

# Une longue histoire !

- Années 1980 : anticorps anti-publics de spécificité indéterminée découverts chez deux patients non apparentés atteints d'hémophilie B sévère. Quelques membres de la fratrie séro-compatibles
- Novembre 2011 : patient hémophile B sévère, transfusé suite à un accident de la voie publique. Apparition d'un anticorps anti-public de spécificité indéterminée

➡ => Au total

- ✓ 3 familles différentes avec 6 membres hémophiles B sévères
- ✓ 3 membres avec un anticorps anti-public de spécificité indéterminée
- ✓ Les 3 patients immunisés sont "cross-compatibles" => même anticorps => même phénotype rare.



*Pure coïncidence très improbable !*

Mais impossible de poursuivre plus loin les investigations à l'époque 😞

## Une longue histoire !

- Janvier 2017: RAI prescrite dans un contexte pré-chirurgical chez un patient, non hémophile, mais souffrant d'un déficit intellectuel
- RAI ininterprétable => envoi au CNRGS à Paris
- Bilan réalisé au CNRGS : anticorps dirigé contre un antigène de fréquence élevée (anticorps anti-public)
  - ⇒ Nombreuses investigations spécialisées engagées mais aucune conclusion possible
  - ⇒ Anticorps anti-public de spécificité indéterminée

# INVESTIGATIONS RÉALISÉES AU CNRGS : ANALYSES SÉROLOGIQUES

|                    | RH |   |   |   |   |                |   | KEL |                 |                 | FY              |                 | JK              |                 | LE              |                 | MNS |   |   |   | P1PK | LU              |                 | TIA | TIA papatine | TIA trypsine |
|--------------------|----|---|---|---|---|----------------|---|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|---|---|---|------|-----------------|-----------------|-----|--------------|--------------|
|                    | D  | C | E | c | e | C <sup>w</sup> | K | k   | Kp <sup>a</sup> | Kp <sup>b</sup> | Fy <sup>a</sup> | Fy <sup>b</sup> | Jk <sup>a</sup> | Jk <sup>b</sup> | Le <sup>a</sup> | Le <sup>b</sup> | M   | N | S | s | P1   | Lu <sup>a</sup> | Lu <sup>b</sup> |     |              |              |
| 1                  | 0  | + | 0 | 0 | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +   | 0 | + | 0 | +    | 0               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 2                  | 0  | 0 | + | + | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0   | + | 0 | + | +    | +               | 0               | +   | 2+           | 2+           |
| 3                  | 0  | 0 | 0 | + | + | 0              | + | +   | 0               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0               | +               | +   | 0 | + | + | +    | +               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 4                  | 0  | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | 0               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +   | + | + | 0 | +    | 0               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 5                  | 0  | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | 0               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +   | + | + | 0 | +    | 0               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 6                  | 0  | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | 0               | +               | +               | 0               | 0               | +               | +   | + | 0 | + | 0    | +               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 7                  | +  | 0 | + | + | 0 | 0              | 0 | +   | 0               | +               | 0               | +               | 0               | +               | 0               | +               | 0   | + | 0 | + | +    | +               | 0               | +   | 2+           | 2+           |
| 8                  | +  | + | 0 | 0 | + | 0              | + | 0   | +               | 0               | +               | 0               | 0               | +               | 0               | +               | +   | + | 0 | + | +    | +               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 9                  | +  | + | 0 | 0 | + | 0              | + | +   | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0   | + | + | + | 0    | 0               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 10                 | +  | + | 0 | 0 | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | +               | 0               | +               | +               | 0               | +               | 0   | + | 0 | + | +    | +               | 0               | +   | 2+           | 2+           |
| 11                 | +  | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0   | + | 0 | + | 0    | 0               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 12                 | +  | + | + | 0 | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | +   | + | 0 | + | +    | 0               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 13                 | +  | + | 0 | 0 | + | 0              | 0 | +   | +               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | +   | + | 0 | + | 0    | 0               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 14                 | +  | + | 0 | 0 | + | 0              | + | +   | 0               | +               | +               | +               | +               | +               | 0               | +               | +   | + | 0 | + | +    | 0               | +               | 2+  | 2+           | 2+           |
| 15                 | 0  | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | +   | 0               | +               | +               | 0               | +               | 0               | 0               | +               | 0   | + | 0 | + | +    | +               | 0               | +   | 2+           | 2+           |
| Témoins autologues |    |   |   |   |   |                |   |     |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |     |   |   |   |      |                 | 0               | 0   | 0            | 0            |

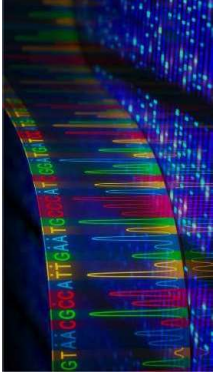
## Un constat étrange !

- Le plasma de ce patient ne réagit pas sur les hématies des 6 patients souffrant d'hémophilie B sévère, dont 3 possèdent eux aussi un anticorps anti-public non identifié
- Inversement, les hématies de ce patient ne réagissent pas avec le plasma des 3 patients atteints d'hémophilie B sévère immunisés => Même groupe sanguin rare que celui observé chez les patients hémophiles B ?



