plus hétérogènes. Il est aujourd'hui assez difficile de relier ces profils à un type de réponse immunitaire en particulier. Les principales études de production d'IgG en fonction des différents types de réponses immunitaires cellulaires ont principalement été effectuées chez la souris. Ainsi, il a été démontré chez la souris que les réponses Th1 produisaient préférentiellement des IgG2a et des IgG3, alors que les IgG1 étaient produites préférentiellement par une réponse Th2 (Snapper and Paul, 1987). Si nous comparons les différentes propriétés des immunoglobulines humaines et murines, il apparaît que les IgG2a et IgG3 de souris sont celles qui activent le plus le complément contrairement aux IgG1. Ainsi, certains auteurs comparent les IgG2a et IgG3 de souris aux IgG1 et IgG3 humaines, et les IgG1 de souris aux IgG2 et 4 humaines, d'autant que la synthèse de ces deux dernières sous-classes sont stimulées par l'IL-4 (Couper et al., 1998). Certains auteurs ont également montré que les IgG1 et IgG3 étaient également présents dans les réponses Th1 (Wang and Li, 2011). Devant ce constat, il est possible d'émettre l'hypothèse que les sujets développant des anticorps anti-HNA-1b aient une réponse immunitaire polarisée vers la voie Th1, alors que les sujets produisant des anti-HNA-1a développeraient une réponse mixte Th1/Th2.

Nous avons ensuite démontré que les ratios de fluorescence patients/SAB des IgG3 étaient beaucoup plus élevés dans le groupe HNA-1b que dans le groupe HNA-1a, pouvant témoigner d'une production de cette sous-classe plus importante dans ce premier groupe. Dans l'étude des dossiers, nous avons également observé un âge de diagnostic plus précoce dans le groupe HNA-1b, des taux de neutrophiles légèrement plus faibles et une tendance aux infections plus élevée. Bien que ces résultats ne soient pas significatifs sur le plan statistique, il serait possible que les patients du groupe HNA-1b, produisant une plus forte quantité d'IgG3, IgG ayant la meilleure affinité pour les récepteurs Fc des IgG, aient un mécanisme de destruction des PNN accru par rapport aux patients du groupe HNA-1a. La littérature a également suggéré que les PNN homozygotes HNA-1b (cf section 2.1.4 de l'Introduction) aient des propriétés fonctionnelles amoindries par rapport aux PNN homozygotes HNA-1a, il est donc possible que ces derniers soient moins fonctionnels et que cela contribue au développement plus précoce d'infections. Ceci pourrait donc expliquer la plus forte

proportion d'infections, l'âge de diagnostic plus précoce, et la moindre diversification des sous-classes des patients du groupe HNA-1a.

Concernant le groupe HNA-1a, nous avons émis l'hypothèse que la production d'IgG2 puisse entrer en compétition vis à vis des autres sous classes d'IgG et inhiber le phénomène de phagocytose, les IgG2 étant la sous-classe la moins affine vis à vis des récepteurs Fc susceptibles d'initier ce mécanisme. Cette inhibition de phagocytose aurait pu expliquer le taux de neutrophiles légèrement plus haut du groupe HNA-1a ainsi que la plus faible proportion d'infections. Cependant les résultats obtenus ne nous ont pas permis de confirmer cette hypothèse, aucune différence n'étant statistiquement significative sur les proportions de sujets ayant développé des infections ou bien sur le type d'infections, la profondeur de la neutropénie ou l'âge. De plus, au sein même du groupe HNA-1a, il ne nous a pas été possible de démontrer un impact significatif de la production d'IgG2 sur le taux de PNN ou le développement d'infections, cette sous-classe d'IgG ne semble donc pas au premier abord influencer le mode de destruction des PNN. Concernant ce point précis, il est possible que la quantité d'IgG2 ne soit pas assez importante pour entrer en compétition avec les autres sous-classes d'IgG. Enfin, Pour ce même groupe il est possible que l'augmentation de la diversité des sous-classes produites puisse jouer un rôle sur le développement d'infections, cette diversité permettant de mettre en jeu un plus grand nombre de mécanismes de destruction. Cependant, cette hypothèse reste à vérifier en incluant un plus grand nombre de patients.

Finalement, concernant les données obtenues sur les sous-classes d'IgG produites, nous avons mis en évidence chez une minorité d'individus une production d'IgG4. Ce type de sous-classe a déjà été mise en évidence dans certaines pathologies auto-immunes et sa présence serait liée à une stimulation antigénique T-dépendante de longue durée (Aalberse et al., 1983) suggérant que la maladie soit installée depuis plus longtemps chez ces patients. Aucune donnée collectée ne permettait cependant d'affirmer cette hypothèse. Il serait par ailleurs intéressant de suivre au long cours certains patients afin d'évaluer ce paramètre dans le cadre spécifique de la NAI I.

2 La lyse par le complément ne serait pas le mécanisme de destruction principal responsable de la neutropénie.

Les résultats obtenus pour ce travail ont montré une incohérence sur le mécanisme de destruction des PNN. En effet, alors qu'il a été observé chez une grande proportion de

patients, et notamment chez ceux du groupe HNA-1b, une production d'IgG1 et d'IgG3 parfois à des taux très élevés, il n'a pas été observé de lyse dépendante du complément chez ces patients. Au cours de ce travail, nous avons également essayé de mettre au point un témoin positif de lyse des PNN. Malgré l'utilisation d'IgG2a de souris dirigées contre ces PNN, et après vérification de la bonne activité du complément utilisé, il n'a pas été possible de mettre au point ce témoin, suggérant une résistance élevée des PNN au complément.

