

Perspectives d'utilisation de la synthèse organique dans le domaine des groupes sanguins*

par C. Ropars

(Centre National de Transfusion Sanguine, Paris)

Des progrès très importants ont été réalisés récemment par les chimistes organiciens dans la synthèse des structures glucidiques. Ces développements permettent d'envisager pour les prochaines années, l'utilisation de composés de synthèse dans des domaines jusqu'ici exclusivement réservés aux biologistes.

Les antigènes de groupes sanguins dont certains sont maintenant bien définis sur le plan structural constituent des modèles de choix pour l'établissement d'une collaboration fructueuse entre chimistes et biologistes.

Ci-dessous seront décrites succinctement les principales structures oligosaccharidiques, actuellement connues, possédant une spécificité de groupe sanguin.

Quelques exemples d'utilisation des composés de synthèse correspondants seront ensuite mentionnés.

I. Polyosides à spécificités de groupes sanguins

Les données biochimiques précises concernant les structures des groupements immunodominants des antigènes de groupes sanguins sont actuellement essentiellement limitées aux systèmes suivants :

- Antigènes A, B, H et Lewis, dans les sécrétions ou à la surface des érythrocytes.
- Système P (antigènes P1, P, Pk).
- Système MN et associés.
- Antigènes de polyagglutinabilité T et Tn.
- Quelques hypothèses peuvent être formulées pour les antigènes I, i.

Les nombreux autres systèmes antigéniques semblent mettre en jeu des interactions entre les parties protéiques et lipidiques de la membrane érythrocytaire mais les structures immunodominantes correspondantes sont encore inconnues.

A l'exception des antigènes des systèmes ABH et Lewis les schémas de biosynthèse sont encore très hypothétiques.

La constitution biochimique des antigènes de groupes sanguins dépend de la nature protéique ou lipidique des molécules qui portent les groupements immunodominants. Dans les liquides de sécrétions, il s'agit essentiellement de glycoprotéines portant les spécificités ABH, Le^a et Le^b ainsi que l'antigène I sécréteur. A la surface de l'érythrocyte il est nécessaire de considérer une zone glycoprotéique, une zone glycolipidique et une zone mixte à caractère lipoprotéique.

Le tableau I regroupe la localisation des principaux antigènes selon ces zones. Dans la zone mixte l'expression antigénique nécessite l'intégrité structurale constituée par les lipides et les protéines; la conformation spatiale joue donc un rôle important pour les antigènes qui y sont localisés (Anstee et Tanner, 1974).

Tableau I.

Distribution des principaux antigènes sur la membrane érythrocytaire

Zone glycoprotéique	Zone mixte	Zone glycolipidique
M, N, Nvg, Nrab,	Rh	ABH
Ss, U	Jk	Le ^a - Le ^b (exogènes)
T, Tn, En ^a	Fy	P
Pr1, Pr2	Cad - Sda	I, i
Certains I	Kp	Lu - Au
Récepteur myxovirus		

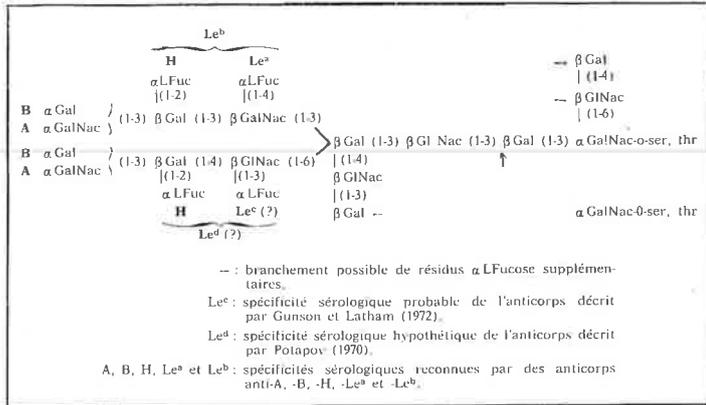
Pour les systèmes de groupes sanguins localisés dans la zone glycoprotéique et dans la zone glycolipidique, la spécificité immunologique est généralement portée par une structure oligosaccharidique.

* Conférence présentée au Séminaire de chimie organique de la S.C.F. du jeudi 16 décembre 1976, à Paris.

Initialement, les études portant sur la structure des antigènes ABH et Lewis ont été effectuées sur les liquides de sécrétion (Watkins, 1966). Ils ont permis à Kabat de proposer un modèle qui regroupait l'ensemble des données recueillies dans divers laboratoires : tableau II, Rovis *et al* (1973, a et b), Lloyd and Kabat (1968).