# WHOLE EXOME SEQUENCING

4 patients *non apparentés cross-compatibles*  
3 patients immunisés avec hémophilie B sévère (P1,P2,P3)  
1 patient immunisé non hémophile (P4)

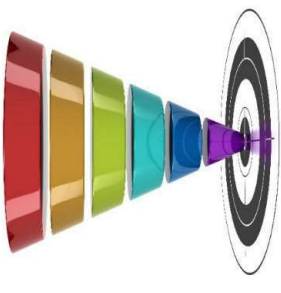


**Whole exome sequencing (HiSeq2500 Illumina)**

Variant filtering strategy

=> Patients P1, P2, P3 tous avec une **délétion** du gène F9  
=> **3 gènes candidats (délétés)**

MCF2  
CXorf66  
**ATP11C**

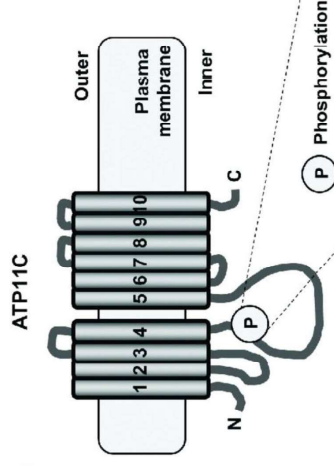


**ATP11C** considéré comme le meilleur candidat :

**Le seul gène parmi les 3 connu pour coder pour une protéine érythrocytaire**

# ATP11C : LE "MEILLEUR" GÈNE CANDIDAT

- ATP11C code pour une **"flippase"**, une enzyme qui joue un rôle dans la localisation de la phosphatidylsérine (PS) au niveau de la zone intracellulaire de l'érythrocyte via un processus actif de transport ATP-dépendant d'aminophospholipides



Arashiki N, et al. *Haematologica* 2016;101(5):559-565

L'externalisation de la PS à la surface du GR est un signe de sénescence => signal pour la phagocytose (« eat-me » signal)



Bell, E. Recognizing 'eat-me' signals. *Nat Rev Immunol* 2007

- Nous avons émis l'hypothèse que la cible de l'anticorps anti-public de nos 7 patients est la protéine ATP11C => Confirmation ultérieure par des études d'expression

## En résumé à ce stade

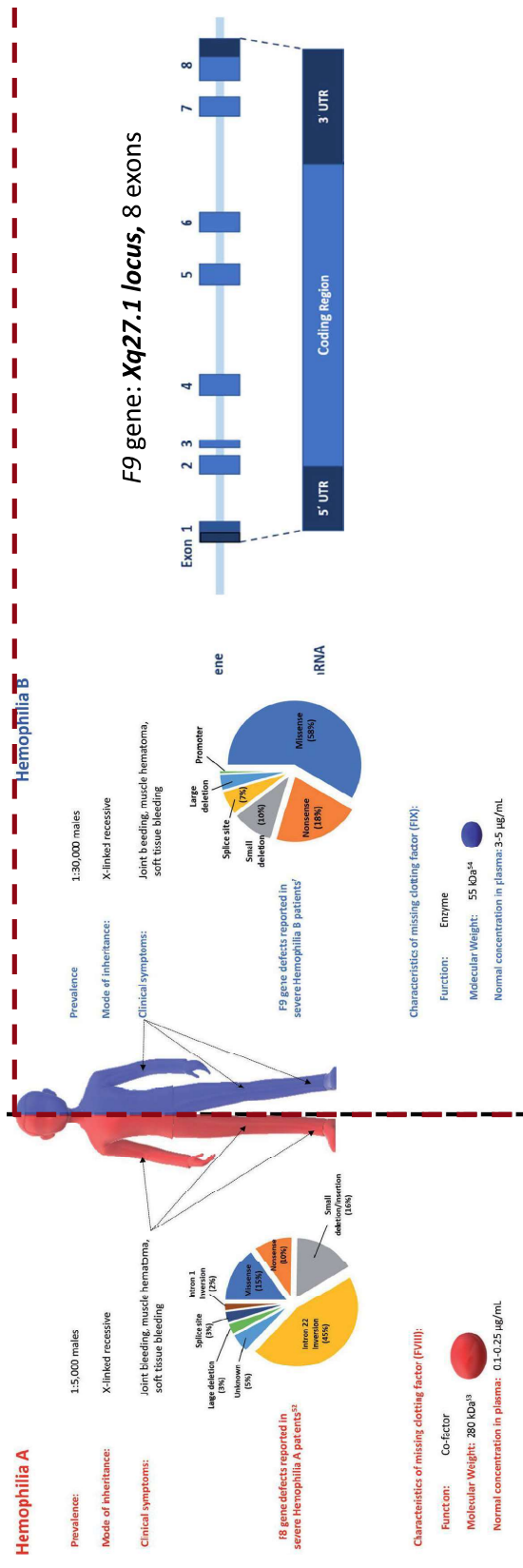
Etudes moléculaires et d'expression ont confirmé que :

- L'anticorps mis en évidence chez les 4 patients immunisés cible la protéine ATP11C
- Les 7 patients étudiés n'expriment pas la protéine ATP11C => phénotype nul

**6 patients sur 7 montrent une hémophilie B sévère**

=> Qui y a-t-il de particulier pour le patient P4, qui n'est pas hémophile contrairement aux 6 autres, mais qui présente le même groupe rare ?

# Hémophilie B sévère et gène F9



**Possibilité de larges délétions englobant tout le gène F9 (> 100 formes différentes *décrites*) et qui peuvent aussi affecter des gènes contigus**

=> Ce possible impact sur des gènes contigus est beaucoup plus fréquent dans l'hémophilie B sévère que dans l'hémophilie A sévère

