



L'influence des procédés de transformation sur les propriétés inflammatoires des culots globulaires

Mémoire

Lee-Ann McKinnon

Maîtrise en Biochimie
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Lee-Ann McKinnon, 2015

L'influence des procédés de transformation sur les propriétés inflammatoires des culots globulaires

Mémoire

Lee-Ann McKinnon

Sous la direction de :

Louis Thibault, directeur de recherche

André Darveau, codirecteur de recherche

Sonia Néron, codirectrice de recherche

RÉSUMÉ

Au cours de la dernière année, Héma-Québec a fourni plus de 236 000 culots globulaires aux centres hospitaliers du Québec, ce qui a permis de sauver la vie de milliers de gens. Les transfusions de ces produits sanguins ne sont toutefois pas sans risques. Il y a, chaque année, de nombreux cas d'effets aderses suite à une ou plusieurs transfusions. La TRIM (*Transfusions-Related Immunomodulation*) est un concept qui a été développé pour tenter d'expliquer plusieurs de ces observations. Selon la littérature, les produits fabriqués avec la méthode des couches leuco-plaquettaires seraient moins risqués pour le patient [1]. Mon projet consistait à mettre au point un modèle de transfusion *in vitro* permettant d'étudier les propriétés inflammatoires des culots globulaires fabriqués avec deux méthodes de transformation, soit la méthode des couches leuco-plaquettaires et le procédé de centrifugation à froid du sang total. Pour ce faire, différentes technologies ont été utilisées pour la transformation du sang à l'aide d'appareils automatisés, la cytométrie en flux pour l'analyse des populations cellulaires et le dosage des cytokines par ELISA.

Table des matières

RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS	xiii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Des produits sanguins	1
1.2. Le sang	3
1.2.1. Procédés de production des culots globulaires	3
1.2.2. Les globules rouges et leur conservation	6
1.2.2.1. Érythropoïèse	6
1.2.2.2. Caractéristiques et vieillissement <i>In vitro</i>	8
1.3. Effets adverses de la transfusion	10
1.4. Le système immunitaire	13
1.4.1. Immunité innée et adaptative	13
1.4.2. Réponse cellulaire et humorale	13
1.4.3. La réaction inflammatoire	16
1.4.4. La voie JAK-STAT	17
1.4.5. Les lymphocytes B, T et NK	18
1.4.6. Les neutrophiles et les macrophages	19
1.5. Hypothèses	19
1.6. Objectifs du projet de maîtrise	20
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	21
2.1. Produits sanguins	21
2.1.1. Participants	21
2.1.2. Transformation du sang en culots globulaires	21
2.1.2.1. Le procédé T1	21
2.1.2.2. Procédé des couches leuco-plaquettaires	22
2.1.3. Échantillonnage des culots globulaires	22
2.1.4. Paramètres biochimiques	23
2.2. Modèle de transfusion <i>in vitro</i>	23
2.2.1. Produits sanguins	23

2.2.1.1.	Témoins.....	23
2.2.1.2.	Stimulation et stimulants.....	24
2.2.2.	Activation <i>in vitro</i> des cellules mononuclées du sang (PBMC)	25
2.2.2.1.	Source de PBMC.....	25
2.2.2.2.	Cellules mononuclées du sang	26
2.2.2.3.	Préparation des banques de cellules.....	26
2.2.2.4.	Stimulation polyclonale des cellules mononuclées du sang	27
2.2.2.5.	Sélection du milieu nutritif	28
2.3.	Analyses cellulaires	29
2.3.1.	Cytométrie en flux	29
2.3.1.1.	Marqueurs extracellulaires.....	29
2.3.1.1.1.	Anticorps.....	29
2.3.1.1.2.	Viabilité.....	29
2.3.1.1.3.	Préparation des cellules pour les colorations	29
2.3.1.1.4.	Paramètres des analyses	31
2.3.1.1.5.	Fluorescence Minus One (FMO)	32
2.3.1.2.	Cibles intracellulaires – cascade de signalisation	33
2.3.1.2.1.	Anticorps.....	33
2.3.1.2.2.	Code-barres cellulaires en fluorescence (FCB)	34
2.3.1.2.3.	Stratégie des analyses	36
2.3.2.	Détection et dosages des cytokines.....	38
2.3.2.1.	Criblage des cytokines modulées.....	38
2.3.2.2.	Dosage de l'interleukin-6 par ELISA	39
2.3.2.3.	Dosage de la chimiokine RANTES par ELISA.....	40
2.3.2.4.	Dosage de l'interleukin-1 β	41
3.	RÉSULTATS.....	42
3.1.	Paramètres biochimiques des culots globulaires issus des deux procédés de transformation	42
3.2.	Mise au point de la stratégie des analyses des phénotypes cellulaires	44
3.2.1.	Méthodes de sélection des évènements et analyse des données comptabilisées	44

3.3. Modèle <i>in vitro</i>	49
3.3.1. Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononuclées.....	49
3.3.2. Influence de l'âge des culots globulaires sur les marqueurs d'activation des cellules mononuclées	57
3.4. Influence des surnageants de culots globulaires sur la cascade de signalisation intracellulaire	61
3.4.1. Définition de la stratégie d'analyse des populations de cellules.....	61
3.4.2. Cibles intracellulaires.....	65
3.5. Identification et dosage des cytokines secrétées par les cellules mononuclées.....	74
4. DISCUSSION.....	81
4.1. Le modèle d'étude <i>in vitro</i>	81
4.2. Le surnageant de culots SAGM provoque une augmentation de la proportion de monocytes et de macrophages exprimant le marqueur de surface CD14	83
4.3. Le surnageant de culots globulaires SAGM contribue au maintien de l'expression du marqueur de surface CD3 et augmente la proportion de cellules exprimant CD69.....	84
4.4. La phosphorylation des protéines intracellulaires.....	85
4.5. Des cytokines pro-inflammatoires secrétées suite à l'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 et SAGM	85
5. CONCLUSION.....	88
6. PERSPECTIVES	89
RÉFÉRENCES	90

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Les solutions nutritives commercialisées et licenciés dans les dernières années. Ces solutions nutritives sont utilisées partout dans le monde [3].	2
Tableau 1.2 Analyses effectuées sur 1 % des culots globulaires AS-3 et SAGM, les délais d'analyses ainsi que les critères d'acceptation pour 100% des produits testés. (Tableau tiré des normes du contrôle qualité d'Héma-Québec retrouvé dans le document SPE-00149).	6
Tableau 2.1 Analyse hématologique du contenu des chambres de leuco-réduction des appareils d'aphérèse. Tableau tiré de [34].	25
Tableau 2.1. Anticorps ajoutés pour les deux séries de marquages extracellulaires. ..	30
Tableau 2.2 : Contrôles permettant d'orienter les quadrants lors de la compensation selon les différents anticorps utilisés pour chacun des marquages A et B.....	32
Tableau 2.4. Combinaison de concentrations de colorants de chaque condition testée pour les trois receveurs à l'étude.	35
Tableau 2.5 : Cytokines humaines ciblées par la trousse TranSignal™ Human Cytokine Antibody Array 3,0 (Panomics Inc.).	39
Tableau 3.1 Composition des culots globulaires issus du procédé AS-3 et SAGM....	42
Tableau 3.1 Distribution des populations lors de la mise en culture au T=0 pour chacun des receveurs à l'étude dans le modèle de transfusion in vitro. A : Receveur #1 B : receveur #2 C : receveur #3	48