Tableau II.

Structure de la substance H glycoprotéique selon Lloyd et Kabat (1968) et Rovis et Kabat (1973).

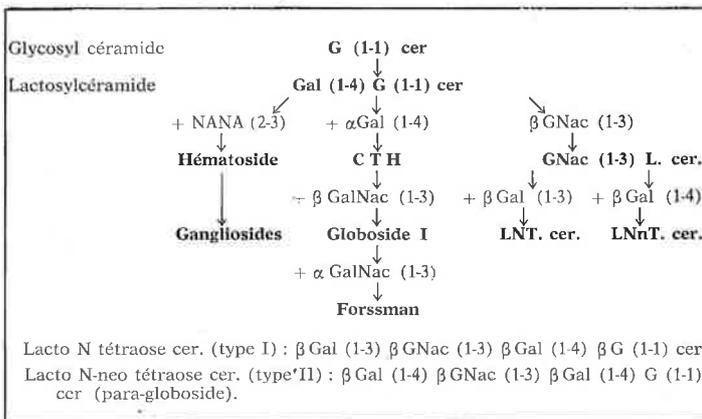


Ce diagramme met en évidence la présence de chaînes de type 1 — 3 ou 1 — 4 à partir desquelles se forment les structures ABH et Lewis. En outre, il révèle l'existence de structures pouvant répondre aux spécificités Le^a et Le^d proposées respectivement par Gunson (1972) et Potapov (1970). Plus récemment, Graham (1976) a proposé pour la spécificité Le^c la chaîne de type 1-3 et pour la spécificité Le^d, le dérivé monofucosylé correspondant.

Malgré quelques controverses, au niveau de la membrane érythrocytaire, il apparaît actuellement que les antigènes ABH et Lewis sont probablement uniquement de nature glycolipidique. Le tableau III rappelle la formation des principaux céramides érythrocytaires. Le lacto-N-néotétraose-céramide et ses dérivés, analogue à la structure 1-4 de Kabat et collaborateurs, sont les supports essentiels des spécificités ABH. Les antigènes érythrocytaires Le^a et Le^b sont d'origine exogène, transportés par les lipoprotéines sériques, et absorbés sur la membrane de l'hématie (Marcus et Cass, 1969).

Tableau III.

Céramides érythrocytaires.



Plusieurs auteurs ont décrit les glycolipides à spécificité ABH représentés sur les tableaux IV, V et VI. Ces travaux sont analysés en détail dans les revues de Hakomori et Kobata (1974), Koscielak *et al* (1972, 1973). Récemment, Watanabe *et al* (1975) ont explicité la structure du céramide H 3 dont dériverait le céramide A^c.

Enfin, Gardas et Koscielak (1974) ont décrit des mégaloglycolipides isolés des membranes érythrocytaires contenant de 20 à 40 résidus oligosaccharidiques qui pourraient être analogues à la structure A^c de Hakomori.

Tableau IV.

Céramides érythrocytaires à spécificité H.

H ₁	β Gal (1-4) β GNac (1-3) β Gal (1-4) G (1-1) - cer 2 α LFuc	Hakomori et al., Koscielak et al.
H ₂	β Gal (1-4) β GNac (1-3) β Gal (1-4) β GNac (1-3) β Gal (1-4) G (1-1) - cer 2 α LFuc	Hakomori et al., Koscielak et al.
H ₃	Plus complexe que H ₂ , peut-être une structure branchée	Hakomori
H ₃ ^c	Traces, structure non identifiée très complexe	Koscielak

Tableau V.

Céramides à activité A (hématies A₁). Hakomori *et al* (1972).

Aa —	α GalNac (1-3) β Gal (1-4) β GNac (1-3) (Gal) _n (1-4) G (1-1) - cer 2 α LFuc	
Ab —	α GalNac (1-3) β Gal (1-4) β GNac (1-3) β Gal (1-4) β GNac (1-3) (Gal) _n (1-4) G (1-1) - cer 2 α LFuc α LFuc	
Ac —	α GalNac (1-3) β Gal (1-4) β GNac (1-3) β Gal (1-4) β GNac (1-3) β Gal _n (1-4) G (1-1) - cer (α GalNac) _m β Gal (1-4) β GNac (1-6) 2 α LFuc	
Ad —	Semblable à Ac mais avec un excès de GNac et des structures branchées additionnelles.	