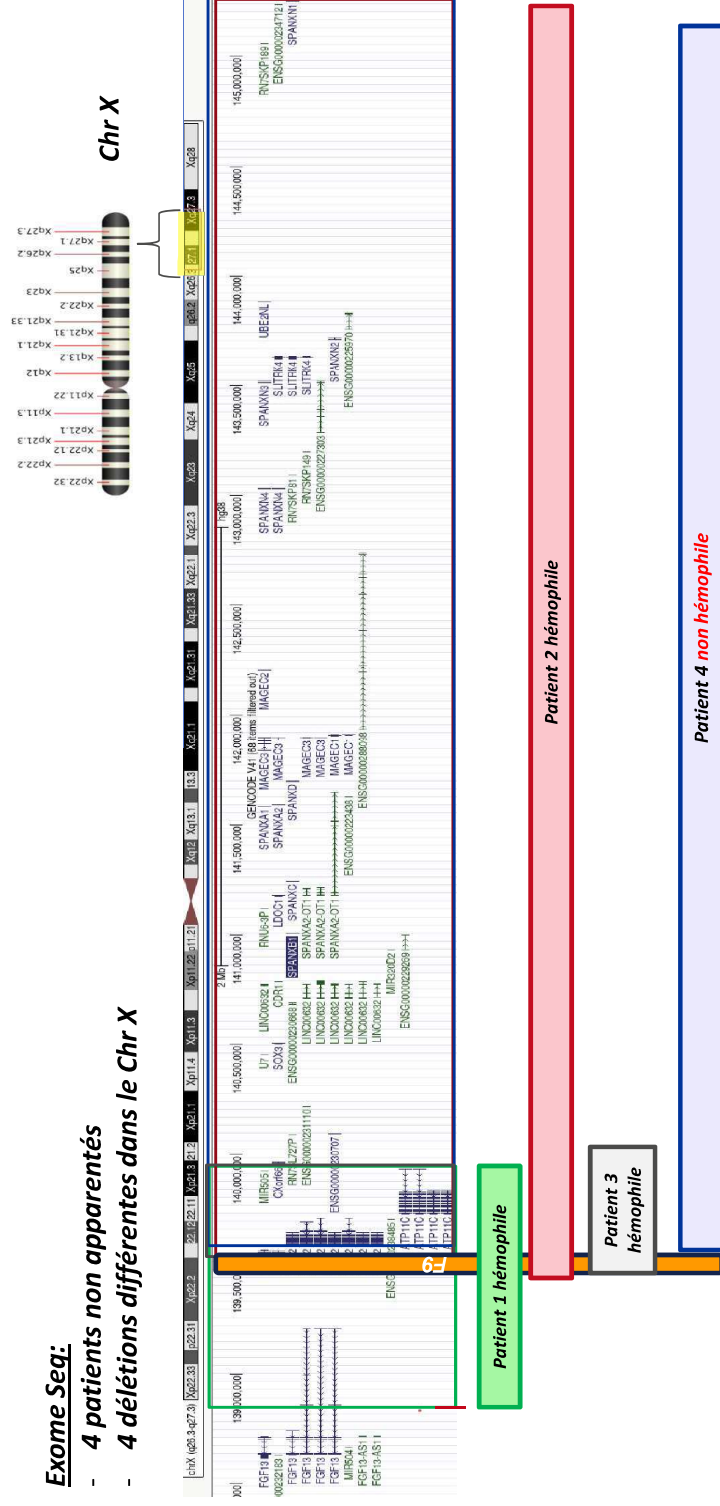
Castaman G, Matino D. *Haematologica* 2019

Goodeve EC. *J Thromb Haemost* 2015

# Les différentes délétions observées

**Exome Seq:**

- 4 patients non apparentés
- 4 délétions différentes dans le Chr X



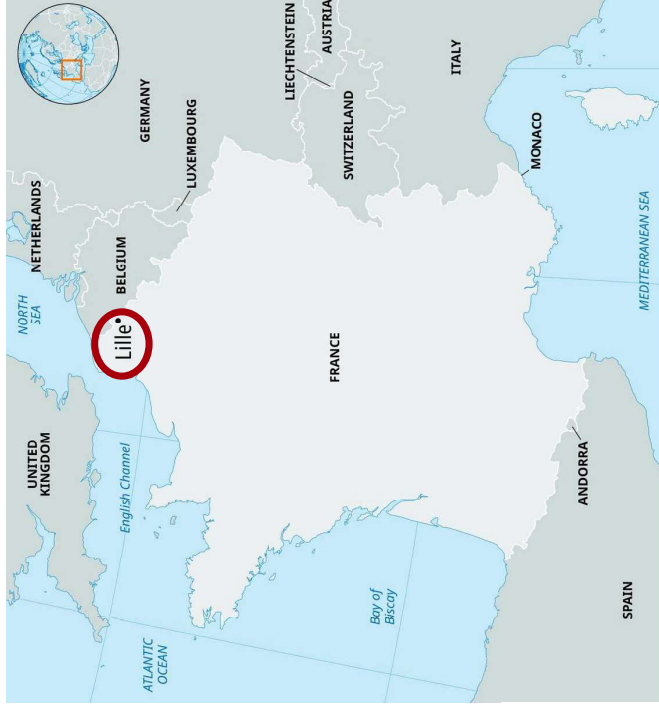


**System details:**

| No. | System name | System symbol | Gene name(s)  | LRG | Number of antigens | Chromosomal location |
|-----|-------------|---------------|---------------|-----|--------------------|----------------------|
| 46  | ATP11C      | ATPC11C       | <i>ATP11C</i> |     | 1                  | Xq27.1               |

**Antigen details:**

| Antigen number | Antigen name | ISBT number nomenclature | Name origin                                           |
|----------------|--------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1              | LIL          | ATP11C.1                 | LIL after the proband's native region (Lille, France) |



**Très compliqué pour la prise en charge transfusionnelle !  
Aucun donneur de phénotype rare LIL- connu dans le monde**

**PIGZ**

**LE 48ÈME SYSTÈME DE GROUPE  
SANGUIN**

# Contexte

- **Patiente de 54 ans**
- **Ancestralité afro-antillaise, (Guadeloupe)**
- **Déficit intellectuel modéré**
- **Pas d'antécédents transfusionnels**
- **3 grossesses**
- **1<sup>er</sup> enfant décédé à l'âge de 1 an, pour une raison inexpliquée**
- **2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> enfants morts-nés, pour une raison inexpliquée**



## Contexte

- Patiente hospitalisée en 2011 (cancer du sein)
- Phénotype: O, D+C+E-c+e+, K-, Fy(a-b-), Jk(a+b-), S-s+
- Investigations réalisées dans le laboratoire hospitalier :
  - ✓ Pan-agglutination (TIA et TIA-papaïne)
  - ✓ Témoins autologues négatifs