Listes des figures

Figure 1.1 Les différentes étapes de transformation pour obtenir trois produits labiles, un culot globulaire, un concentré plaquettaire et un plasma, à partir d'un don de sang total, par la méthode du procédé ATREUS (procédé SAGM).....	4
Figure 1.2 Les différentes étapes de transformation pour obtenir deux produits labiles, un culot globulaire et un plasma, à partir d'un don de sang total, par la méthode du procédé à froid (procédé AS-3).....	5
Figure 1.3 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse. La production de cellules sanguines à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes.	7
Figure 1.4 Image des globules rouges vieillissant <i>in vivo</i> . Ces photos sont tirées des travaux de Hovav et al. Elles ont été prises en microscopie électronique, de globules rouges isolés à différents temps d'entreposage, soient 1, 21, et 35 jours après la transformation en culots globulaires et démontrent leur évolution [14].	10
Figure 1.5 : Activation des lymphocytes cytotoxiques et inflammatoires en cellules effectrices et les molécules impliqués dans l'élimination du pathogène lors de la réponse cellulaire. Figure adapté de <i>Cellular and molecular Immunology</i> [28].....	15
Figure 1.6 : Activation des lymphocytes B par les lymphocytes T auxiliaires lors d'une réponse humorale [26].	16
Figure 2.1 : Mise en plateau et stimulation des cellules des trois receveurs.	27
Figure 2.2 Modèle de transfusion <i>in vitro</i> . Condition A: cellules contrôles non-stimulées; condition B: cellules non-stimulées + S/N de culot globulaire; Condition C: Cellules contrôles stimulées; Condition D: cellules stimulées + S/N de culot globulaire.....	28
Figure 2.4. Patron de coloration des quinze échantillons avec les colorants Pacific Blue DMPE et DyLight 800.	34
Figure 3.1 Paramètres biochimiques mesurés lors de l'entreposage des culots globulaires issus des deux procédés de transformation.	43
Figure 3.2 Détermination des régions pour la sélection des cellules mononuclées, à l'aide du logiciel FCS Express 4, pour l'analyse des phénotypes cellulaires sur la portion des cellules viables.	44

Figure 3.3 Proportion des sous-populations présentes dans les cellules mononucléées (CD45 ⁺ / Pacific Blue ⁻) au repos, dans un milieu sans protéine bovine, 4 heures après leur décongélation.	45
Figure 3.4 Proportion des cellules exprimant le marqueur d'activation CD69 suite à la stimulation au LPS, PMA et billes activatrices CD3/CD28 ⁺ , pour une période de 3 heures. 46	46
Figure 3.5 Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononucléées 30 minutes après l'ajout de surnageant de culot globulaire (moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un p<0,05.	50
Figure 3.6 Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononucléées 24 heures après l'ajout de surnageant de culot globulaire (moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un p<0,05.	52
Figure 3.7 Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononucléées stimulées avec du LPS, PMA et des billes activatrices CD3/CD28, 30 minutes après l'ajout de surnageant de culot globulaire (moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un p<0,05.	54
Figure 3.8 Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononucléées stimulées avec du LPS, PMA et des billes activatrices CD3/CD28, 24 heures après l'ajout de surnageant de culot globulaire (moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un p<0,05.	56
Figure 3.9 Influence des surnageants de culots globulaires sur les marqueurs d'activation des lymphocytes T, des lymphocytes B et des monocytes non stimulés après 30 minutes d'incubation avec des surnageant de culots globulaires.....	58
Figure 3.10 Influence des surnageants de culots globulaires sur les marqueurs d'activation des lymphocytes T, des lymphocytes B et des monocytes fortement stimulés après 24 heures d'incubation avec des surnageant de culots globulaires	60
Figure 3.11 Détermination des 15 populations distinctes lors de l'acquisition au cytomètre (acquisition de 150 000 évènements). Les résultats présentés proviennent des analyses faites au T=30 minutes après l'ajout du surnageant du culot globulaire SAGM #4, au jour 14 d'entreposage.....	62
Figure 3.12 Détermination des régions pour la sélection des cellules mononucléées, pour l'analyse du niveau de phosphorylation de différentes protéines intracellulaires, à l'aide	

du logiciel FCS Express 4. Les résultats présentés proviennent des analyses faites au T=30 minutes après l'ajout du surnageant du culot globulaire SAGM #4, au jour 14 d'entreposage.

..... 63

Figure 3.13 Analyse du niveau de phosphorylation de différentes protéines intracellulaires, pour chaque individu, à l'aide du logiciel FCS Express 4. Les résultats présentés proviennent des analyses faites au T=30 minutes après l'ajout du surnageant du culot globulaire SAGM #4, au jour 14 d'entreposage. 64

Figure 3.14 Ratio des niveau de phosphorylation de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 5 exprimé en fonction du témoin sans surnageant après 30 minutes d'incubation avec les surnageants des culot globulaires AS-3 et SAGM. Moyenne de 3 individus en triplicata. * indique un $p < 0,05$ 66

Figure 3.15 Ratio des niveau de phosphorylation de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 5 exprimé en fonction du témoin sans surnageant après 24 heures d'incubation avec les surnageants des culot globulaires AS-3 et SAGM. Moyenne de 3 individus en triplicata. * indique un $p < 0,05$ 68

Figure 3.16 Ratio des moyenne des intensités de fluorescence de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 5 exprimé en fonction du témoin sans surnageant après 30 minutes d'incubation avec les surnageants des culot globulaires AS-3 et SAGM..... 70

Figure 3.17 Ratio des niveau de phosphorylation de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 5 exprimé en fonction du témoin sans surnageant après 24 heures d'incubation avec les surnageants des culot globulaires AS-3 et SAGM. 72

Figure 3.18 Détection de 36 cytokines simultanément à l'aide de la trousse TranSignal™ Human cytokine array 3.0 74

Figure 3.18 Concentration de la cytokine pro-inflammatoires IL-6, dans le surnageant de culture après 24 heures d'incubation avec le surnageant de culot globulaire AS-3 ou SAGM (n=4). 76

Figure 3.19 Concentration de la cytokine pro-inflammatoires RANTES, dans le surnageant de culture après 24 heures d'incubation avec le surnageant de culot globulaire AS-3 ou SAGM (n=4)..... 77

Figure 3.20 Concentration de la cytokine pro-inflammatoires IL-1 β , dans le surnageant de culture après 24 heures d'incubation avec le surnageant de culot globulaire AS-3 ou SAGM (n=4)..... 79

Liste des abréviations

AS-3	Solution additive -3 (<i>Additive solution 3</i>)
CPD	Citrate-phosphate-dextrose
CP2D	Citrate-phosphate-double-dextrose
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succimidyl ester</i>
CPD	Citrate-phosphate-dextrose
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	<i>Extracellular regulated kinase</i>
FCB	<i>Fluorescent cell barcoding</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
ITS	<i>Insulin transferrin selenium</i>
LPS	Lipopolysaccharide
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
SAG-M	Saline-adenine-glucose-mannitol
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TRIM	<i>Transfusion-related immunomodulation</i>

REMERCIEMENTS

Je suis heureuse de pouvoir transmettre ici les remerciements aux personnes m'ayant permis d'avancer et de persévérer dans l'univers des sciences.

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement Louis Thibault, mon directeur de maîtrise, pour le temps qu'il m'a consacré et toute l'aide et énergie qu'il a investi dans ma formation. Je le remercie pour tous ses conseils ainsi que toutes nos discussions qui m'ont permis de grandir et de développer un esprit critique et scientifique. Je tiens également à remercier Sonia Néron, ma co-directrice de maîtrise, pour ses judicieux conseils et pour ses connaissances qu'elle a généreusement partagées avec moi pour me permettre de réussir. Je tiens également à remercier tous les membres de mon comité, pour leurs discussions et suggestions enrichissantes lors des rencontres de mon comité aviseur. Je remercie également tous les membres du groupe d'essai opérationnel (GEO), chacun d'entre vous ont participé à ma réussite à votre façon, plus particulièrement Marie-Pierre Cayer, qui a été mon mentor tout au long de ma maîtrise. Je remercie également Marie-Joëlle de Grandmont, Éric Ducas, Nathalie Dussault et Marie-Ève Nolin pour le temps précieux que vous avez consacré à mon projet de maîtrise. Je remercie également Dominique Chabot et Corinne Nadeau-Larochelle pour leur précieuse amitié qui a rendu ces deux dernières années des plus agréables et amusantes.