Tableau VI.

Céramides à spécificité B.

BI	α Gal (1-3) β Gal (1-4) β GNac (1-3) β Gal (1-4) G (1-1) cer 2 α LFuc	Koscielak, 1973
BII	α Gal (1-3) β Gal (1-4) β GNac (1-3) β Gal (1-3) β GNac (1-3) β Gal (1-4) G (1-1) cer 2 α LFuc	Idem
Autres glycolipides ABH		
Des mégalo-glycolipides sont présents dans les membranes érythrocytaires. Ils sont solubles dans l'eau et contiennent 20-40 résidus oligosaccharides. Ces structures complexes peuvent être équivalentes au céramide Ad de Hakomori et al.		

Tableau VII.

Contrôle et régulation de la biosynthèse des substances à activité de groupe sanguin ABO, H et Lewis.

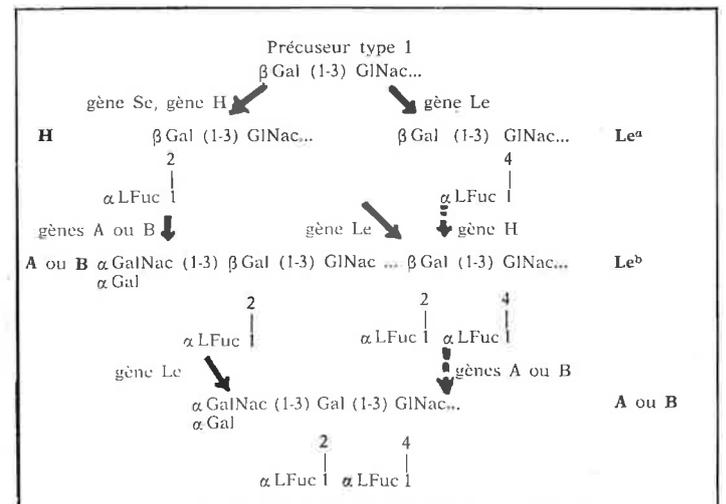


Tableau XIII.

Relation entre les spécificités et les structures biochimiques pour le système MN.

R.D.E., Myxovirus	α NANA —
Tn, HP, Db, Bp, Ia	α GalNac-O-Ser, Thr
T, Nvg	β Gal (1-3) α GalNac-O-Ser, Thr
N. Nvg	β Gal (1-3) α GalNac-O-Ser, Thr 6 2 NANA — Lys, Arg
M. Nvg nég.	β Gal (1-3) α GalNac-O-Ser, Thr 3 2 NANA — Lys, Arg

M et N sont détruits par acétylation des Lys. et Arg.
Nvg est accru.

Par ailleurs, les travaux de Roelcke ont montré que les antigènes Pr 1, Pr 2, Pr 3 et Pra sont localisés sur les acides sialiques de la membrane érythrocytaire.

De nombreux autres systèmes complexes de groupes sanguins ne sont pas encore identifiés du point de vue des structures biochimiques, tels que les systèmes Rhésus, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran pour ne citer que les plus importants.

Certaines de ces spécificités sont très probablement portées par les séquences des protéines membranaires mais il est vraisemblable que, au moins pour certains d'entre eux, des structures oligosaccharidiques sont mises en jeu. Les travaux actuellement en cours devraient permettre d'identifier les déterminants structuraux responsables de ces divers spécificités.

II. Quelques possibilités d'utilisation des structures obtenues par synthèse chimique

Les voies ouvertes par l'existence de composés homologues de synthèse sont très importantes et susceptibles de développements à long terme non seulement pour les groupes sanguins mais aussi dans d'autres domaines de la biologie. Très brièvement, seront résumées ci-dessous quelques-unes de ces perspectives.

Le biochimiste est fréquemment confronté à divers types de difficultés lorsqu'il s'agit de purifier une substance naturelle, en particulier lorsqu'elle est impliquée dans le polymorphisme humain. En effet, cette substance est généralement produite en très faible quantité bien que largement répandue chez les individus d'une même espèce en outre, elle est souvent présente dans un environnement complexe, comme une membrane cellulaire, à partir de laquelle il est difficile de l'isoler.

Par exemple, les céramides érythrocytaires ABH isolés d'une centaine de litres de sang ne représentent que quelques dizaines de mg. La possibilité de disposer de groupements chimiquement purs permet des utilisations privilégiées.

a. Préparation d'immunoabsorbants spécifiques

Ce type d'application est l'un des aspects de la chromatographie d'affinité actuellement en pleine expansion.