**Transfert d'échantillons au CNRGS**

# Bilan réalisé au CNRGS

| RH           |   |   |   |   |                |   |   |                 |                 | KEL             |                 |                 |                 | FY              |                 | JK |   | LE |   | MNS |                 |                 |   | P1PK | LU |    | TIA | TIA papaine |
|--------------|---|---|---|---|----------------|---|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|---|----|---|-----|-----------------|-----------------|---|------|----|----|-----|-------------|
| D            | C | E | c | e | C <sup>w</sup> | K | k | Kp <sup>a</sup> | Kp <sup>b</sup> | Fy <sup>a</sup> | Fy <sup>b</sup> | Jk <sup>a</sup> | Jk <sup>b</sup> | Le <sup>a</sup> | Le <sup>b</sup> | M  | N | S  | s | P1  | Lu <sup>a</sup> | Lu <sup>b</sup> |   |      |    |    |     |             |
| 1            | 0 | + | 0 | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +  | 0 | +  | 0 | +   | +               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 2            | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0  | + | 0  | + | +   | +               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 3            | 0 | 0 | + | + | 0              | + | + | 0               | +               | 0               | 0               | 0               | +               | 0               | +               | +  | 0 | +  | + | +   | +               | +               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 4            | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | +  | + | +  | + | +   | +               | +               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 5            | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | 0               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +  | 0 | +  | 0 | +   | +               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 6            | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | 0               | +               | +               | 0               | 0               | +               | +  | + | 0  | + | 0   | 0               | +               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 7            | + | 0 | + | 0 | 0              | 0 | + | 0               | +               | 0               | +               | 0               | +               | 0               | +               | 0  | + | 0  | + | +   | +               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 8            | + | + | 0 | + | +              | 0 | + | 0               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0               | +               | +  | + | +  | 0 | +   | +               | +               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 9            | + | + | 0 | + | 0              | + | + | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0  | + | +  | + | 0   | 0               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 10           | + | + | 0 | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0  | + | 0  | + | +   | +               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 11           | + | 0 | + | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +               | 0               | +  | 0 | +  | 0 | 0   | 0               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 12           | + | + | 0 | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | +               | +               | 0               | 0               | 0               | +               | +  | + | 0  | + | +   | +               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 13           | + | + | 0 | + | 0              | 0 | + | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | 0               | +               | +  | + | 0  | + | 0   | 0               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 14           | + | + | 0 | + | 0              | + | + | 0               | +               | +               | +               | +               | +               | 0               | +               | +  | 0 | +  | 0 | 0   | +               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| 15           | 0 | 0 | + | + | 0              | 0 | + | 0               | +               | +               | 0               | +               | 0               | 0               | +               | 0  | + | 0  | + | +   | +               | 0               | + | +    | 2+ | 3+ |     |             |
| Autocontrols |   |   |   |   |                |   |   |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |    |   |    |   |     |                 |                 | 0 | 0    |    |    |     |             |

Gel-test  
Plasma

| EDA | IgG | C3d |
|-----|-----|-----|
| 0   | 0   | 0   |

Aucune piste...  
Pas d'exploration complémentaire de ce cas à l'époque...

**2019**

- Nouveaux échantillons prélevés
- Profil réactionnel identique à celui de 2011
- Pas de frères/sœurs compatibles



**COLD CASE**

***Whole Exome Sequencing* chez la patiente**  
**Un défi car un seul sujet à tester !**

# Whole exome sequencing



Variant filtering strategy

11 gènes candidats, dont le gène *PIGZ*  
*PIGZ* c.934C>T (p.His312Tyr)

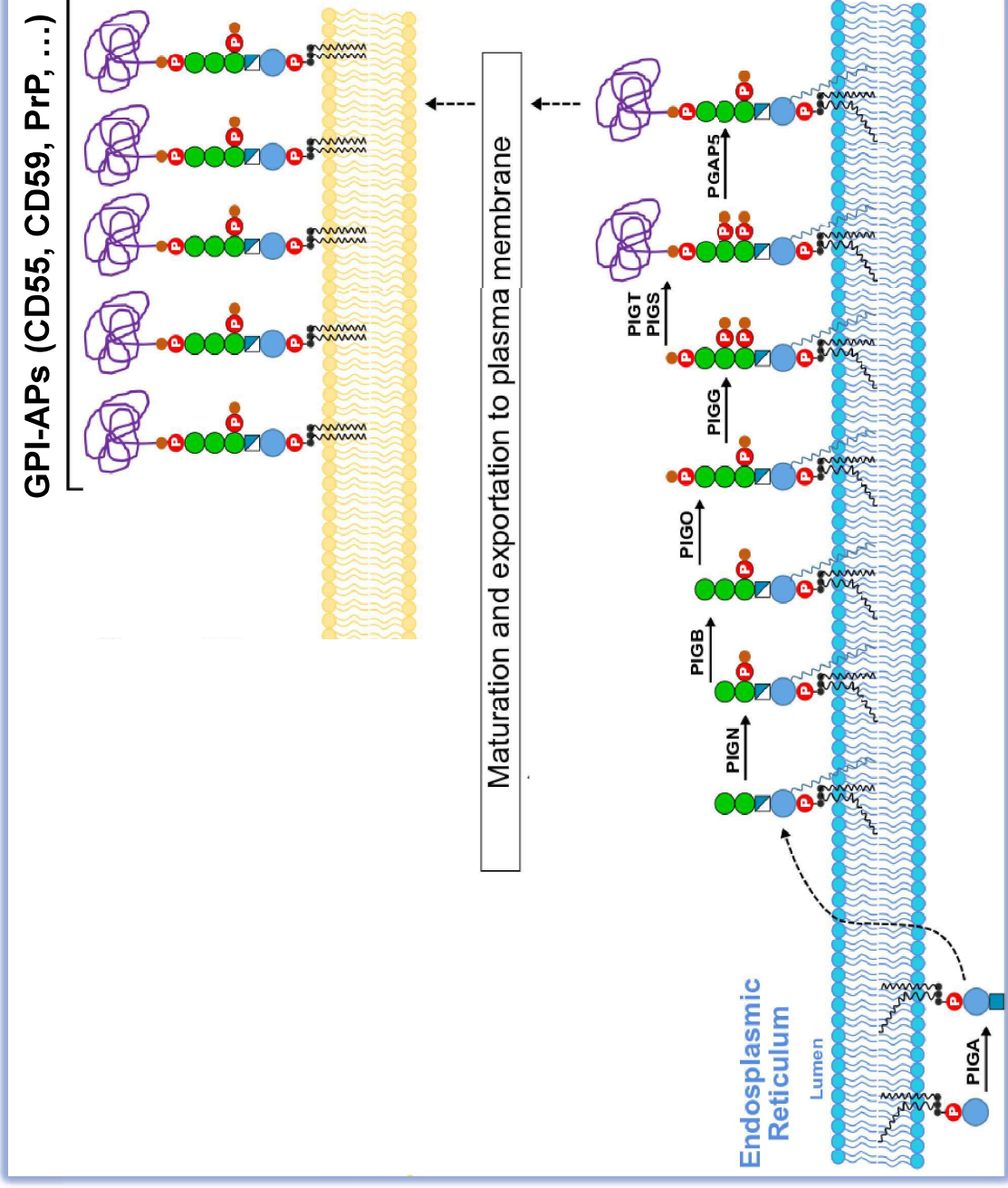
*PIGZ*: Phosphatidyl-Inositol Glycan Anchor Biosynthesis Class Z Protein