Je remercie également de CRSNG et le FQRNT pour leur soutien financier.

De plus, je tiens à remercier mes parents, Bob et Jocelyne, de m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de ma maîtrise. Je n'aurais pu demander mieux. Finalement, je remercie Kéven de tout mon coeur, pour son soutien, sa présence et son amour au cours de ces quatre dernières années.

1. INTRODUCTION

1.1. Des produits sanguins

Héma-Québec fournit plus de 200 000 culots globulaires aux centres hospitaliers de la province de Québec annuellement. Ces culots globulaires sont essentiels au traitement de patients atteints de maladies telles que l'hémophilie et la leucémie. Ils sont également utilisés lors d'une intervention chirurgicale ou encore pour sauver une personne victime d'un accident. Les culots globulaires ont donc plusieurs utilisations thérapeutiques et représentent un traitement essentiel à la survie de milliers de gens [1]. C'est vers 1628 que les premiers travaux sur les transfusions sanguines ont été réalisés et publiés par William Harvey. Les expériences se sont succédé avec plus ou moins de succès et il aura fallu presque 300 ans avant que Karl Landsteiner découvre l'existence de différents groupes sanguins et que Luigi Sabbatani découvre les propriétés anticoagulantes du citrate de sodium. En 1915, la première solution de conservation a été développée, un mélange de citrate et de glucose, afin de conserver les globules rouges de lapins qui servait aux tests d'agglutination pour la syphilis [2].

Ce n'est qu'au cours des années 1970 que la première solution nutritive, Saline-Adénine-Glucose (SAG) a été mise au point par des chercheurs européens pour conserver les globules rouges à des fins de transfusion sanguines. Jusqu'ici, les culots globulaires étaient conservés dans du plasma anticoagulé avec une solution de citrate ACD ou CPDA-1. Peu de temps après, en 1981, ces mêmes chercheurs ont ajouté du mannitol à la solution, devenue SAGM, afin de permettre une meilleur préservation de l'intégrité de la membrane des globules rouges réduisant ainsi le processus d'hémolyse. Cette ajout a également permis d'augmenter la période de conservation jusqu'à 42 jours à 4°C, en maintenant un pourcentage d'hématocrite entre 55 et 60% [3]. La solution nutritive SAGM est encore aujourd'hui très utilisée pour conserver les globules rouges, surtout en Europe et au Canada. Elle n'a jamais été licenciée par la FDA (Food and Drug Administration), et n'est donc pas utilisée aux États-Unis. Dans les années qui ont suivi, plusieurs solutions nutritives dérivées de la solution SAGM ont été développées et commercialisées, tels AS-1 (Additive Solution-1), AS-5, et AS-3 [3], présenté dans le tableau 1.1. La solution nutritive AS-3 a été introduite dans les années 80 et elle est utilisée par Héma-Québec depuis les années 90.

Tableau 1.1 Les solutions nutritives commercialisées et licenciés dans les dernières années. Ces solutions nutritives sont utilisées partout dans le monde [3].

Composants (mM)	Solutions additives pour globules rouges					
	SAGM	AS-1 Adsol Baxter	AS-3 Nutricel Pall Medical	AS-5 Optisol TerumoBCT	MAP	PAGGSM MacoPharma
NaCl	150	154	70	150	85	72
NaHCO ₃	-	-	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	-	-	16
NaH ₂ PO ₄	-	-	23	-	6	8
Acide citrique			2	-	1	
Na-citrate	-	-	23	-	5	-
Adénine	1.25	2	2	2.2	1.5	1.4
Guanosine	-	-	-	-	-	1.4
Dextrose (glucose)	45	111	55	45	40	47
Mannitol	30	41	-	45.5	80	55
pH	5.7	5.5	5.8	5.5	5.7	5.7
Anti- coagulant	CPD	CPD	CP2D	CPD	ACD	CPD

Légende : CPD: Citrate Phosphate Dextrose ACD : Anticoagulant Citrate Dextrose

Chaque pays, voire chaque banque de sang, utilise une sélection de solutions nutritives selon les recommandations du manufacturier et selon les procédés de fabrication qui y sont utilisés pour transformer leurs produits sanguins. Dans la province de Québec, les solutions nutritives SAGM et AS-3 sont toutes deux utilisées pour conserver les globules rouges pour une période de 42 jours, selon les recommandations du manufacturier et de l'association canadienne de normalisation (ACNOR) [4].

1.2. Le sang

Le sang qui circule dans notre corps est en fait une suspension de différents types cellulaires dans le plasma. Suite à l'activation de la cascade de coagulation, on obtient le sérum, dépourvu de fibrinogène, une protéine importante lors du processus de coagulation lorsqu'elle se transforme en fibrine et riche en composants sécrétés par les plaquettes sanguines. Il y a trois principaux composants dans le sang : les globules rouges, qui assurent l'oxygénation des tissus et des organes grâce à l'hémoglobine, les leucocytes, qui forment notre barrière immunitaire contre tout intrus, ainsi que les plaquettes [5].

Au point de vue mondial, lors d'un don de sang, trois procédés de fabrication et plusieurs solutions nutritives peuvent être utilisés pour produire différents produits sanguins. Les procédés permettent d'obtenir différents produits sanguins labiles tels des culots globulaires, des concentrés plaquettaires, des cryoprécipités et du plasma. Ces produits sanguins labiles sont utilisés pour de multiples traitements médicaux. Les concentrés plaquettaires, par exemple, sont majoritairement utilisés chez les patients atteints de cancer, mais peut également traiter et prévenir les saignements. Ce traitement thérapeutique a un large spectre d'utilisation, soit pour freiner une hémorragie active d'un polytrauma ou un saignement persistant chez un patient qui souffre d'un dysfonctionnement congénital des plaquettes. Le plasma et ces dérivés sont aussi utilisés pour contrôler et prévenir les hémorragies. Dans certains cas le plasma peut également servir à traiter des patients qui ont une carence plasmatique pour le facteur von Willebrand, une protéine importante impliquée dans la coagulation [4].

1.2.1. Procédés de production des culots globulaires

Tel que mentionné précédemment, il y a plus d'un procédés de fabrication qui permettent de transformer le sang total en différents produits sanguins. Héma-Québec utilise les trois procédés de fabrication afin de répondre aux besoins de la population québécoise. De tous les dons de sang transformés pour obtenir des culots globulaires, environ 80% sont fabriqués par une méthode directe à 4°C. Le reste des culots globulaires sont fabriqués soit par aphérèse ou par une méthode effectuée à température ambiante, aussi appelée la méthode des couches leuco-plaquettaires. La méthode par aphérèse repose sur l'utilisation d'un appareil automatisé qui sépare automatiquement les composants durant le don [4]. La

méthode des couches leuco-plaquettaires est principalement utilisée en Europe et, depuis peu au Canada, alors qu'aux États-Unis, les poches de sang sont transformées par le procédé à 4°C [3]. Au Québec, le procédé de transformation par la méthode des couches leuco-plaquettaires est réalisé à l'aide d'un appareil automatisé : Atreus (TerumoBCT). Le sang total est récolté dans une poche de polychlorure de vinyle (PVC) contenant une solution anticoagulante composée d'un mélange de citrate, de phosphate et de dextrose. Suite au prélèvement, le sang est rapidement refroidi à 20-24°C, à l'aide d'un système de refroidissement actif. Le refroidissement rapide permet de réduire le métabolisme des cellules et d'optimiser le rendement en plaquettes du procédé. Le sang total peut être conservé à cette température jusqu'à 24 heures avant d'être transformé en produits sanguins. Trois produits sanguins sont ainsi obtenus par cette méthode de transformation : le culot globulaire, les couches leuco-plaquettaires et le plasma. Pour la conservation et l'entreposage, la solution nutritive de saline contenant de l'adénine, du glucose et du mannitol (solution SAGM) est ajoutée aux culots globulaires lors de la leucoréduction. Les culots sont ensuite entreposés à 4°C pour une période de 42 jours. Lors de cette étape, la quasi-totalité des leucocytes est éliminée des produits sanguins par filtration pour réduire le risque de réactions transfusionnelles. L'importance de cette étape a été démontrée dans plusieurs articles [5, 6].

