

De la variabilité génétique à l'expression phénotypique des groupes sanguins

Présentation détaillée du projet :

1-Contexte scientifique et socio-économique du projet :

Les groupes sanguins ont été mis en évidence pour la première fois au tout début du XX^{ème} siècle par l'autrichien Karl Landsteiner. A ce jour, 35 groupes (ou systèmes) sanguins érythrocytaires, impliquant plus de 300 antigènes de nature protéique ou glucidique exprimés à la surface des globules rouges, sont officiellement répertoriés par l'organisme de référence, la Société Internationale de Transfusion Sanguine (« *International Society of Blood Transfusion* » : ISBT ; www.isbtweb.org). Chaque système est défini par *i*) un ou plusieurs antigènes exprimés à la surface des globules rouges, *ii*) dont l'expression est contrôlée par un ou plusieurs gènes, et *iii*) contre le(s)quel(s) au moins un allo-anticorps est dirigé.

Le système immunitaire de chaque individu agit de manière permanente pour détecter des molécules/motifs étrangers à l'organisme et apporter une réponse adaptée pour lutter contre ces éléments en produisant des anticorps dirigés contre ces molécules (= immunisation). Les antigènes portés par les globules rouges entrent ainsi dans cette classe. De fait, un risque d'allo-immunisation se présente en cas d'incompatibilité lors d'une exposition à ces molécules, qui peut intervenir dans deux situations :

1. le cadre transfusionnel, pour le traitement des maladies du sang (thalassémie, drépanocytose...), des cancers (leucémies, lymphomes...) et des hémorragies (accident, accouchement ou intervention chirurgicale) ;
2. le cadre obstétrical, par exposition des antigènes fœtaux au système immunitaire maternel (allo-immunisation fœto-maternelle).

Les conséquences cliniques sont variables et dépendent essentiellement de l'individu exposé (état général, système immunitaire, facteurs génétiques...) et de l'(des) antigène(s) concerné(s). Les statuts phénotypiques, c'est-à-dire l'expression des antigènes, chez les donneurs/receveurs/patients ont donc une importance capitale et constituent un enjeu majeur en matière de **Santé Publique**. En effet **tout individu** peut potentiellement, au cours de sa vie, être concerné par l'une et/ou l'autre des situations mentionnées plus haut.

Le statut sanguin des individus, en particulier des groupes ABO, Rh, Kell, et dans certains cas Duffy, Kidd et MNS, a donc un intérêt majeur en médecine transfusionnelle et pour la prise en charge des femmes en cours de grossesse. En routine, ce statut est déterminé par des tests sérologiques à l'aide de cocktails d'anticorps, méthodes de référence pour le typage des groupes sanguins. Dans un certain nombre de cas cependant, les méthodes sérologiques ne sont pas satisfaisantes pour différentes raisons. Il faut alors avoir recours à des **analyses moléculaires** pour identifier les anomalies potentielles et déduire le(s) phénotype(s) correspondant, pour ainsi guider la conduite à adopter dans un cadre transfusionnel ou obstétrical et garantir ainsi la **sécurité des patients**.

2-Hypothèse et questions posées, identification des points de blocages scientifiques que le travail de thèse se propose de lever :

Les 35 systèmes répertoriés jusqu'à présent impliquent 40 gènes chez l'homme. Ces gènes présentent de très nombreuses variations et ce **polymorphisme génétique** est lui-même à l'origine d'une importante **variabilité phénotypique**, à la fois d'un point de vue quantitatif et

qualitatif. Bien que l'identification des variants soit aujourd'hui relativement triviale grâce aux nombreux moyens technologiques disponibles, leur **interprétation fonctionnelle**, c'est-à-dire les conséquences phénotypiques et leurs impacts potentiels pour la sécurité du patient, demeure difficile dans de très nombreux cas. Le système Rh, qui comporte 54 antigènes parmi lesquels l'antigène D à fort pouvoir immunogène, implique les gènes homologues *RHD* et *RHCE*. Plus de 300 allèles variants sont répertoriés dans ce système, illustrant ainsi le polymorphisme génétique des gènes impliqués dans les groupes sanguins.

Parmi les variations génétiques, nous nous intéressons plus spécifiquement à trois catégories :

1. variants d'épissage ;
2. variants silencieux ;
3. variants faux-sens.

L'objectif de ce travail est donc d'étudier l'**impact moléculaire et cellulaire** de ces variants sur le **phénotype** des individus en exploitant et/ou en développant des **outils d'analyse** à visée **diagnostique** potentielle. En effet, les ressources biologiques nécessaires à ces études (i.e. globules rouges) ne sont généralement pas disponibles à des fins de recherche et il est donc nécessaire de créer des modèles simples et pertinents permettant d'étudier l'expression de ces mutants. Les gènes sélectionnés pour cette étude sur la base de leur intérêt clinique et fonctionnel sont *RHD* (impliqué dans le système Rh), *KEL* (Kell), *SLC14A1* (Kidd), *ABCB6* (Langereis) et *ABCG2* (Junior).