Dans la littérature, il a été démontré de manière assez claire cette résistance. En effet, par des phénomènes de vésiculation, les PNN auraient la capacité d'éliminer les molécules du complexe d'attaque membranaire (CAM) (composant final de la cascade du complément) (Morgan, 1989). Ce phénomène, en plus de conférer aux PNN une résistance au complément, serait également une manière de renforcer leurs propriétés effectrices, par augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 44**). Concernant plus spécifiquement le phénomène de lyse, ces mêmes auteurs n'avaient obtenu qu'un taux de lyse maximal de 50% des PNN en utilisant de fortes doses de complément et avaient constaté que ce taux diminuait très rapidement avec les degrés de dilutions, il est donc également possible que le complément utilisé dans notre étude ne soit pas assez concentré pour induire cette lyse.

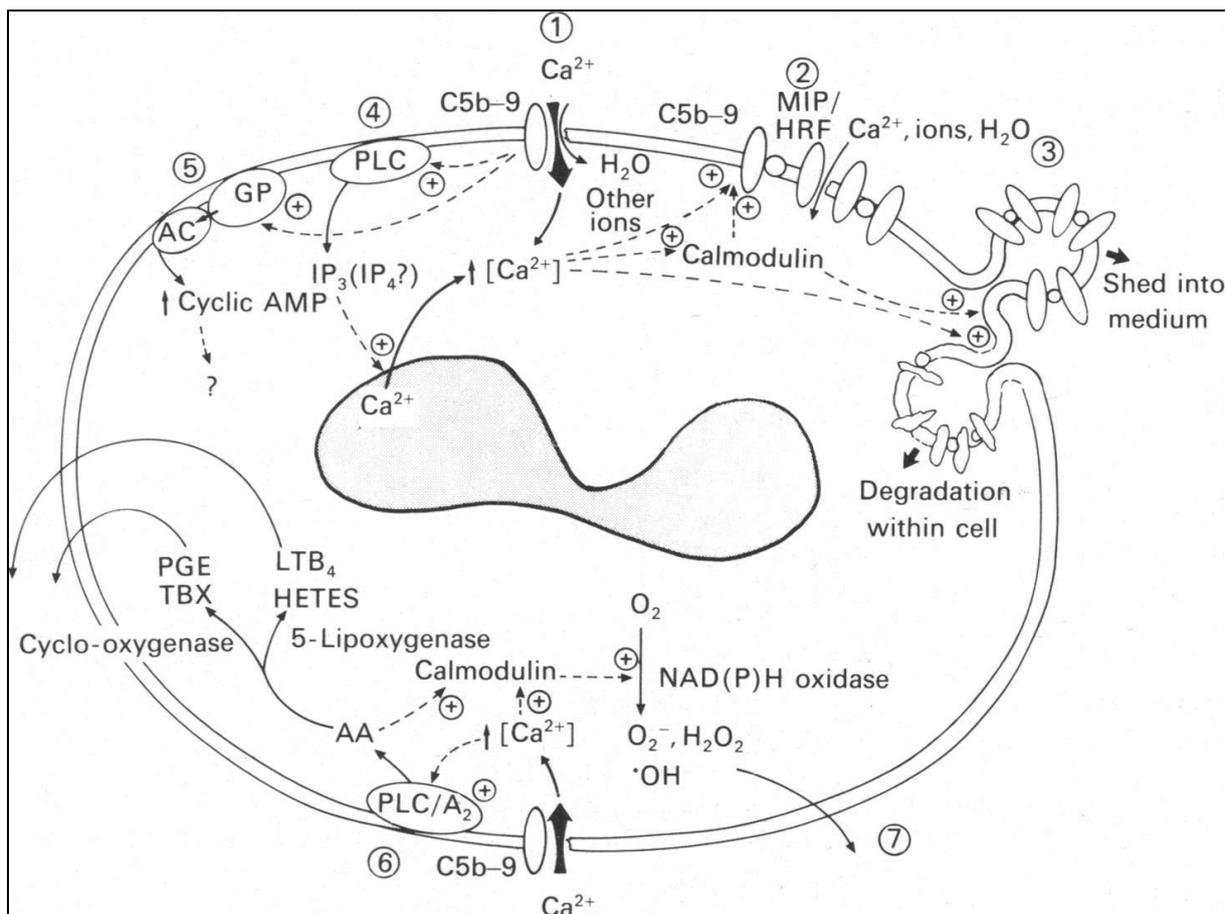


Figure 44: Mécanismes d'échappement à l'action lytique du complément sur les cellules nucléées (Morgan, 1989). L'influx de Calcium causée par la perméabilisation de la membrane nucléaire a plusieurs conséquences①. L'activation de la calmoduline provoquerait l'agrégation du CAM ② et son élimination par endocytose ou exocytose③. L'influx de calcium activerait la phospholipase C (PLC) ④ et l'activation de l'adénylate cyclase via les protéines G et la production d'AMPc⑤ Cet ensemble d'activation aboutit à la synthèse d'acide arachidonique et de ses métabolites⑥ et, par l'intermédiaire de la calmoduline, aboutit à la production d'espèces réactives de l'oxygène⑦

Cependant, contrairement aux résultats obtenus par Bux J. et al. (Bux et al., 1991b) sur ses essais de granulotoxicité, les résultats obtenus dans notre étude et les données de la littérature nous confortent dans l'hypothèse qu'il serait très difficile d'induire une destruction des PNN par la seule action lytique du complément. De plus, cela pourrait expliquer l'absence de lyse par le complément observée par Durand V. et al. (Durand et al., 2001) dans leur étude sur les effets toxiques des anticorps anti-FcγRIIIb ou bien l'absence de toxicité directe du sérum observée chez Nepo et al. (Nepo et al., 1975). Rapporté à la NAI I, il est probable que cette lyse ne soit donc pas le mécanisme principal de destruction des PNN.