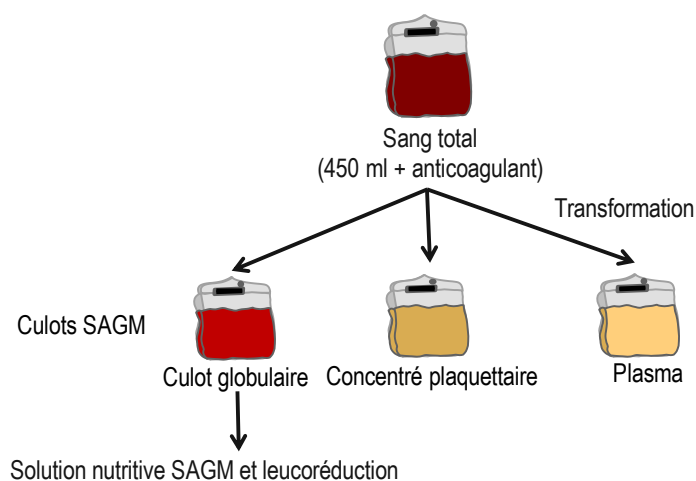


Figure 1.1 Les différentes étapes de transformation pour obtenir trois produits labiles, un culot globulaire, un concentré plaquettaire et un plasma, à partir d'un don de sang total, par la méthode du procédé ATREUS (procédé SAGM).

La deuxième méthode de transformation, qui est aussi appelé le procédé AS-3 car il utilise la solution nutritive AS-3 tel que décrite dans le tableau 1.1, se déroule entièrement à 4°C. Après le prélèvement, le sang est refroidi graduellement à une température entre 1 et 6°C et est transformé en produits sanguins, selon les normes nationales du Canada [4]. La première étape consiste à leucoréduire le sang total par filtration avant la séparation par centrifugation. Cette méthode produit deux produits sanguins: le culot globulaire et le plasma. Le procédé AS-3 ne permet pas la production de plaquettes, car celles-ci perdent leurs propriétés à la température basse du procédé, en plus d'être retirées par le filtre lors de la leucoréduction. La solution nutritive AS-3 est ajoutée aux culots globulaires qui sont ensuite entreposés à 4°C.

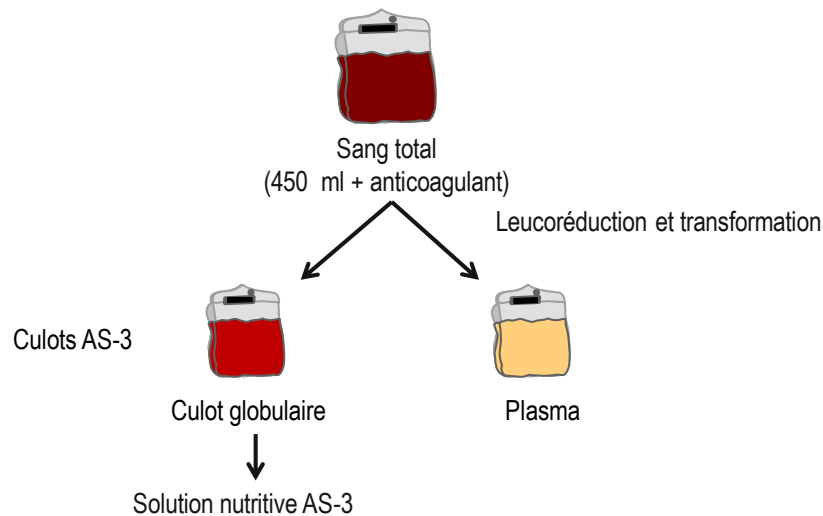


Figure 1.2 Les différentes étapes de transformation pour obtenir deux produits labiles, un culot globulaire et un plasma, à partir d'un don de sang total, par la méthode du procédé à froid (procédé AS-3).

Bien que Héma-Québec utilise différents procédés de fabrication pour obtenir des culots globulaires, les normes concernant la qualité de ces produits demeurent les mêmes, et sont assurées par le contrôle de qualité. Le tableau ci-dessous présente les analyses faites sur 1% des produits sanguins.

Tableau 1.2 Analyses effectuées sur 1 % des culots globulaires AS-3 et SAGM, les délais d’analyses ainsi que les critères d’acceptation pour 100% des produits testés. (Tableau tiré des normes du contrôle qualité d’Héma-Québec retrouvé dans le document SPE-00149).

	Analyse	Délai d’analyse	Critères d’acceptation
Culots globulaires	Leucocytes résiduels	0-48h	$< 5 \times 10^6$ / poche
AS-3 / ATREUS	Hémoglobine	S/O	≥ 35 g / poche
	Hématocrite	S/O	$\leq 0,80$ L / L
	Hémolyse	42-49 jours	$\leq 0,8$ %
	Stérilité	42-49 jours	négatif

1.2.2. Les globules rouges et leur conservation

1.2.2.1. Érythropoïèse

Le tissu myéloïde donne naissance à une grande variété de types cellulaires : les globules rouges, les polynucléaires, les monocytes, ainsi que les plaquettes. La figure 1.1 démontre la provenance de tous les types de cellules sanguines.

Chez l’embryon, le foie, la rate et la moelle ont également la capacité de produire des cellules myéloïdes. Après la naissance, le foie et la rate cessent la production de ces cellules et seule la moelle osseuse conserve cette caractéristique [2]. Les cellules souches myéloïdes se retrouvent aussi bien dans la moelle osseuse et dans le sang et elles circulent entre les deux. Avant de former un globule rouge mature, une cellule souche myéloïde doit franchir plusieurs étapes de différenciation. D’abord, la cellule souche franchit le stade de progéniteur, ou cellule souche prédifférenciée, pour ensuite se différencier progressivement vers la voie érythroblastique. Suite à plusieurs cycles de division cellulaire, elle se différencie définitivement pour former un globule rouge dépourvu de noyau [2]. La durée d’une vie normale d’un globule rouge en circulation dans le corps humain est de 120 jours [7].