## *PIGZ* considéré comme le meilleur candidat

- ❖ Les 10 autres gènes non connus pour coder pour une protéine sur le GR
- ❖ Patiente avec déficit intellectuel, comme tel est le cas chez les sujets de groupe rare Emm- (Emm codé par le gène *PIGG*)

Hypothèse confirmée suite à explorations complémentaires  
Anticorps de la patiente dirigé contre un produit du gène *PIGZ*

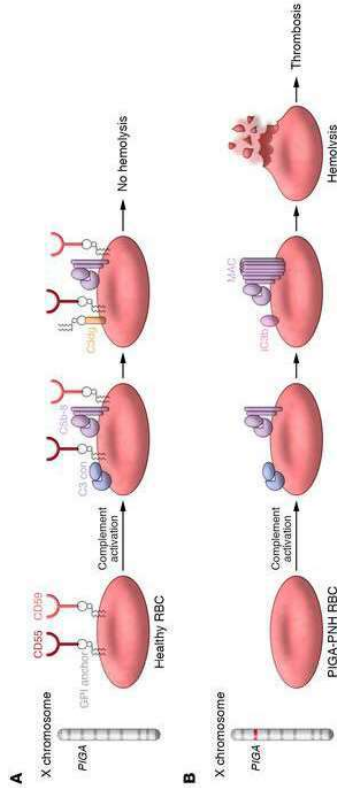
# La cascade des gènes *PIG* chez l'Homme