Nous avons ensuite essayé d'évaluer l'activation de la voie classique du complément en étudiant le dépôt de C3c à la surface des PNN opsonisés. Les résultats obtenus montrent alors une activation claire du complément chez un seul sujet du groupe HNA-1a. Les légers

décalages obtenus sur l'intégralité des sérums du groupe HNA-1b pourraient témoigner d'un dépôt de complément. Cependant, devant l'absence de recul sur cette technique, et les résultats clairement positifs obtenus chez une patiente de notre étude, il apparaît difficile de conclure à une activation au vu de ces résultats. En revanche, les études sur la résistance de lyse par le complément ont montré que la vésiculation et l'élimination des CAM s'effectuent sur une surface très réduite de la membrane cellulaire, il est également possible que l'élimination des CAM soit associée à une élimination des autres fractions du complément fixées sur la membrane, comme le C3c (Morgan et al., 1987) : il est probable en effet que les autres molécules du complément se déposent à un endroit proche du CAM sur la surface de la cellule ciblée pouvant expliquer l'absence de détection de C3c chez certains patients.

Certains auteurs ont également retrouvé, lors d'une étude du dépôt de CAM à la surface des PNN chez des patients atteints de lupus systémique, une présence de CAM sans fraction C3 associée, pouvant donc laisser supposer que dans certains cas, il est possible de détecter du CAM sans détecter les autres fractions de complément (Curd et al., 1978). Cependant, ces résultats restent anciens et l'explication de cette observation n'a pas été détaillée dans cette publication.

Nos résultats montrent donc que le phénomène de lyse par le complément n'est certainement pas le mécanisme de destruction principal des polynucléaires neutrophiles au cours de la NAI I. Nous n'avons pas pu non plus démontrer clairement une activation de la voie classique du complément chez une majorité des patients, ce qui pourrait provenir d'un défaut de sensibilité de notre mode de détection ou bien d'une élimination conjointe de ces fractions avec le CAM. Il paraît en effet improbable, au vu des résultats des analyses de sous-classes d'immunoglobulines, et notamment au vu du profil orienté vers les IgG1 et les IgG3 du groupe HNA-1b que cette activation n'ait pas lieu.

3 Impact des anticorps sur la survie des PNN

Lors de leur étude sur l'effet des anticorps anti-Fc γ RIIIb, Durand V. et al avaient trouvé un effet positif de ces anticorps sur la survie des PNN opsonisés. Au cours de ce travail, nous avons souhaité évaluer cet effet en incubant des PNN opsonisés pendant 24h à 37°C.

Nos résultats ne nous ont pas permis d'observer une augmentation de survie liée à l'opsonisation des PNN par des auto-anticorps anti-Fc γ RIIIb. Il n'est donc pas possible, avec

nos données, de conclure sur les effets d'un éventuel pontage de ces récepteurs par ces anticorps. Cependant, Durand V. et al. étudiaient les anticorps pan CD16b dont les épitopes ciblés n'étaient pas caractérisés et potentiellement différents de ceux étudiés dans notre travail et il est possible que les anticorps produits dans la NAI I, dont les spécificités sont clairement identifiées n'aient pas les mêmes effets que ceux étudiés par Durand V. et al. En revanche, nous avons également observé une faible survie des cellules témoin nous permettant difficilement de conclure. La modification du protocole d'incubation serait donc un point à revoir afin d'affiner les résultats en obtenant une meilleure survie des contrôles.

En définitive, notre travail apporte des données supplémentaires sur la physiopathologie de la NAI I (**Figure 45**). L'étude des sous-classes aura permis de mettre en évidence des différences physiopathologique entre le groupe HNA-1a et HNA-1b. Ces différences observées n'ont pas pu être confirmée par les données clinico-biologiques ni d'effets différents sur l'induction d'une lyse par le complément ou de la survie des PNN. Concernant spécifiquement la lyse par le complément, ce mécanisme n'apparaît pas comme étant responsable de la destruction des PNN, permettant de laisser supposer que l'opsonisation et la phagocytose soit le principal mode de destruction des PNN. Il serait donc intéressant d'étudier les différences de phagocytose qu'il pourrait exister entre les deux groupes. L'ADCC pourrait également être un mécanisme à étudier. Enfin nos données ne nous ont pas permis d'appuyer l'observation de Durand V. et al. concernant l'effet positif des anticorps sur la survie des PNN.