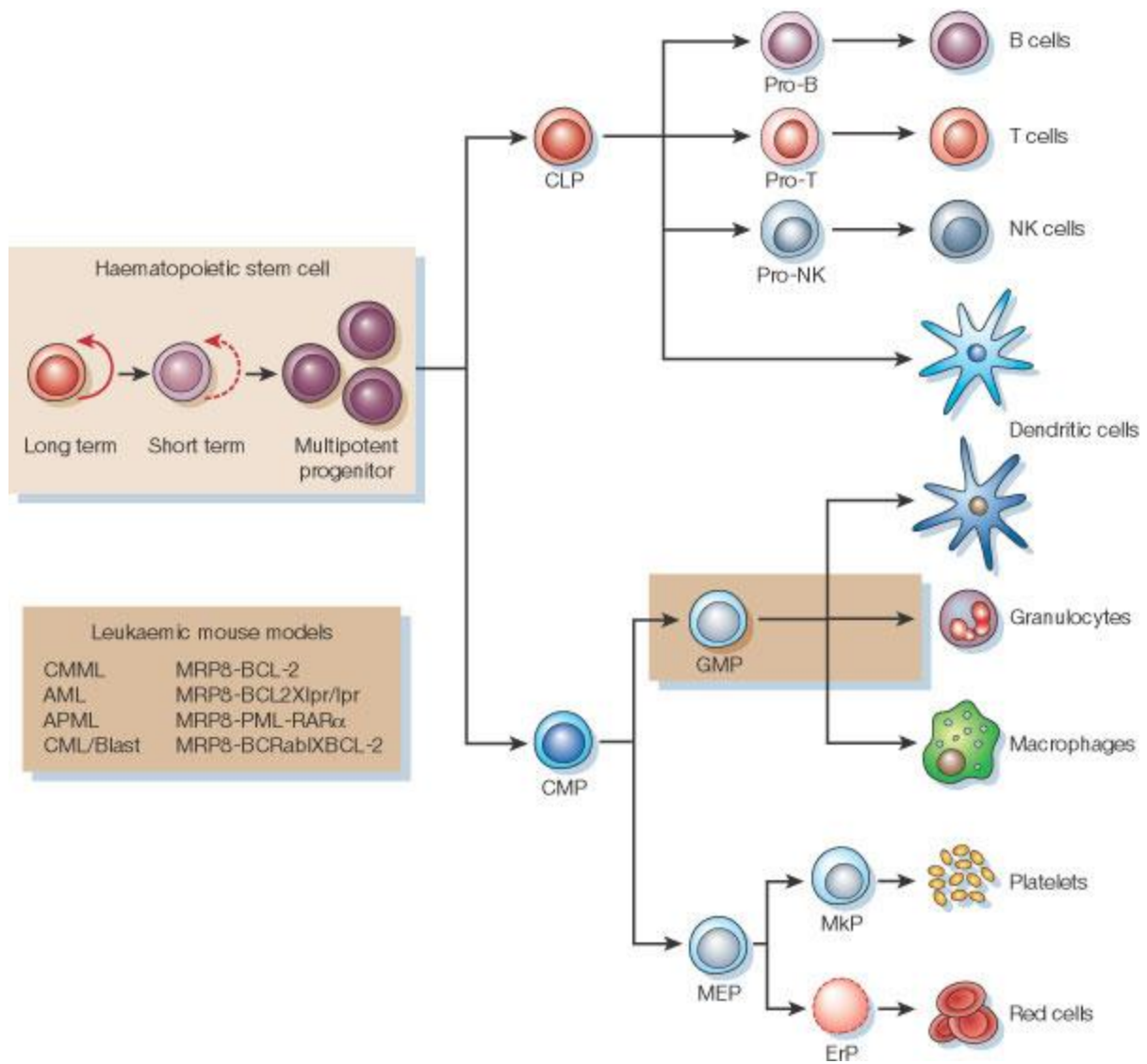


Figure 1.3 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse. La production de cellules sanguines à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes[8].

Le globule rouge mature est une cellule anucléée qui a la forme d'un disque très flexible et biconcave. La membrane des globules rouges est constituée d'une double couche de phospholipides, de cholestérol, et d'une panoplie de protéines membranaires. La fonction première des globules rouges est d'assurer le transport de l'oxygène du poumon vers les

différents tissus, à l'aide de l'hémoglobine. Le globule rouge est également responsable d'une partie du transport du gaz carbonique. Afin d'assurer son bon fonctionnement, le globule rouge doit lutter contre deux dangers éminents tout au long de sa vie : le stress oxydatif lié aux ions ferreux de l'hémoglobine et la pression osmotique. Une série de systèmes réducteurs, ainsi que son mécanisme de pompes à sodium, lui permettent de pallier à ces dangers [2].

De plus, le globule rouge survit grâce à l'énergie qui provient essentiellement de la dégradation du glucose. La glycolyse intra-érythrocytaire produit de l'ATP, qui assure l'activité de la pompe à sodium, et du NADH réduit qui participe à la réduction de la méthémoglobine en hémoglobine (Warrendorf and Rubinstein, The Elevation of Adenosine-Triphosphate levels in Human Erythrocytes, Blood Journal,42, 1973.)

1.2.2.2. Caractéristiques et vieillissement *In vitro*

En banque de sang, la durée de conservation d'un culot globulaire est plutôt courte. Selon les normes de Santé Canada, un culot globulaire peut être entreposé pour une période maximale de 42 jours à une température contrôlée de 1-6°C [4]. Cette limite d'entreposage repose sur les exigences de la FDA américaine (United States Food and Drug Administration), qui exige des manufacturiers de poches de sang que l'hémolyse du culot globulaire soit inférieure à 1% à 42 jours d'entreposage et que plus de 75 % des globules rouges transfusés survivent dans la circulation périphérique après un délai de 24 heures post transfusion [1]. La durée maximale de conservation des culots globulaires est basée sur deux critères généraux, alors qu'elle devrait davantage reposer sur la nature des lésions d'entreposage durant leur conservation *in vitro* et aussi sur la survie et le maintien de la fonctionnalité des globules rouges *in vivo* post transfusion [1].

Durant la transformation, les globules rouges sont aussi exposés à des forces centrifuges et doivent subir des stress mécaniques lors, des filtrations ainsi que des changements fréquents de températures [9]. Au cours de l'entreposage, les globules rouges sont aussi exposés à différents facteurs pouvant générer du stress oxydatif, l'induction de lésions des membranes, et des modifications biochimiques des protéines, des sucres et des lipides. Ces lésions d'entreposage peuvent être réversibles et irréversibles. À 4°C, l'activité des canaux sodiques diminue avec le temps, entraînant une diminution de la concentration de

sodium et l'augmentation du potassium dans le surnageant. La poche de PVC dans lequel est conservé le produit sanguin étant peu perméable aux échanges gazeux, le culot globulaire devient graduellement en condition anaérobie. En effet, cet environnement favorise la production d'énergie via la glycolyse menant à la production de lactate et de CO₂ ce qui entraîne une baisse du pH [8]. La pression partielle du CO₂ augmente, alors que la pression partielle de l'O₂ diminue [1]. La baisse du pH entraîne une augmentation de l'activité de diphosphoglycérate phosphatase responsable de la dégradation du 2,3-DPG, résultant en une diminution graduelle du niveau intracellulaire du 2,3-DPG [10]. Cette phosphatase, qui est responsable de la production du 2,3-DPG, change de conformation lorsque le sang s'acidifie et dégrade le 2,3-DPG plutôt que d'en produire. Le niveau d'ATP diminue également, car le taux de consommation est maintenant plus élevé que le taux de production suite à la baisse de la glycolyse. Le pourcentage d'hémolyse augmente graduellement au fur et à mesure que la membrane des globules rouges perd son intégrité. L'hémolyse est le relargage de l'hémoglobine dans le surnageant [1]. D'autres lésions d'entreposage incluent aussi la génération de radicaux libres, de protéines et lipides altérés ainsi que la perte de composants membranaires et cellulaires sous la forme de microparticules [11, 12]. La formation de microparticules est une façon pour les globules rouges de se débarrasser de fragments de membranes et de lipides oxydés et polymérisés [13].