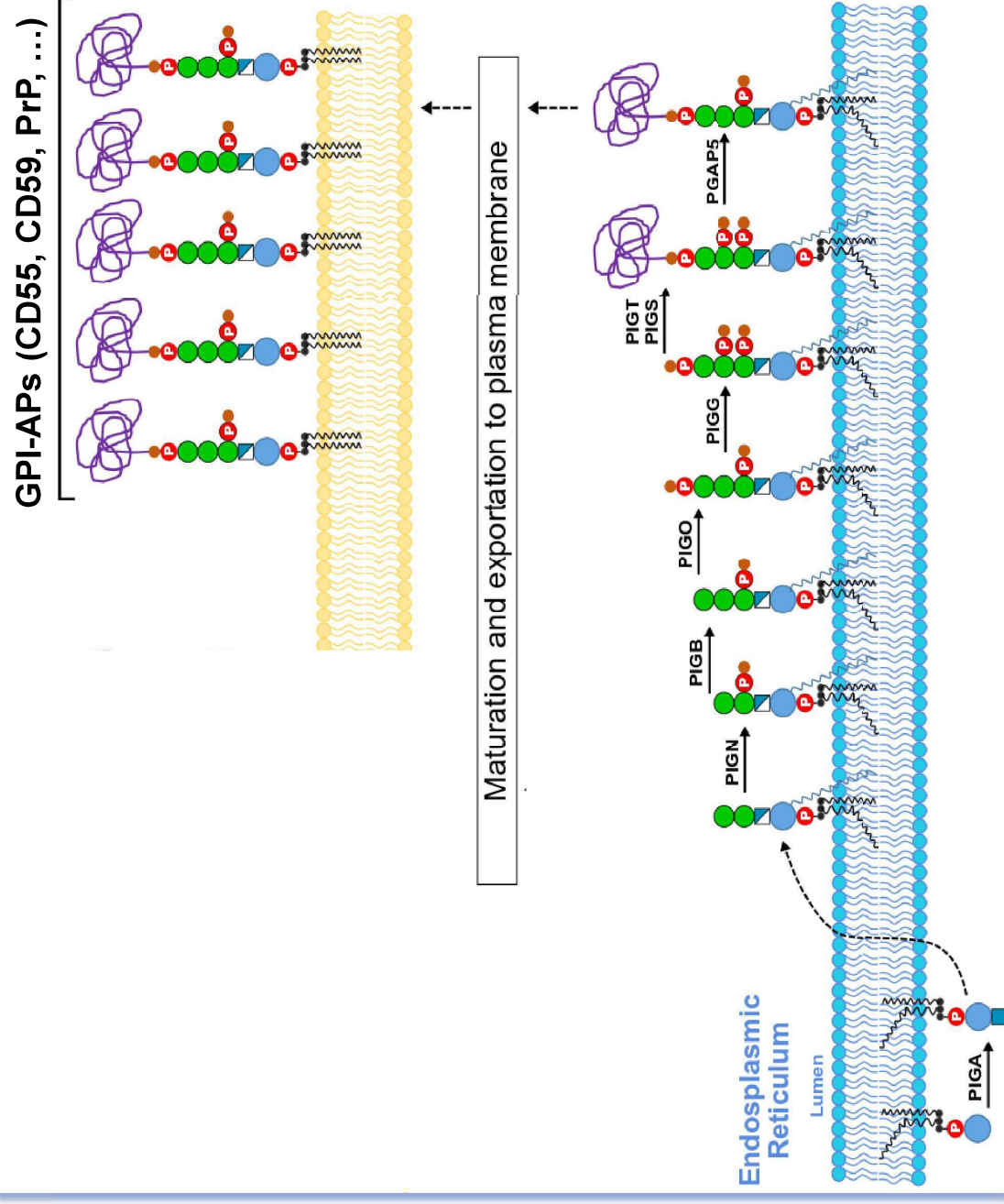
YT  
DO  
CROM  
JMH  
CD59  
KANNO

# La cascade des gènes *PIG* chez l'Homme

*J Clin Invest.* 2019;129(12):5074-5076

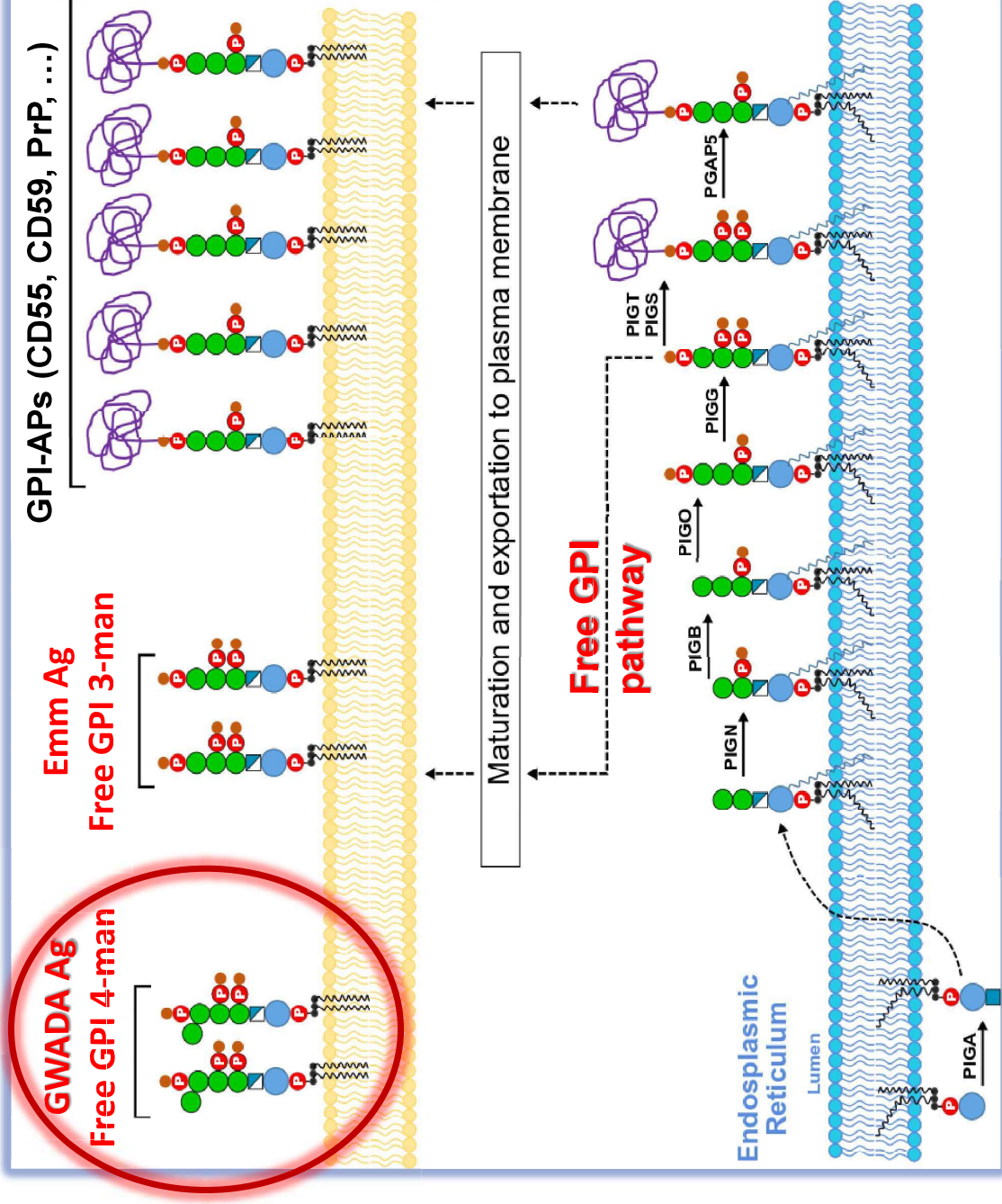


In *PIGA*-PNH, a **somatic mutation** in *PIGA* (required for the initial step in GPI-anchored biosynthesis) leads to failure to generate the GPI anchor in hematopoietic cells. After expansion of the PNH clone (often through immunologic escape) the PNH red cells are susceptible to complement-mediated hemolysis due to an absence of the GPI-anchored CD55 and CD59 from the cell surface.



# Rôle de l'enzyme PIGZ chez l'Homme ?

YT  
DO  
CROM  
JMH  
CD59  
KANNO



**PIGZ**  
code pour un  
nouvel antigène,  
qu'il a été proposé  
d'appeler **GWADA**  
(diminutif de la  
Guadeloupe)

Antigène porté par  
un "**Free GPI**", et  
non pas par un  
"**Anchored GPI**"

# Expression de *PIGZ* dans les tissus humains

THE HUMAN PROTEIN ATLAS

RESOURCES ABOUT NEWS LEARN DATA HELP

Search

Fields »