La détermination des groupes sanguins des donneurs de sang, pour les différents systèmes mentionnés ci-dessus, s'effectue à l'aide de sérums-tests d'origine humaine ou produits par immunisation d'animaux. Pour effectuer la détermination systématique du groupe Rhésus standard (antigène D), il est utilisé chaque année en France plusieurs milliers de litres d'antiserum anti D. Pour que la spécificité de ce réactif, d'origine humaine, soit dirigée uniquement contre l'antigène D, il est nécessaire d'absorber les anticorps naturels anti A et anti B, initialement présents dans ces sérums, sur des globules rouges A ou B, de groupe Rhésus négatif.

Plusieurs milliers de litres de sang du groupe B Rhésus négatif sont utilisés à cet effet. Ce qui représente non seulement des manipulations de très gros volumes mais surtout utilise un sang relativement rare (fréquence du groupe B, Rh négatif : 1,2 % de la population). Ceci a comme conséquence de créer, artificiellement, une pénurie de flacons de sang de ce groupe destinés à la transfusion sanguine.

L'équipe de Pr Lemieux (Canada) a synthétisé le trisaccharide à spécificité B :



Il est possible de coupler ce composé sur un support solide et de créer de ce fait un modèle artificiel, pour la fonction considérée, des globules B Rhésus négatif. Cet immunoabsorbant peut en outre être régénéré. De ce fait, prochainement, la « pénurie » de globules rouges B Rhésus négatif devrait cesser.

Le même type de composé peut être utilisé pour résoudre d'autres problèmes où intervient cette fois une fréquence encore plus rare de combinaisons de systèmes de groupe sanguin, comme le montre l'exemple suivant.

Certains sujets appartiennent au groupe exceptionnel négatif pour l'antigène Cellano (système Kell) et développent dans certaines circonstances un anticorps anticellano susceptible d'être utilisé comme sérum test pour l'antigène cellano.

Comme précédemment, il est nécessaire d'absorber les anticorps naturels anti B de ces sujets à l'aide de globules rouges d'un sujet de groupe B, cellano négatif. Une telle combinaison ne se trouve que 1,7 fois pour 10 000. Quelques milligrammes de l'immunoabsorbant précédent sont susceptibles de jouer le même rôle.

De tels exemples pourraient être multipliés et leur incidence sur le prix de revient des sérums-tests, indispensables à la Transfusion Sanguine, peut être très importante.

b. Préparation de substances immunisantes spécifiques

L'immunisation des animaux pour la préparation des sérums tests, par exemple anti-Le^a ou anti-Le^b, s'effectue en injectant des salives humaines, contenant les antigènes correspondants. L'utilisation d'un tel système immunogène a comme conséquence non seulement la formation d'anticorps anti-Le^a ou anti-Le^b mais stimule la formation d'une multitude d'anticorps d'autres spécificités dont il est ensuite difficile de se débarrasser par des absorptions successives sur des globules rouges sélectionnés.

L'utilisation de substance comportant exclusivement les déterminants Le^a ou Le^b permet de simplifier considérablement ce problème.

En outre, l'immunisation s'effectue en utilisant une substance macromoléculaire porteuse des groupements spécifiques. La nature chimique de cette substance influe sur la réponse immunitaire, il est donc théoriquement possible, en faisant varier la composition de cette macromolécule, de moduler la formation des anticorps sans modifier la spécificité liée au groupement immunodominant, ce qui n'est pas réalisable par l'utilisation de salives.

Un exemple analogue est fourni pour la préparation des anticorps anti P 1 qui actuellement sont présents et systématiquement recherchés dans le sang des chevaux infestés par des ascaris. De bons réactifs ne se rencontrent cependant qu'occasionnellement. Le dépistage systématique représente donc une méthode onéreuse et peu satisfaisante qui pourrait être modifiée par l'utilisation d'une substance purifiée à spécificité P 1 qui permettrait une immunisation contrôlée.

Perspectives. Conclusions. Bibliographie

Les quelques exemples précédents bien entendu non limitatifs, illustrent le grand intérêt pratique des substances de synthèse analogues des antigènes de groupes sanguins. Leur utilisation dans le domaine de la recherche fondamentale n'en est pas moins vaste car elles permettent au biochimiste de disposer de modèles et de substrats qu'il est souvent difficile et fastidieux de purifier en quantité suffisante.