Au-delà de l'intérêt diagnostique couvert par ce projet, ces travaux présentent également un **intérêt fondamental**. En effet, les gènes étudiés expriment des protéines transmembranaires présentes à la surface des globules rouges au sein de complexes macromoléculaires. L'étude des variants, en particulier faux-sens, donnera des informations sur les mécanismes fondamentaux de trafic intracellulaire de ces protéines, leur interaction avec des partenaires protéiques et leur intégration dans la membrane plasmique, mécanismes jusqu'à présent peu décrits dans la littérature.

3-Approche méthodologique et technique envisagée :

Les approches méthodologiques mises en œuvre dépendent des variants étudiés. Pour l'analyse de l'impact des variants d'épissage, nous disposons au laboratoire d'un système appelé « minigène », qui consiste en une construction plasmidique dans laquelle est clonée la région d'intérêt porteuse du variant génétique. Cette méthode a déjà montré sa pertinence et son efficacité au laboratoire (Fichou *et al.* (2013a) *Transfusion* ; Callebaut *et al.* (2014) *Hum Mol Genet* ; Fichou *et al.* (2015) *Transfusion*).

L'étude des deux autres catégories de variants repose, de la même manière, sur l'utilisation de vecteurs plasmidiques contenant les constructions d'intérêt qui seront transfectées dans des modèles cellulaires. L'expression des transcrits issus des constructions incluant les variants silencieux sera analysée par une technique de RT-PCR en temps-réel, conformément à la méthodologie utilisée dans une étude similaire récente (de Coulgeans *et al.* (2014) *Br J Haematol*). L'expression des variants faux-sens inclut des expériences de Western-blot, d'immunoprécipitation, d'immunofluorescence et de cytométrie en flux.

4-Profil du candidat (compétences scientifiques et techniques requises) :

Le(La) candidat(e) devra avoir suivi une formation théorique de type Master 2 en génétique

humaine, biologie moléculaire et cellulaire ou physiologie. Les compétences recherchées pour ce projet sont :

- Maîtrise des outils classiques de biologie moléculaire (PCR, PCR quantitative, mutagenèse dirigée, clonage...), biologie cellulaire (culture, immunocytochimie...) et biochimie (Western-blot, immunoprécipitation...);
- Des connaissances en cytométrie en flux seraient appréciées ;
- Maîtrise de l'anglais scientifique, oral et écrit ;
- Capacité à conduire un projet de manière autonome ;
- Dynamisme et curiosité scientifique ;
- Capacité à interagir avec l'équipe et à diffuser les connaissances à l'échelle locale, nationale et internationale.

5-Positionnement et environnement scientifique dans le contexte régional, et le cas échéant, national et international :

Le Laboratoire de Génétique Moléculaire des Groupes Sanguins (EFS Bretagne, site de Brest) est impliqué depuis une quinzaine d'années dans l'analyse moléculaire des gènes des groupes sanguins érythrocytaires. Cette expertise a été mise à profit pour des activités de recherche au sein de l'Unité Inserm UMR-S 1078. De très nombreux variants et haplotypes complexes ont ainsi été identifiés, caractérisés au laboratoire et rapportés dans des revues scientifiques internationales (Le Maréchal *et al.* (2007) *Transfusion* ; Fichou *et al.* (2012a) *Transfusion* ; Fichou *et al.* (2012b) *Transfusion* ; Chen *et al.* (2013) *Transfusion* ; Fichou *et al.* (2013a) *Transfusion* ; Fichou *et al.* (2013b) *Transfusion*). Par ailleurs des collaborations internationales avec des laboratoires étrangers ont été initiées dans le cadre d'études d'épidémiologie moléculaire, en particulier avec l'Albanie (Xhetani *et al.* (2014) *Blood Transfus*) et l'Inde (projet financé en cours).

Notre contribution ne s'est pas limitée à la description et à l'étude de la distribution des variants, mais s'est aussi étendue aux développements technologiques pour les approches de génotypage des groupes sanguins (Le Maréchal *et al.* (2007) *Transfusion* ; Fichou *et al.* (2013a) *Transfusion* ; Fichou *et al.* (2013b) *Transfusion*), notamment pour la première fois dans ce champ d'applications par une approche par séquençage de nouvelle génération (NGS) (Fichou *et al.* (2014) *Br J Haematol*) et, plus récemment, à des aspects de génomique fonctionnelle (Fichou *et al.* (2013a) *Transfusion* ; Fichou *et al.* (2015) *Transfusion*). Ces travaux ont fait l'objet de nombreuses publications dans des revues internationales (mentionnées plus haut), de communications orales et posters dans des congrès nationaux (Assises de Génétique Humaine et Médicale, 2012 ; Société Française de Transfusion Sanguine (SFTS), 2011 ; SFTS, 2013 ; SFTS, 2015) et internationaux (European Society of Human Genetics, 2012 ; Annual International Symposium of Hematology, 2013 ; Congress of European Hematology Association, 2014 ; International Society of Blood Transfusion (ISBT), 2013 ; ISBT, 2015).

D'autre part, le laboratoire bénéficie directement d'un environnement technologique favorable avec des équipements dédiés à l'étude de l'expression des gènes, parmi lesquels une salle de culture cellulaire, des équipements pour la culture bactérienne, un thermocycleur pour la PCR en temps réel, un microscope à fluorescence, un cytomètre...