Certains changements physiques occasionnés par le vieillissement *in vitro* sont similaires aux caractéristiques observés chez les globules rouges de patients atteints, entre autres, de la malaria, d'anémie falciforme, ou de thalassémie. Les récepteurs de surface de la membrane des globules rouges sont altérés ainsi que leur structure cytosquelettique qui contrôle leur forme, leur flexibilité (déformabilité) et leur agrégation [14]. La figure suivante démontre les changements physiques que subissent les globules rouges *in vivo*.

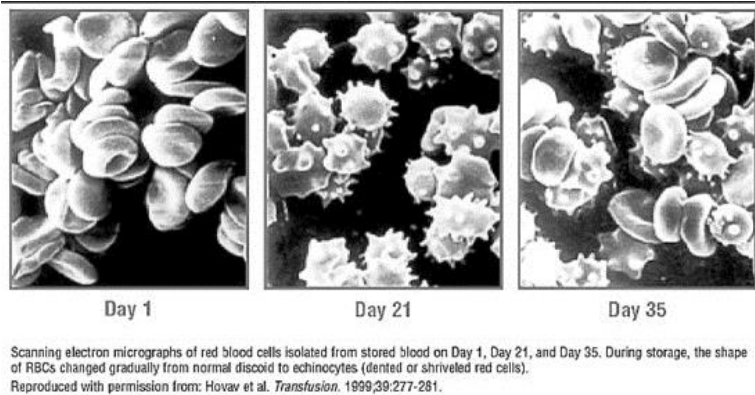


Figure 1.4 Image des globules rouges vieillissant *in vivo*. Ces photos sont tirées des travaux de Hovav et al. Elles ont été prises en microscopie électronique, de globules rouges isolés à différents temps d’entreposage, soient 1, 21, et 35 jours après la transformation en culots globulaires et démontrent leur évolution [15].

Néanmoins, bien que la fonction première des globules rouges consiste à transporter l’oxygène à partir des poumons jusqu’aux tissus, ils sont également d’importants régulateurs de la dynamique de la circulation sanguine. De ce fait, les globules rouges sont amenés à interagir avec d’autres composantes des vaisseaux sanguins, incluant les leucocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales. Selon les travaux de Anniss *et al.*, l’entreposage des culots globulaires augmenterait l’adhérence des globules rouges aux cellules endothéliales après la transfusion augmentant ainsi le risque d’occlusion des vaisseaux [16]. Donc, il serait possible que les changements occasionnés par l’entreposage des globules rouges affectent leurs interactions avec les cellules et les tissus du receveur.

1.3. Effets adverses de la transfusion

Il est de plus en plus connu que la transfusion de culots globulaires occasionne des effets indésirables à court et à long terme. Ces réactions peuvent être plutôt insignifiantes comme une réaction fébrile non-hémolytique ou encore une réaction allergique. Toutefois, les transfusions peuvent également occasionner des réactions sévères comme des infections systémiques, de la morbidité, le TRALI (*Transfusion-Related Acute Lung Injury*), ou encore des réactions mortelles comme la défaillance multiviscérale [1, 17]. Les causes de ces réactions, banales ou non, demeurent incertaines.

Les travaux de Sparrow *et al.* ont démontré que la concentration de la chimiokine RANTES augmentait avec le temps d'entreposage, un phénomène qui serait dû, selon eux, aux globules blancs résiduels dans les poches de sang, car le type de filtre utilisé pour la leucoréduction affectait la concentration de RANTES dans le surnageant de poches [5]. Les effets peuvent être immunosuppresseurs, comme l'ont suggéré les travaux de Muszynski *et al.*, qui ont observé que les culots globulaires âgés de 21 jours, lorsqu'ajouté à une population de monocytes stimulés au LPS, provoquaient une diminution de la sécrétion de TNF- α , et une augmentation de sécrétion de l'IL-10 [17]. En contrepartie, les travaux de Karam *et al.* suggèrent des effets pro-inflammatoires puis immunosuppresseurs dans leur modèle *in vitro*. Ils ont observé une augmentation du niveau d'IL-6 et de TNF- α initialement pour ensuite observé une diminution [16]. Ces essais ont été faits dans des cultures de sang total auxquelles étaient ajouté du surnageant de culots globulaires, et ce à différents temps d'entreposage des culots globulaires.

D'autres modèles *in vitro* et *in vivo* suggèrent une toute autre réalité quant aux effets inflammatoires des produits sanguins. Selon les travaux de Spitalnik *et al.*, dans un modèle murin, une augmentation a été observée au niveau de différentes cytokines pro-inflammatoire telles IL-6, MIP- β , TNF- α , et MCP-1 [18]. Les travaux de McCarter *et al.* ont également démontré que le surnageant de culots globulaires provoquait une réponse pro-inflammatoire lorsqu'ajouté à des cellules mononucléées. L'ajout de surnageant provenant de culots globulaires augmentait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α [19].

Les travaux mentionnés ci-haut suggèrent que les effets indésirables causés par la transfusion de culots globulaires augmenteraient en fonction de l'âge de ces culots globulaires. D'ailleurs, van de Watering a souligné la divergence entre les études cliniques rétrospectives publiées pour lesquelles la transfusion des culots globulaires serait moins dommageables pour les patients recevant les culots transformés par la méthode des couches leuco-plaquettaires, soit le procédé SAGM, remettant ainsi en cause les méthodes de transformation du sang, les composantes des solutions nutritives ainsi que les délais avant la transformation [20]. L'âge des culots globulaires n'est toutefois pas le seul facteur pouvant affecter les conclusions cliniques d'une transfusion. Les intervenants dans le domaine de la

transfusion considèrent que la relation impliquant le donneur, le produit, ainsi que le receveur ont un impact direct, car les paramètres phénotypiques polymorphes du donneur, les paramètres lésionnels induits sur le produit, ainsi que l'âge croissant des globules rouges et leur catabolisme naturel, et les paramètres que constituent le receveur, sa génétique, sa maladie causale et le traitement reçu sont tous des facteurs impactant directement le résultat de la transfusion [9]. Bien que ces facteurs soient des plus importants, seule la qualité du produit transfusé est considérée, et elle est basée sur des critères qui ne s'attardent pas aux lésions d'entreposage qui pourtant peuvent avoir un impact majeur.

L'immunomodulation liée aux transfusions (TRIM : *Transfusion-related immunomodulation*) est un concept utilisé pour expliquer plusieurs observations qui suggèrent que les transfusions de concentrés de globules rouges affectent le système immunitaire du receveur. Les TRIM seraient modulés par les leucocytes allogéniques et ils englobent une grande variété d'effets pouvant affecter la réponse immunitaire et inflammatoire d'un patient suite à une transfusion. Ces effets peuvent être autant immunosuppresseurs que pro-inflammatoires [21]. Les effets pro-inflammatoires peuvent induire des réactions adverses variant d'une légère réaction jusqu'au décès du patient en passant par une réaction allergique ou un syndrome de défaillance multiviscérale (rapport hémovigilance 2008). Le mécanisme responsable des TRIM demeure obscur, mais une prédisposition génétique du patient, ainsi que la nature de sa maladie, pourraient être des facteurs importants [1]. Toutefois, le receveur n'est pas le seul facteur dans l'équation. Le donneur peut également être en cause, le procédé de transformation, ainsi que les produits finis. Par exemple, les leucocytes résiduels, les cytokines, les microparticules que l'on retrouve dans les culots globulaires pourraient également être des causes probables des réactions adverses de la transfusion [9].

Des travaux antérieurs ont démontré que les transfusions de culots globulaires âgés de plus de 14 jours augmentent le risque de mortalité et/ou d'infection nosocomiale comparativement aux culots globulaires frais [22]. De plus, une théorie de seconde insulte a été proposée dans un article de Bilgin et Brand, qui stipule qu'un patient subissant une première insulte telle une chirurgie ou un accident, serait plus susceptible de développer une réaction immunitaire suite à la seconde insulte que représente une transfusion sanguine [23].