PIGZ

SUMMARY

TISSUE

BRAIN

SINGLE CELL

SUBCELL

CANCER

N/A BLOOD

CELL LINE

STRUCT & INT

PROTEIN SUMMARY

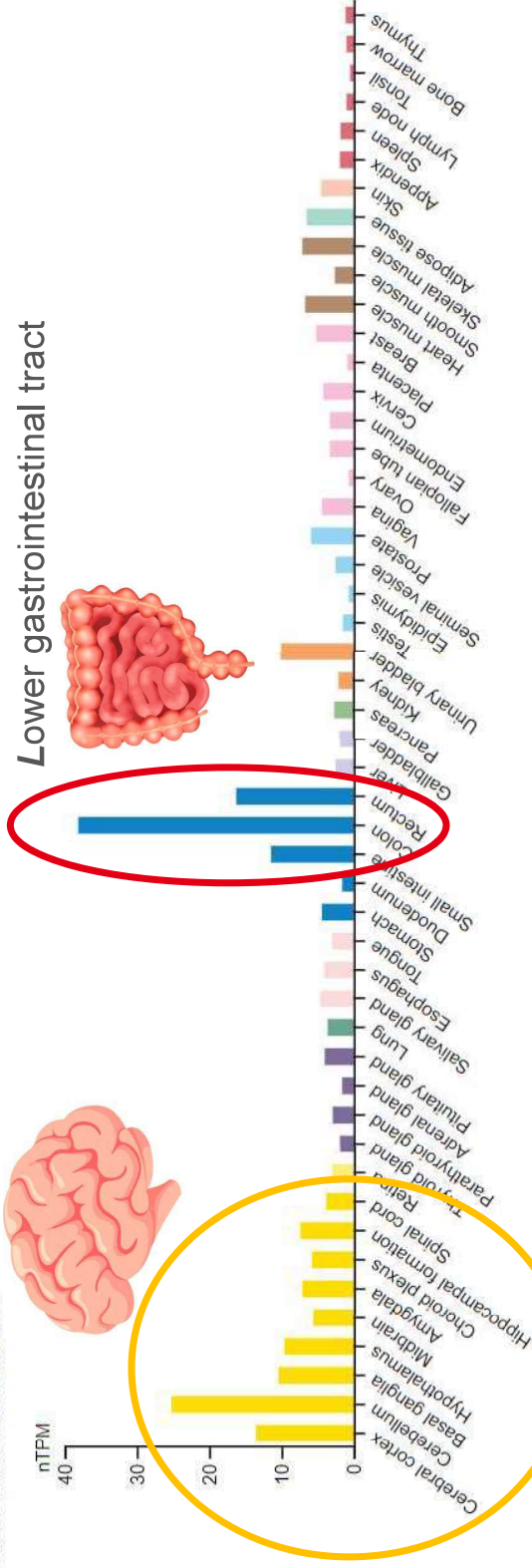
GENE INFORMATION

RNA DATA

ANTIBODY DATA

RNA SUMMARY - Normalized

Tissue consensus dataset<sup>†</sup>



Cerveau



Explication du déficit intellectuel ?

# PIGZ : le 48<sup>e</sup> système de groupe sanguin

System details:

| No. | System name | System symbol | Gene name(s) | LRG | Number of antigens | Chromosomal location |
|-----|-------------|---------------|--------------|-----|--------------------|----------------------|
| 48  | PIGZ        | PIGZ          | <i>PIGZ</i>  |     | 1                  | 3q29                 |

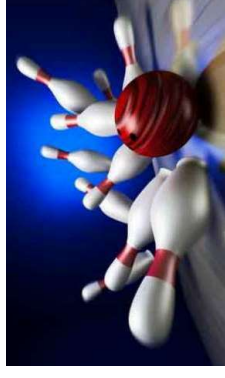
Antigen details:

| Antigen number | Antigen name | ISBT number nomenclature | Name origin                                                                                                |
|----------------|--------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1              | GWADA        | PIGZ.1                   | GWADA, after the common abbreviation of the proper name Guadeloupe, the proband's native French territory. |

Une seule personne connue à ce jour dans le monde comme étant de phénotype GWADA négatif !

## CONCLUSIONS

- 6 révolutions majeures en immuno-hématologie entre 1900 et 2010
    - Système ABO et hémagglutination directe
    - Test de Coombs indirect
    - Gel-test
    - Réactifs de type anticorps monoclonaux
    - Plateformes de génotypage de groupes sanguins
    - Substances recombinantes de groupes sanguins
  - 7<sup>ème</sup> révolution depuis les années 2020
- Séquençage d'ADN à haut débit



# CONCLUSIONS

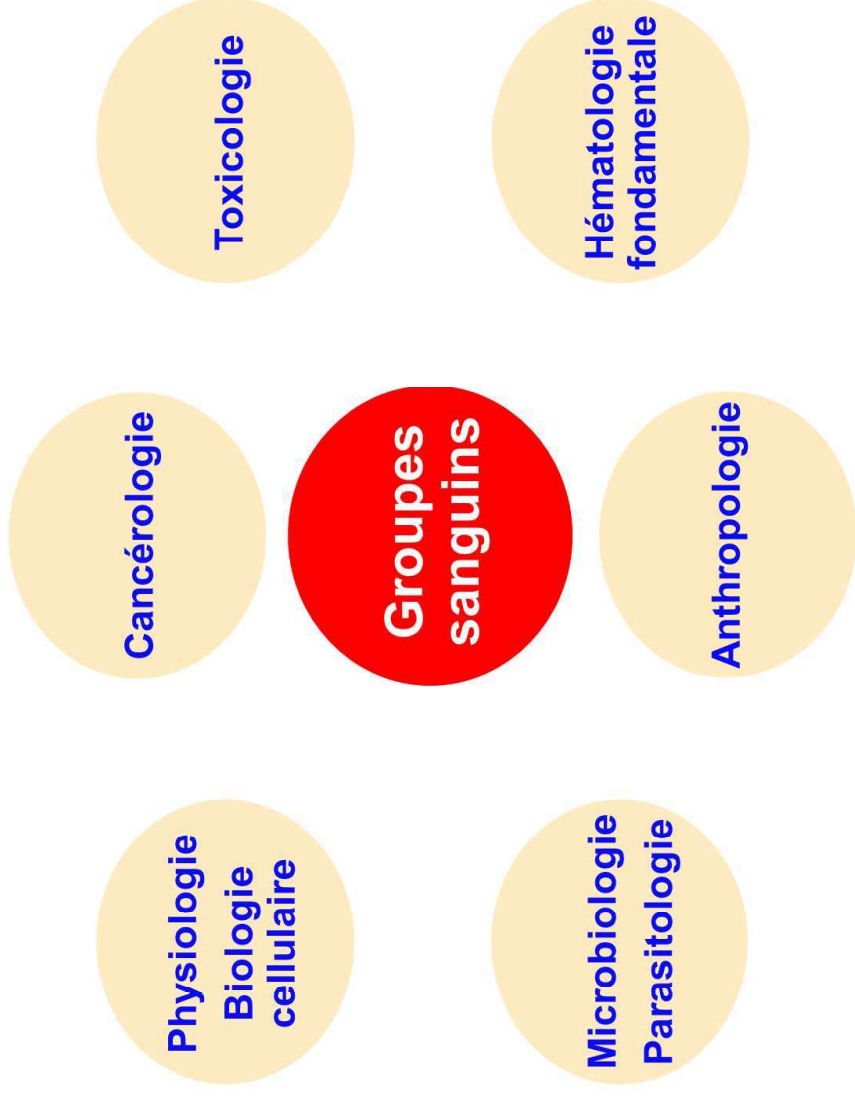
⇒ Le **NGS** (et tout particulièrement l'approche de type *Whole Exome Sequencing*) peut aujourd'hui être une aide très utile pour **caractériser, de manière indirecte, la spécificité d'un anticorps** ciblant un antigène public de spécificité indéterminée