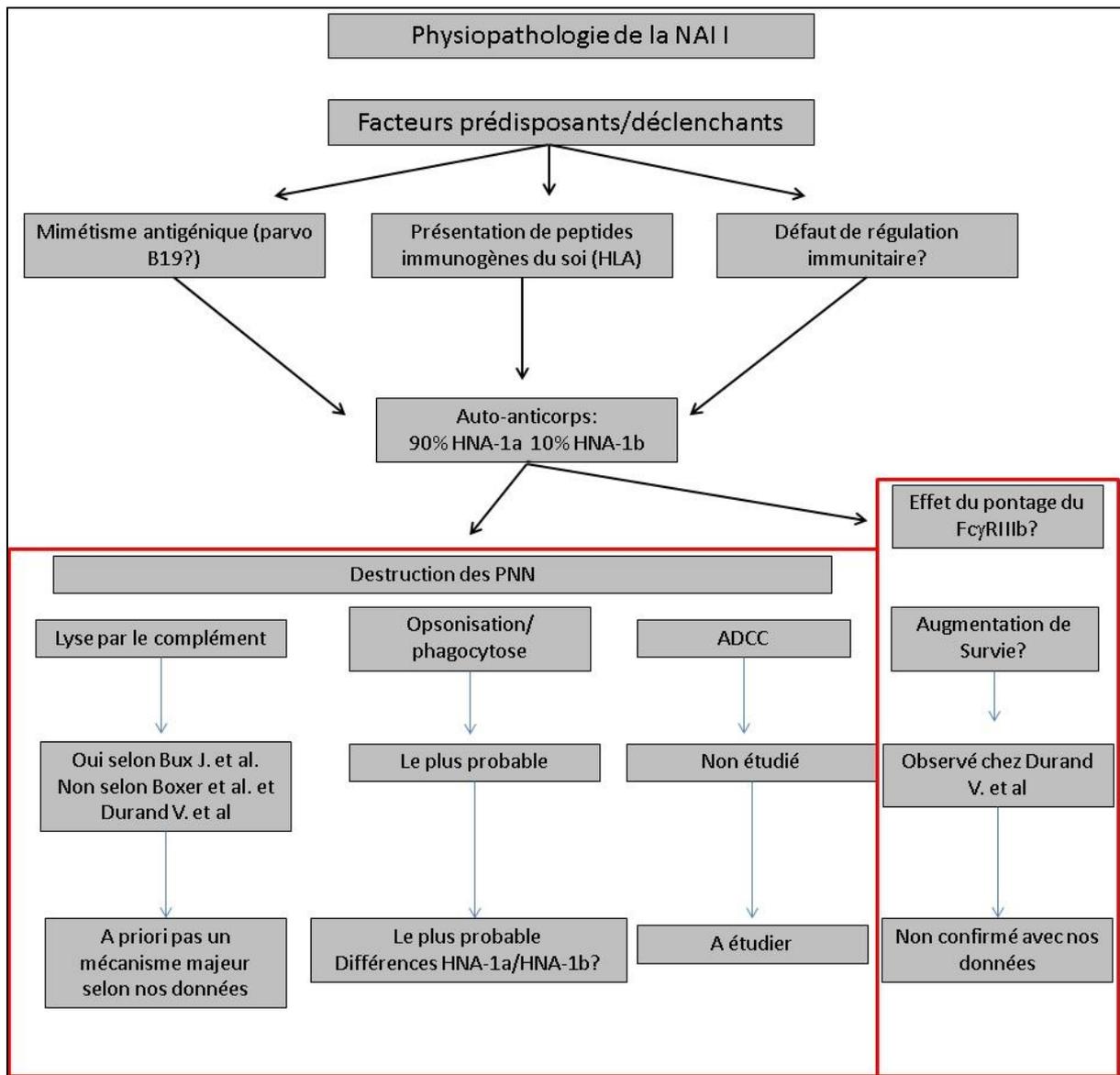


Figure 45 : Schéma représentatif des principales données obtenues sur la NAI I, permettant de compléter les observations décrites dans la littérature.

4 Limites et perspectives

La principale limite de notre étude repose sur le manque de sensibilité obtenu du fait du faible effectif du groupe HNA-1b. En effet, ce trop faible effectif n'a pas permis d'obtenir une puissance statistique suffisante pour mettre en évidence des différences clinico-biologiques significatives. L'augmentation des effectifs des deux groupes, et notamment du groupe HNA-1b pourrait donc permettre de mettre en évidence des différences sur l'âge ou la profondeur de la neutropénie et de comparer plus précisément les différences cliniques qu'il pourrait exister entre les deux groupes, notamment au niveau des infections dont l'analyse détaillée fut très vite limitée.

La deuxième limite repose sur le type d'étude réalisée. En effet, il s'agissait d'une étude rétrospective reposant sur des données collectées il y a parfois plusieurs années et reposant sur la communication d'informations par les services cliniques. Ainsi, il est possible que certaines données clinico-biologiques renseignées soient erronées ou incomplètes du fait d'une impossibilité à contrôler ces informations à posteriori. De plus, nous pouvons constater que certaines données épidémiologiques ne sont pas tout à fait identiques aux résultats obtenus dans ce travail. En effet, Bux J. et al. et Lalezari P. et al retrouvaient un âge moyen de diagnostic de 8 mois alors que nous ne retrouvons un âge moyen de 12 mois pour le groupe HNA-1b et de 17 mois pour le groupe HNA-1a. En revanche, les sex ratios, les proportions d'infections et les taux de neutrophiles observés semblaient concordant. Il serait donc intéressant de récupérer quelques données sur le développement de la maladie chez chacun des patients, afin de voir si cet âge supérieur peut s'expliquer en fonction des pratiques des prescripteurs, notamment sur la démarche diagnostique qui leur a fait évoquer une éventuelle neutropénie auto-immune. Ainsi, la réalisation d'une étude prospective, au long cours permettrait de s'assurer de la fiabilité des informations transmises.