Bien entendu, l'utilisation de tels composés n'est pas limitée à l'immunohématologie. En bactériologie, par exemple, la structure oligosaccharidique de nombreux antigènes bactériens est actuellement bien connue et les mêmes types d'utilisation peuvent être proposés. En parasitologie, le développement de l'immunologie parasitaire permet d'envisager la réalisation prochaine de vaccins contre certains types de maladies. L'extension sur une très grande échelle de ces vaccinations ne pourra sans doute être abordée qu'avec l'apport de la chimie organique de synthèse.

Outre, les structures oligosaccharidiques neutres, actuellement réalisables, il faut maintenant mettre au point la synthèse de composés contenant des acides sialiques, largement répandus dans la nature. De même, d'ores et déjà, il est nécessaire de conjuguer la synthèse saccharidique et la synthèse protéique afin de réaliser des structures biologiquement actives dont les antigènes M et N constituent un exemple privilégié.

Bibliographie

- A. M. Adamy and R. H. Kathan, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1969, 37, 171.
 D. J. Anstee and M. J. A. Tanner, *Eur. J. Biochem.*, 1974, 45, 31.
 D. J. Anstee and M. J. A. Tanner, *Vox Sang.*, 1975, 29, 378.
 M. A. Chester, The role of Fucosyltransferases in the biosynthesis of blood group substances. (Thèse de Ph. D. University of London, 1971.)
 H. T. Cory, A. D. Yates, A. S. R. Donald, W. M. Watkins and W. T. H. Morgan, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1974, 61, 1289.
 W. Dahr, G. Uhlenbruck and G. W. G. Bird, *Vox Sang.*, 1974, 27, 29.
 M. Fellous, A. Gerbal, C. Tessier, J. Frezal, J. Dausset and Ch. Salmon, *Vox Sang.*, 1974, 26, 518.
 A. Gardas and K. Koscielak, *F.E.B.S. Letters*, 1974, 42, 101.
 H. H. Gunson and V. Latham, *Vox Sang.*, 1972, 22, 344.
 S. I. Hakomori and A. Kobata, Blood Group A antigens in : the antigens (1974, M. Sela, Éditeur, Academic Press), p. 79-140.
 J. Koscielak, A. Gardas, H. Gorniak, T. Pacuska and A. Piasek, 1972, Amer. Ass. Blood Banks (Schmidt Éditeur), p. 149.
 J. Koscielak, A. Piasek, H. Gorniak, A. Gardas and A. Gregor, *Eur. J. Biochem.*, 1973, 37, 214.
 E. Lisowska and M. Duk, *Vox Sang.*, 1975, 28, 392.
 K. O. Lloyd and E. A. Kabat, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1968, 61, 1470.
 D. M. Marcus and L. E. Cass, *Science*, 1969, 164, 553.
 M. Naiki, J. Fong, R. Ledeen and D. M. Marcus, *Biochemistry*, 1975, 14, 4831.

- M. Naiki and D. M. Marcus, *Biochemistry*, 1975, 14, 4837.
 G. I. Pardoe, G. Uhlenbruck and U. Reifenberg, *Med. Lab. Technology*, 1971, 28, 255.
 G. I. Pardoe and G. Uhlenbruck, *Med. Laboratory Technology*, 1972, 29, 351.
 M. I. Potapov, *Probl. Haematol. Moscou*, 1970, 15, 45.
 L. Rovis, B. Anderson, E. A. Kabat, F. Gruezu and J. Lia, *Biochem.*, 1973a, 12, 5340.
 L. Rovis, E. A. Kabat, M. E. A. Pereira and T. Feizi, *Biochem.*, 1973b, 12, 5355.
 G. F. Springer and P. R. Desai, *Biochem. Biophys. Comm.*, 1974, 61, 470.
 D. B. Thomas and R. J. Winzler, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1969, 35, 811.
 K. Watanabe, R. A. Laine and S. I. Hakomori, *Biochemistry*, 1975, 14, 2725.
 W. M. Watkins, Blood group specific substances in : Glycoproteins, their composition structure and function (1966, A. Gottschalk, éditeur B.B.A. Library), Elsevier Publishing Company, Vol. 5, p. 562.

Note de la Rédaction

Ce texte comporte de larges extraits de l'article « Aspects biochimiques des antigènes de groupes sanguins », paru dans la *Revue Française de Transfusion et Immunohématologie* (1976, 19, 193-206). Nous remercions la librairie Arnette, éditeur de cette publication, de nous avoir permis la reproduction des tableaux.