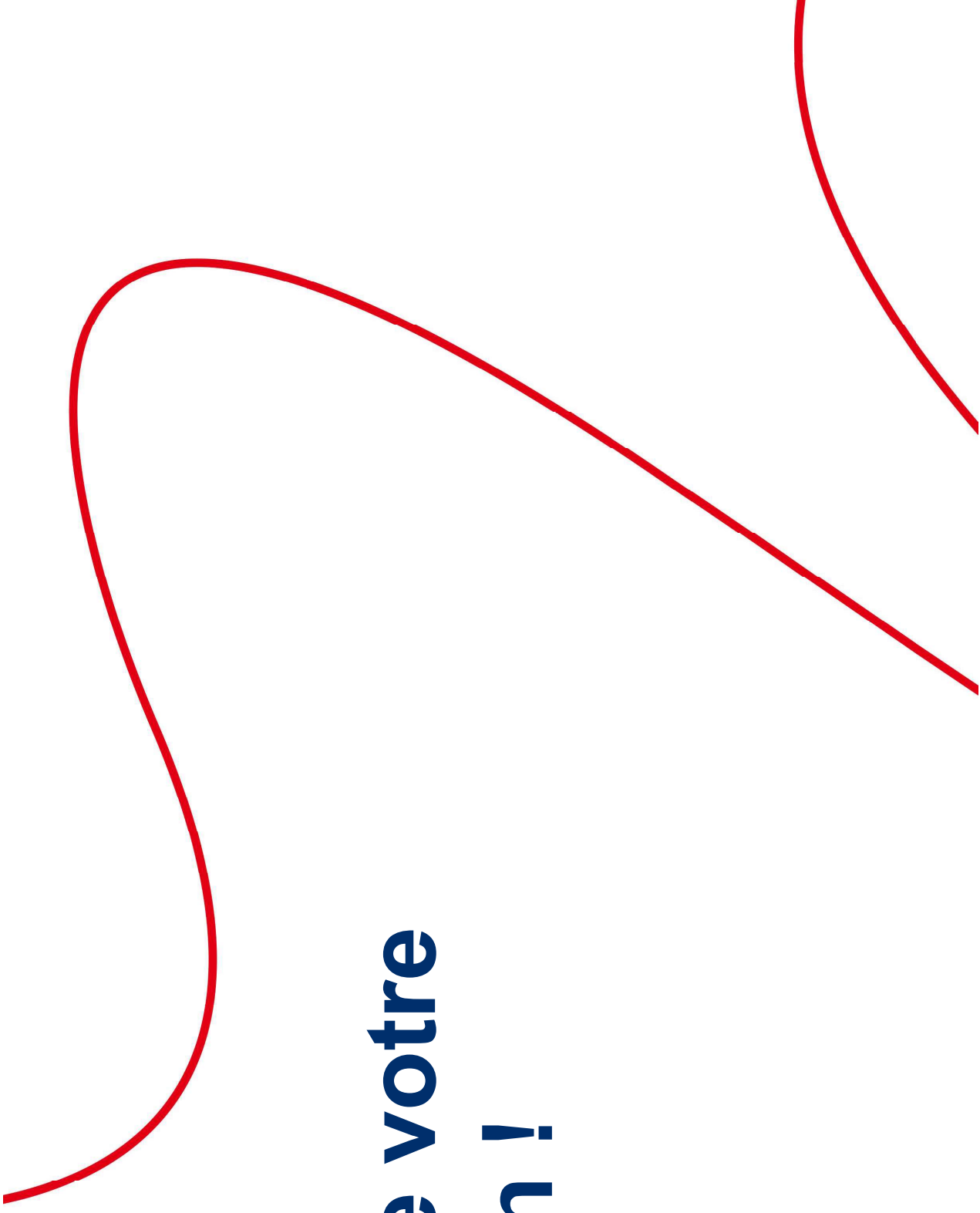


⇒ Avec parfois à la clé la découverte d'un nouvel antigène voire d'un nouveau système de groupe sanguin !

La découverte d'un nouveau système de groupe sanguin peut avoir un **impact bien au-delà de la médecine transfusionnelle !**

Ceci est d'autant plus vrai en cas de découverte de nouveaux phénotypes nuls, pouvant être assimilés à des "*knockouts humains*" et qui représentent une ressource unique pour les laboratoires d'immuno-hématologie de référence et la recherche médicale





# Merci de votre attention !

**CONTACT**

[thierry.peyrard@efs.sante.fr](mailto:thierry.peyrard@efs.sante.fr)