Concernant l'étude des sous-classes, il est important de préciser que l'analyse des sérums n'a été effectuée qu'à un instant « t ». Cependant, une réponse immunitaire est un événement dynamique et il est possible que le profil des sous-classes produites soit modifié dans le temps, notamment pour des pathologies chroniques comme la NAI I. Il a été par exemple parfaitement montré que la production d'IgG4 était liée à une stimulation antigénique de longue durée, suggérant que cette sous-classe soit absente au début de la pathologie mais apparaisse par la suite. Il serait donc intéressant de réitérer les typages de sous-classes d'IgG dans le temps sur quelques patients afin d'évaluer la modification des profils.

L'étude du complément serait également à compléter. En effet, bien que les données de la littérature nous confortent sur le fait que l'absence de lyse des PNN observée par le complément soit parfaitement logique du fait de leurs mécanismes de résistance, les résultats sur l'étude de dépôt de C3c restent incohérents par rapport aux profils des sous-classes d'IgG synthétisées dans chacun des deux groupes, nos données ne nous permettant pas de montrer clairement une activation de la voie classique du complément. Il serait donc intéressant de compléter cette étude d'activation par détection d'autres fractions du complément notamment le C3b, ou bien les fractions C5 à C9, constituantes du CAM.

La principale limite observée sur l'étude de survie reste le très faible taux de survie observé du puit témoin. En effet, les ratios de survie observés du SAB étaient de 0.31% pour

le groupe HNA-1a et 1.38% pour le groupe HNA-1b. Devant ce fort taux de lyse spontanée il apparaissait difficile d'interpréter de manière fiable les résultats. Une mise au point plus poussée de la technique apparaît donc nécessaire afin d'interpréter correctement les valeurs de survie des PNN mis en présence des sérums de patients atteints de NAI I.

Enfin, notre étude n'a exploré qu'une partie des mécanismes pouvant intervenir dans la destruction des PNN survenant au cours de la NAI I. Il est donc possible d'envisager d'explorer d'autres voies de destruction, notamment l'opsonisation et la phagocytose qui apparaît, au vu de nos résultats sur la lyse, comme le principal mode de destruction des PNN. Il serait d'autant plus intéressant de travailler sur ce sujet que les profils de sous-classes produites par les deux groupes de patients apparaissent différents. Les capacités à interagir avec les récepteurs Fc des macrophages dépendants des sous-classes, il serait possible d'observer des différences et notamment chez les patients produisant ou non des IgG2. Finalement, il n'est pas exclu non plus que l'opsonisation des PNN puisse provoquer des dysfonctionnements qualitatifs de ces cellules. Il serait donc également intéressant d'étudier l'effet de cette opsonisation sur les capacités de phagocytose, de dégranulation ou d'adhérence des PNN.

Conclusion

Finalement, ce travail permet d'approfondir les mécanismes de destruction des PNN au cours de la NAI I et d'envisager des possibles différences clinico-biologique entre les sujets développant des anticorps anti-HNA-1a ou HNA-1b

L'étude rétrospective clinico-biologique n'a pas permis de mettre en évidence de différences claires entre les deux groupes de patients HNA-1a ou HNA-1b. Cependant, en augmentant les effectifs et en réalisant une enquête prospective détaillée, il serait possible de faire ressortir des différences plus claires et de compléter les conséquences cliniques observées dans les deux groupes.

Concernant l'étude physiopathologique, nous avons mis en évidence des différences entre les profils des sous-classes d'IgG produites par les sujets développant des anticorps anti-HNA-1b par rapport aux anti-HNA-1a. Nous n'avons pas pu démontrer de conséquences sur la lyse par le complément ni sur la survie des PNN des différences de répartition des profils. Cependant, l'analyse de la littérature et nos données expérimentales laissent penser que le mécanisme de destruction des PNN au cours de la NAI I ne ferait pas intervenir la voie du complément.

Enfin ces résultats permettent d'appréhender la NAI I sous un angle nouveau, et de laisser envisager qu'il pourrait exister des différences autres que celles soulevées dans ce travail entre les patients développant des anticorps anti-HNA-1a ou HNA-1b.

Bibliographie

- Aalberse, R.C., Dieges, P.H., Knul-Bretlova, V., Vooren, P., Aalbers, M., and van Leeuwen, J. (1983). IgG4 as a blocking antibody. *Clin. Rev. Allergy* 1, 289–302.
- Audrain, M., Martin, J., Fromont, P., Prié, N., Thomas, C., and Muller, et J.-Y. (2011). Autoimmune neutropenia in children: analysis of 116 cases: Autoimmune neutropenia in children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 22, 494–496.
- Autrel-Moignet, A., and Lamy, T. (2014). Autoimmune neutropenia. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 43, e105–e118.
- Bayat, B., Werth, S., Sachs, U.J.H., Newman, D.K., Newman, P.J., and Santoso, S. (2010). Neutrophil Transmigration Mediated by the Neutrophil-Specific Antigen CD177 Is Influenced by the Endothelial S536N Dimorphism of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1. *J. Immunol.* 184, 3889–3896.
- Berliner, N., Horwitz, M., and Loughran, T.P. (2004). Congenital and acquired neutropenia. *ASH Educ. Program Book 2004*, 63–79.
- Bierling, P., Poulet, E., Fromont, P., Seror, T., Bracq, C., and Duedari, N. (1990). Neutrophil-specific antigen and gene frequencies in the French population.pdf. *Transfusion (Paris)* 30, 848–849.
- Boros, P., Odin, J.A., Muryoi, T., Masur, S.K., Bona, C., and Unkeless, J.C. (1991). IgM anti-Fc gamma R autoantibodies trigger neutrophil degranulation. *J. Exp. Med.* 173, 1473–1482.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daëron, M. (2008). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716–3725.
- Bruin, M.C., Borne, A.E.K. von dem, Tamminga, R.Y., Kleijer, M., Buddelmeijer, L., and de Haas, M. (1999). Neutrophil antibody specificity in different types of childhood autoimmune neutropenia. *Blood* 94, 1797–1802.
- Buchbinder, D., Nugent, D., and Fillipovich, A. (2014). Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl. Clin. Genet.* 55.
- Buckner, J.H. (2010). Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 849–859.
- Bux, J. (1999). Nomenclature of granulocyte alloantigens. ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, Granulocyte Antigen Working Party. International Society of Blood Transfusion. *Transfusion (Paris)* 39, 662–663.
- Bux, J. (2008). Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang.* 94, 277–285.
- Bux, J., Mueller-Eckhardt, G., and Mueller-Eckhardt, C. (1991a). Autoimmunization against the neutrophil-specific NA1 antigen is associated with HLA-DR2. *Hum. Immunol.* 30, 18–21.
- Bux, J., Kissel, K., Nowak, K., Spengel, U., and Mueller-Eckhardt, C. (1991b). Autoimmune neutropenia: clinical and laboratory studies in 143 patients. *Ann. Hematol.* 63, 249–252.