Plusieurs études cliniques ont également été effectuées pour déterminer l'impact de l'âge du sang sur les effets adverses des transfusions. Toutefois, ces études cliniques comptent de nombreux biais expérimentaux, tels l'âge des culots globulaires transfusés ainsi que le nombre et de type de composants sanguins transfusé, et l'âge des patients ainsi que leur état des patients pré-transfusion [24, 25].

1.4. Le système immunitaire

1.4.1. Immunité innée et adaptative

Les mécanismes de défense immunitaires peuvent être divisés en deux grandes voies, soit en l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée constitue la première barrière de défense de l'organisme contre une infection. Toutefois, cette première ligne de défense n'est que très peu spécifique, car elle ne fait pas la différence entre les différents pathogènes [12]. Les trois composants cellulaires de l'immunité innée sont les macrophages, les neutrophiles et les cellules cytotoxiques naturelles (NK). Les macrophages et les neutrophiles ont la capacité d'ingérer les agents infectieux pour les éliminer, un processus appelé phagocytose. Les cellules NK peuvent détruire une cellule infectée indépendamment de l'agent infectieux présent, car elles ne sont pas dotées de reconnaissance immune spécifique [12]. Bien que cette première ligne de défense soit très efficace et souvent suffisante à l'élimination de plusieurs agents infectieux, il arrive qu'elle ne suffise pas pour éliminer le pathogène. C'est à ce moment que l'immunité adaptative entre en jeu. L'immunité adaptative fait principalement appel aux lymphocytes T et aux lymphocytes B qui ont des récepteurs spécifiques pour les agents infectieux.

1.4.2. Réponse cellulaire et humorale

L'implication des cellules spécialisées est contrôlée par des messagers solubles et des interactions directes avec d'autres cellules. Une réponse immunitaire est donc induite lorsque des cellules T naïves rencontrent un antigène spécifique à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène, notamment une cellule dendritique, un macrophage ou un lymphocyte B. Cela nécessite la liaison de différentes molécules membranaires co-stimulatrices, tels CD40, BCR (B-cell receptor), TLR (Toll-like receptor) et CMH de classe II (Complexe majeur d'histocompatibilité) [26]. Les cellules présentatrices d'antigènes ingèrent l'antigène et le dégradent en peptides afin de les présenter à leur surface dans les

CMH (complexes majeurs d'histocompatibilité). Par la suite, le lymphocyte T possédant la spécificité au peptide exposé dans la niche du CMH se lie à la cellule présentatrice de l'antigène via son récepteur de surface TCR et le complexe CD3. Cette liaison intercellulaire doit être accompagnés de plusieurs autres interactions et permet ainsi l'activation du lymphocyte T en cellule effectrice via des signaux échangés entre les deux cellules [26].

Les lymphocytes T effecteurs se divisent en deux groupes majeurs : les lymphocytes T cytotoxiques ($CD8^+$), les lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$). Chaque groupe contient plusieurs sous-divisions, et chacun détient un rôle spécifique lors de la réponse immunitaire adaptative.

La réponse immune spécifique contre l'antigène peut être cellulaire ou humorale. Différents pathogènes, et même certains virus, peuvent utiliser la cellule infectée comme hôte afin de se multiplier. Ces cellules expriment alors des fragments de l'antigène à leur surface [27]. Dans le contexte où ces fragments sont présentés par des CMH de classe I, ce sont les cellules T cytotoxiques ($CD8^+$) qui reconnaissent les fragments antigéniques présentés. Ce type de lymphocytes T effecteurs induit ensuite un mécanisme d'apoptose et la mort de la cellule infectée. Si les fragments antigéniques sont présentés par des CMH de classe II, ce sont les lymphocytes T inflammatoires ($CD4^+$ T_H1) qui reconnaissent les fragments antigéniques présentés [27, 28]. Ces lymphocytes T effecteurs activent ensuite des macrophages afin qu'ils détruisent les pathogènes ingérés. Ces deux types de lymphocytes effecteurs sont les principaux intervenants lors d'une réponse immune de type cellulaire. La figure 1.2 résume l'activation des lymphocytes T cytotoxiques ou inflammatoires ainsi que les différentes molécules impliqués dans l'élimination du pathogène [28].

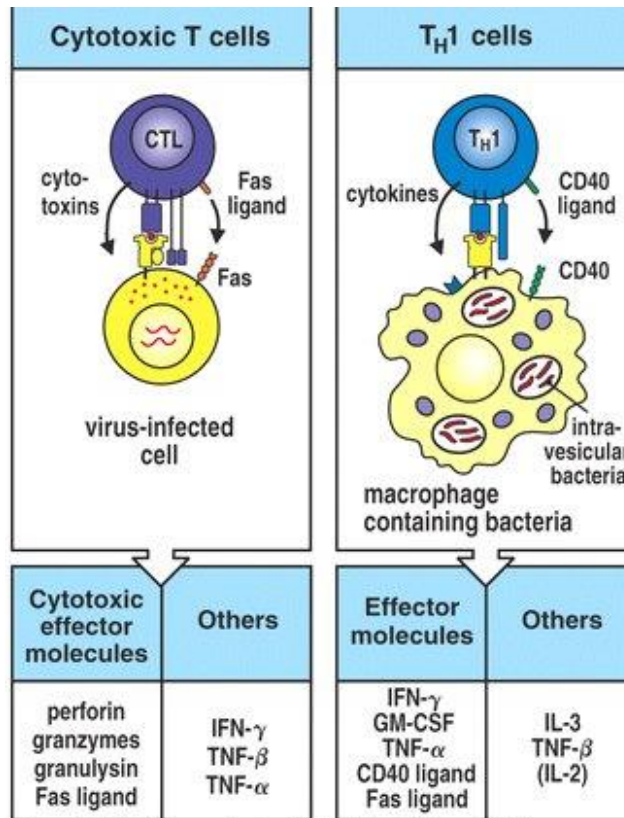


Figure 6-26 The Immune System, 2/e (© Garland Science 2005)

Figure 1.5 : Activation des lymphocytes cytotoxiques et inflammatoires en cellules effectrices et les molécules impliqués dans l'élimination du pathogène lors de la réponse cellulaire. Figure adapté de *Cellular and molecular Immunology*[29].

Lors d'une réponse humorale, les lymphocytes T auxiliaires, ainsi que les lymphocytes B sont les principaux médiateurs. Les lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$ T_H2) ont la capacité d'activer les lymphocytes B ayant déjà rencontré l'antigène dont un fragment est présenté par leur CMH. Cette activation se fait via une liaison entre le récepteur TCR du lymphocyte T et le CMH de classe II présentant l'antigène du lymphocyte B, dans les organes lymphoïdes secondaires tels la rate et les ganglions. Une des paires de récepteurs les plus importantes lors de cette interaction demeure celle entre le CD40 exprimé à la surface des lymphocytes B et le ligand de CD40, soit la molécule CD154 exprimée à la surface des lymphocytes T activés. D'ailleurs, cette paire de récepteurs est essentielle à la production d'anticorps par les lymphocytes B. Les lymphocytes T sécrètent différentes cytokines permettant la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, notamment les

interleukin-2, -4, -5, -6 et -10 [26]. Les lymphocytes B activés issus de cette interaction entrent en phase de prolifération intense, ce qui donne naissance aux centres germinaux dans lesquels se produit la maturation de l'affinité, la commutation de classe des immunoglobulines et la différenciation en cellules B mémoires ou en cellules sécrétrices d'anticorps : les plasmocytes. Les anticorps ainsi produits favorisent l'élimination de l'agent infectieux par différents processus tels la neutralisation, l'opsonisation et l'activation du complément. La figure 1.3 résume l'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T auxiliaires.