Synthèse des substances de groupes sanguins*

par Pierre Sinay

(Laboratoire de biochimie structurale, U.E.R. de Sciences Fondamentales et Appliquées, 45045 Orléans Cedex)

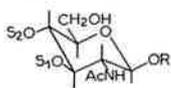


La synthèse pratique d'oligosaccharides complexes demeure un des plus grands problèmes de la chimie des sucres. On peut s'en étonner alors que les méthodes d'obtention de polypeptides et de polynucléotides sont comparativement beaucoup plus élaborées. Sans doute la cause d'un tel état de fait est-elle double : complexité du problème, inhérente notamment à la polyfonctionnalité des molécules employées et développement historique de la biochimie, qui a mis en vedette les protéines et

les acides nucléiques avant les hétérooligosaccharides. Parmi les structures glucidiques complexes d'origines bactérienne, végétale ou animale dont la structure est maintenant bien établie, les substances de groupes sanguins humains des systèmes classiques ABO et Lewis (voir article précédent) sont parmi les plus fascinantes. De par la variété des liaisons mises en jeu et l'intérêt que peuvent présenter certains déterminants antigéniques synthétiques au niveau de la pratique transfusionnelle, ces substances constituent des modèles idéaux pour le chimiste organicien. Ce bref article n'a pas pour but d'analyser en détail les quelques synthèses réalisées à ce jour (1-7), mais de montrer au lecteur non spécialiste que l'emploi judicieux de quelques techniques bien particulières à la chimie des sucres permet d'obtenir ponctuellement des résultats assez spectaculaires.

Quelques réalisations

Le système Lewis (8) met en jeu des dérivés bisubstitués de la N-acétyl-D-glucosamine, du type :



* Conférence présentée au Séminaire de Chimie organique de la S.C.F. du jeudi 16 décembre 1976, à Paris.

La synthèse chimique des différents déterminants antigéniques de ce système (Le^a, Le^b, Le^c et Le^d) commence donc par l'obtention d'un dérivé convenablement protégé de la N-acétyl-D-glucosamine permettant la réalisation d'un branchement. Le composé **1** que nous avons finalement retenu (6) (Figure 1)

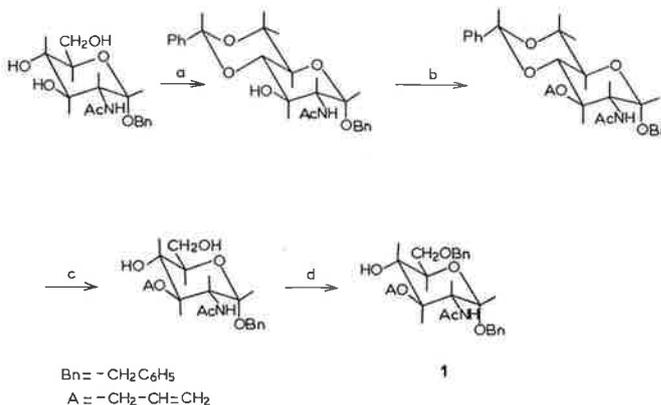


Figure 1.

Synthèse d'un précurseur **1** des motifs antigéniques du système Lewis. Réactifs : a, PhCHO, ZnCl₂; b, ABr, BaO, Ba(OH)₂·8 H₂O, DMF; c, CH₃COOH : H₂O; d, BnBr, BaO, Ba(OH)₂·8 H₂O, DMF.

présente de nombreux avantages. Il est très cristallin et facile à obtenir en quatre étapes à partir de l'acétamido-2-désoxy-2 α-D-glucopyranoside de benzyle; les substituants temporaires (Bn) ou semi-temporaires (A) employés sont stables et non réactifs dans les conditions habituelles des glycosylations; ils peuvent être éliminés séquentiellement dans des conditions douces (d'abord désallylation par le catalyseur de Wilkinson ou le palladium sur charbon (9), puis débenzylation par hydrogénation catalytique). De plus, ce dérivé est versatile et peut conduire aux quatre déterminants du système Lewis. Un dernier avantage, plus caché, mais qui sera apprécié par les connaisseurs de la synthèse osidique, est que l'hydroxyle en C-4 — véritable épouvantail des spécialistes par suite de sa prétendue très faible nucléophilie — est ici normalement réactif vis-à-vis de divers sucres activés.

A cet égard, les quatre réactions représentées ci-dessous indiquent clairement l'importance de la nature des groupements protecteurs temporaires de l'aglycone sur le rendement d'une réaction type Koenigs-