- Bux, J., Kober, B., Kiefel, V., and Mueller-Eckhardt, C. (1993). Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfus. Med.* 3, 157–162.
- Bux, J., Behrens, G., Jaeger, G., and Welte, K. (1998). Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases. *Blood* 91, 181–186.
- Cardoso, S.P., Chong, W., Lucas, G., Green, A., and Navarrete, C. (2013). Determination of human neutrophil antigen-1, -3, -4 and -5 allele frequencies in English Caucasoid blood donors using a multiplex fluorescent DNA-based assay. *Vox Sang.* 105, 65–72.
- Chuang, F.Y.S., Sassaroli, M., and Unkeless, J.C. (2000). Convergence of Fc Receptor IIA and Fc Receptor IIIB Signaling Pathways in Human Neutrophils. *J. Immunol.* 164, 350–360.
- Couper, J.J., Harrison, L.C., Aldis, J.J., Colman, P.G., Honeyman, M.C., and Ferrante, A. (1998). IgG subclass antibodies to glutamic acid decarboxylase and risk for progression to clinical insulin-dependent diabetes. *Hum. Immunol.* 59, 493–499.
- Curd, J.G., Sundsmo, J.S., Kolb, W.P., Bluestein, H.G., and Müller-Eberhard, H.J. (1978). Neoantigen of the membrane attack complex of human complement. *Arthritis Rheum.* 21, 177–182.
- Donadieu, J., Fenneteau, O., Beaupain, B., Mahlaoui, N., and Chantelot, C.B. (2011). Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis* 6, 26–26.
- Durand, V., Pers, J.O., Renaudineau, Y., Saraux, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2001). Differential effects of anti-Fc gamma RIIIb autoantibodies on polymorphonuclear neutrophil apoptosis and function. *J. Leukoc. Biol.* 69, 233–240.
- Farruggia, P., and Dufour, C. (2014). Diagnosis and management of primary autoimmune neutropenia in children: insights for clinicians. *Ther. Adv. Hematol.* 2040620714556642.
- Fioredda, F., Calvillo, M., Bonanomi, S., Coliva, T., Tucci, F., Farruggia, P., Pillon, M., Martire, B., Ghilardi, R., Ramenghi, U., et al. (2011). Congenital and acquired neutropenia consensus guidelines on diagnosis from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *Pediatr. Blood Cancer* 57, 10–17.
- Fioredda, F., Calvillo, M., Burlando, O., Riccardi, F., Caviglia, I., Tucci, F., Bonanomi, S., Ghilardi, R., Martire, B., Farruggia, P., et al. (2013). Infectious Complications In Children With Severe Congenital, Autoimmune Or Idiopathic Neutropenia: A Retrospective Study From The Italian Neutropenia Registry. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 32, 410–412.
- Flesch, B.K. (2015). Human neutrophil antigens: a nomenclature update based on new alleles and new antigens. *ISBT Sci. Ser.* 10, 243–249.
- Gorlin, R.J., Gelb, B., Diaz, G.A., Lofsness, K.G., Pittelkow, M.R., and Fenyk, J.R. (2000). WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am. J. Med. Genet.* 91, 368–376.

- Greinacher, A., Wesche, J., Hammer, E., Fürll, B., Völker, U., Reil, A., and Bux, J. (2010). Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. *Nat. Med.* *16*, 45–48.
- de Haas, M., Kleijer, M., Van Zwieten, R., Roos, D., and Borne, A.E. Von dem (1995). Neutrophil Fc gamma RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood* *86*, 2403–2413.
- Haddy, T.B., Rana, S.R., and Castro, O. (1999). Benign ethnic neutropenia: what is a normal absolute neutrophil count? *J. Lab. Clin. Med.* *133*, 15–22.
- Hauck, B., Philipp, A., Eckstein, R., Ott, S., Zimmermann, R., Dengler, T., and Zingsem, J. (2011). Human neutrophil alloantigen genotype frequencies among blood donors with Turkish and German descent. *Tissue Antigens* *78*, 416–420.
- He, J., Zhang, W., Wang, W., Chen, N., Han, Z., He, J., Zhu, F., and Lv, H. (2014). Genotyping of human neutrophil antigens by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Blood Transfus.* *12*, s292.
- Hogg, N. (1988). The structure and function of Fc receptors.pdf. *Immunol. Today* *9*, 185–187.
- Jiang, A.-F., and Lalezari, P. (1975). A micro-technique for detection of leukocyte agglutinins. *J. Immunol. Methods* *7*, 103–108.
- Kaset, C., Leetrakool, N., Intharanut, K., and Nathalang, O. (2013). Frequency of *FCGR3B* Alleles in Thai Blood Donors. *Ann. Lab. Med.* *33*, 426.
- Labor für Leukozytenimmunologie - Untersuchungsergebnisse Leuko11 - Fallbeispiel Neonatale Immunneutropenie (NIN)_2 - DRK-Blutspendedienst West der Landesverbände Nordrhein-Westfalen, Westfalen-Lippe, Rheinland-Pfalz und Saarland [Internet]. [cité 20 sept 2015]. Disponible sur: https://www.blutspendedienst-west.de/ueber_uns/zentren_einrichtungen/leukozytenimmunologie/fallbeispiel-nin.php
- Lalezari, P., Khorshidi, M., and Petrosova, M. (1986). Autoimmune neutropenia of infancy. *J. Pediatr.* *109*, 764–769.
- Lucas, G., Rogers, S., De Haas, M., Porcelijn, L., and Bux, J. (2002). Report on the Fourth International Granulocyte Immunology Workshop: progress toward quality assessment. *Transfusion (Paris)* *42*, 462–468.
- Lyall, E.G., Lucas, G.F., and Eden, O.B. (1992). Autoimmune neutropenia of infancy. *J. Clin. Pathol.* *45*, 431–434.
- Mantel, P.-Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Molecular Mechanisms Underlying FOXP3 Induction in Human T Cells. *J. Immunol.* *176*, 3593–3602.
- Matsushashi, M., Tsuno, N.H., Kawabata, M., Mishima, Y., Okochi, N., Santoso, S., Tozuka, M., and Takahashi, K. (2012). The frequencies of human neutrophil alloantigens among the Japanese population: HNA frequency in Japan. *Tissue Antigens* *80*, 336–340.

- McClain, K., Estrov, Z., Chen, H., and Mahoney, D.H. (1993). Chronic neutropenia of childhood: frequent association with parvovirus infection and correlations with bone marrow culture studies. *Br. J. Haematol.* *85*, 57–62.
- Morgan, B.P. (1989). Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem. J.* *264*, 1–14.
- Morgan, B.P., Dankert, J.R., and Esser, A.F. (1987). Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *138*, 246–253.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology* (New York: Garland Science).
- Muschter, S., Berthold, T., and Greinacher, A. (2011). Developments in the definition and clinical impact of human neutrophil antigens: *Curr. Opin. Hematol.* *18*, 452–460.
- Nagarajan, S., Chesla, S., Cobern, L., Anderson, P., Zhu, C., and Selvaraj, P. (1995). Ligand Binding and Phagocytosis by CD16 (Fc Receptor III) Isoforms: PHAGOCYTOTIC SIGNALING BY ASSOCIATED AND SUBUNITS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS. *J. Biol. Chem.* *270*, 25762–25770.
- Nakamura, K., Miki, M., Mizoguchi, Y., Karakawa, S., Sato, T., and Kobayashi, M. (2009). Deficiency of regulatory T cells in children with autoimmune neutropenia. *Br. J. Haematol.* *145*, 642–647.
- Nazziruddin, B., Duffy, B., Tucker, J., and Mohanakumar, T. (1992). Evidence for cross-regulation of FcγRIIIb (CD16) receptor mediated signaling by FcγRII (CD32) expressed on polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* *149*, 3702–3709.
- Nepo, A.G., Gunay, U., Boxer, L.A., and Honig, G.R. (1975). Autoimmune neutropenia in an infant. *J. Pediatr.* *87*, 251–254.
- Nielsen, K.R., Koelbaek, M.D., Varming, K., Baech, J., and Steffensen, R. (2012). Frequencies of HNA-1, HNA-3, HNA-4, and HNA-5 in the Danish and Zambian populations determined using a novel TaqMan real time polymerase chain reaction method: HNA genotyping - a novel Q-PCR method. *Tissue Antigens* *80*, 249–253.
- Ory, P.A., Goldstein, I.M., Kwoh, E.E., and Clarkson, S.B. (1989). Characterization of polymorphic forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J. Clin. Invest.* *83*, 1676–1681.
- Oueslati Belhaj Hassine, M., Ennafaa, H., Kalai, S., Kibech, R., Sellami, M.H., Bouzid, L., Kaabi, S., and Abid, S. (2012). FCGR3B allele frequencies in Tunisians of sub-Saharan origin. *Transfus. Clin. Biol.* *19*, 60–63.
- Person, R.E., Li, F.-Q., Duan, Z., Benson, K.F., Wechsler, J., Papadaki, H.A., Eliopoulos, G., Kaufman, C., Bertolone, S.J., Nakamoto, B., et al. (2003). Mutations in proto-oncogene GF11 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat. Genet.* *34*, 308–312.
- Roques, G., Munzer, M., Barthez, M.-A.C., Beaufils, S., Beaupain, B., Flood, T., Keren, B., Bellanné-Chantelot, C., and Donadieu, J. (2014). Neurological findings and genetic

alterations in patients with Kostmann syndrome and *HAXI* mutations: Severe Chronic Neutropenia Associated With *HAXI* Mutations. *Pediatr. Blood Cancer* 61, 1041–1048.

Salmon, J.E., Edberg, J.C., and Kimberly, R.P. (1990). Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J. Clin. Invest.* 85, 1287–1295.

Salmon, J.E., Brogle, N.L., Edberg, J.C., and Kimberly, R.P. (1991). Fc gamma receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fc gamma receptor II. *J. Immunol.* 146, 997–1004.

Snapper, C.M., and Paul, W.E. (1987). Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944–947.

van Sorge, N., van der Pol, W.-L., and van de Winkel, J.G.. (2003). FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens* 189–202.

Sun, Y., and Xi, Y. (2014). Human Leucocyte Antigen Matching Strategy. In *HLA and Associated Important Diseases*, Y. Xi, ed. (InTech),.

Taniuchi, S., Masuda, M., Yamamoto, A., Hasui, M., Tsuji, S., Komiyama, Y., Takahashi, H., and Kobayashi, Y. (2001). FcγRIIIb and FcγRIIa polymorphism may affect the production of specific NA1 autoantibody and clinical course of autoimmune neutropenia of infancy. *Hum. Immunol.* 62, 408–413.

Tosi, M.F., and Berger, M. (1988). Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies. *J. Immunol.* 141, 2097–2103.

Verheugt, F.W.A., Borne, A.E.G., Decary, F., and Engelfriet, C.P. (1977). The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br. J. Haematol.* 36, 533–544.

Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* 5.

Wan, C., Yu, H.-H., Lu, M.-Y., Lee, J.-H., Wang, L.-C., Lin, Y.-T., Yang, Y.-H., and Chiang, B.-L. (2012). Clinical manifestations and outcomes of pediatric chronic neutropenia. *J. Formos. Med. Assoc.* 111, 220–227.

Wang, W., and Li, J. (2011). Predominance of IgG1 and IgG3 subclasses of autoantibodies to peptidylarginine deiminase 4 in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 30, 563–567.

Wang, L.-Y., Wang, C.-L., Chu, C.-C., Lee, H.-L., Ho, H.-T., Liang, D.-C., Liu, H.-C., and Lin, M. (2009). Primary autoimmune neutropenia in children in Taiwan. *Transfusion (Paris)* 49, 1003–1006.

Xia, W., Bayat, B., Sachs, U., Chen, Y., Shao, Y., Xu, X., Deng, J., Ding, H., Fu, Y., Ye, X., et al. (2011). The frequencies of human neutrophil alloantigens in the Chinese Han population of Guangzhou: FREQUENCIES OF HNAs IN THE CHINESE HAN. *Transfusion (Paris)* 51, 1271–1277.

Zhou, M., Todd, R.F.D., Van de Winkel, J.G., and Petty, H.R. (1993). Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J. Immunol.* *150*, 3030–3041.

Vu, le Président du Jury,

Pr. Virginie FERRE

Vu, le Directeur de Thèse,

Pr. Régis JOSIEN

Vu, le Directeur de l'UFR,

Pr. Virginie FERRE

Nom – Prénoms : DUMORTIER Clément, Jean, René

Titre de la thèse : Neutropénie auto-immune primitive : caractérisation physiopathologique et comparaison des groupes de patients présentant des anticorps dirigés contre les antigènes HNA-1a ou HNA-1b.

Résumé de la thèse :

Les neutropénies auto-immunes primitives (NAI I) sont des affections de la petite enfance, généralement responsables de syndromes infectieux modérés. Elles sont caractérisées par le développement d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes des polynucléaires neutrophiles et responsables de leur destruction. L'antigène principalement ciblé par ces anticorps est le CD16b ou HNA-1 (human neutrophil antigen 1). De façon remarquable la grande majorité des NAI I s'associent à la présence d'anticorps ciblant spécifiquement l'isoforme HNA-1a et beaucoup plus rarement l'isoforme HNA-1b du HNA-1. Les mécanismes physiopathologiques responsables du développement préférentiel des anticorps dirigés contre le HNA-1a et le mode de destruction des polynucléaires neutrophiles sont encore assez mal caractérisés et ont jusqu'à présent fait l'objet de peu d'études.

L'objectif de ce travail a donc été d'une part de tenter de mettre en évidence l'existence éventuelle de différences physiopathologiques entre les patients développant des anticorps anti-HNA-1a et anti-HNA-1b, et d'autre part de clarifier les mécanismes responsables de la destruction des polynucléaires neutrophiles.

Les résultats de cette étude rétrospective ont permis de montrer une différence qualitative et quantitative de la nature des sous-classes d'IgG anti-HNA-1 produites dans les deux groupes de patients et d'éliminer la lyse par activation de la voie classique du complément des mécanismes neutropéniant de ces anticorps. Ce travail a ainsi permis d'amener des éléments nouveaux et originaux sur la physiopathologie de la NAI I.

MOTS-CLÉS : NEUTROPÉNIE AUTOIMMUNE PRIMITIVE, COMPLÉMENT, PHYSIOPATHOLOGIE, IMMUNOGLOBULINE

JURY

PRÉSIDENT : Mme Virginie FERRE, Professeur de Virologie
Faculté de pharmacie de Nantes

ASSESEURS : M. Régis JOSIEN, Professeur d'Immunologie
Faculté de médecine de Nantes

Mme Caroline THOMAS, Praticien Hospitalier
Service d'hématologie – oncologie pédiatrique, CHU de Nantes

M. Jérôme MARTIN, Assistant Hospitalo-Universitaire
Laboratoire d'immunologie, CHU de Nantes

Mme Marie AUDRAIN, Praticien Hospitalier
Laboratoire d'immunologie, CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : 16 rue Capitaine Corhumel, 44000 NANTES