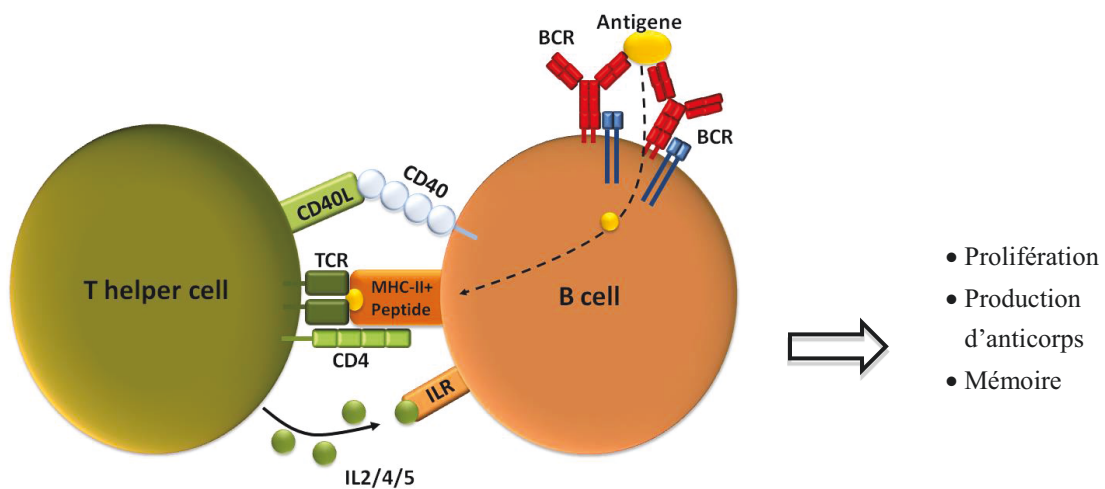


Figure 1.6 : Activation des lymphocytes B par les lymphocytes T auxiliaires lors d'une réponse humorale [26].

1.4.3. La réaction inflammatoire

Une réaction inflammatoire peut être déclenchée par une exposition à un agent pathogène, une maladie, un trauma ou une intervention chirurgicale. Les macrophages sont les premières cellules à être mobilisées en sécrétant des cytokines (IL-10, TNF- α) et des chimiokines, ainsi que d'autres molécules biologiquement actives. Ces dernières déclenchent le processus inflammatoire et attirent les neutrophiles et les monocytes vers la zone affectée. Les cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux sanguins sont également activées par les chimiokines et cytokines et elles favorisent la liaison des leucocytes à l'endothélium, les permettant d'adhérer et ensuite de migrer dans les tissus[16].

En bref, l'inflammation peut aider à contenir une insulte pathogénique, mécanique ou chimique. D'abord, les tissus sont endommagés, le système immunitaire détecte les dommages, puis les symptômes d'inflammation surviennent : douleur, chaleur, rougeurs, enflure, ainsi que perte de fonction. En fait, la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire provoquent les symptômes de rougeur, chaleur et gonflement, alors que ce sont les cellules inflammatoires, en libérant de médiateurs, qui provoquent la douleur au site infectieux [18, 30]. Ensuite, la cascade des médiateurs solubles s'enclenche et provoque une accumulation des médiateurs cellulaires tels des cytokines anti-inflammatoires et des inhibiteurs de protéases. Cette accumulation permet la résolution de l'inflammation grâce aux mécanismes de « *feedback* » puissants [27].

1.4.4. La voie JAK-STAT

Plusieurs voies de signalisation intracellulaire impliquant des cytokines et d'autres protéines induisent une réponse inflammatoire. La signalisation de cytokines, via la voie JAK-Stat module positivement et négativement tous les types de cellules impliqués dans l'initiation, la propagation, et la résolution de l'inflammation en régulant la différenciation et l'activité inflammatoire de ces cellules[31]. La nature de la réponse, soit pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, dépend en grande partie du récepteur de cytokine activé et du gène accessible. Les JAK (Janus Kinase) activent les STATs (traducteurs de signaux et activateurs de transcription) impliqués dans les voies de signalisation des réactions inflammatoires [32]. Les cytokines déclenchent la phosphorylation des JAKs, qui entraînent à leur tour la phosphorylation des STATs, qui migrent dans le noyau et démarrent la transcription génique spécifique. La cytokine IL-7 est impliquée dans la voie JAK1/STAT5a et STAT5b qui assure le développement des lymphocytes T. Cette voie est aussi prédominante dans le développement des T régulateurs, qui ont des fonctions immunosuppressives. La cytokine IL-10 déclenche la voie de signalisation JAK1/STAT3, qui régule le développement et la fonction des T helper 17 (Th17). Les Th17 produisent l'interleukine pro-inflammatoire IL-17 et recrutent et activent les neutrophiles, ainsi que d'autres cellules inflammatoires vers le site d'inflammation. La voie impliquant l'interféron IFN- γ et JAK1/STAT1 induit également une réponse pro-inflammatoire [33].

1.4.5. Les lymphocytes B, T et NK

Entre la cellule souche hématopoïétique et le lymphocyte B mature, plusieurs étapes cruciales doivent être franchies avec succès. D'abord, la cellule doit s'engager vers la voie lymphoïde pour atteindre le stade de CLP (common lymphocyte progenitor), en passant par différents stades. L'entrée vers la lignée B est initiée au stade LMPP, mais l'engagement se fait plus tard. Lors de la génération de cellules B matures, deux gènes activateurs de recombinaison : RAG1 et RAG2 ainsi que PAX5, un facteur d'engagement vers la lignée de lymphocytes B, sont très importants. Lors du développement vers un lymphocyte B mature, plusieurs points de contrôle et réarrangements prennent place dans la moelle. Tous ces réarrangements ont pour but de permettre à la cellule de poursuivre sa maturation et lorsque la combinaison est fonctionnelle, la cellule atteint le stade de B immature et elle se dirige vers la rate pour finaliser sa maturation[26].

Une fois la cellule B éditée et mature, elle demeure au repos mais toujours prête à interagir avec un antigène. Une fois l'antigène reconnu, il peut y avoir une réponse T-dépendante ou T-indépendante selon la nature de l'antigène. Lors d'une réponse T-dépendante, une cellule T helper devient un second stimulus pour activer le lymphocyte B suite à la reconnaissance de l'antigène. Dans le centre germinatif, le lymphocyte B entre en phase de prolifération et différenciation, pour produire des lymphocytes B à longue vie sécrétrices d'anticorps de forte affinité. Lors d'une réponse T-indépendante, se sont surtout des lymphocytes B de courte vie, majoritairement IgM, qui sont produites[26].

Les lymphocytes T, eux, proviennent de progéniteurs multipotents de la moelle osseuse qui migrent vers le thymus en passant par le sang. En présence de Notch et de son ligand Delta, la voie de développement des lymphocytes T est favorisée, et la voie de différenciation vers le lymphocyte B est opprimée. L'activité du thymus est optimale dès la naissance et demeure ainsi jusqu'à la puberté, pour ensuite diminuer avec l'âge[34]. Toutefois, bien que l'activité soit optimale, 95% des thymocytes produits dans le thymus y meurent. Ce haut taux de mort cellulaire permet l'élaboration du répertoire de TCR fonctionnel grâce aux multiples sélections positives et négatives. Les sous-populations de thymocytes se divisent en deux catégories : CD4 et CD8. Les thymocytes doivent cependant franchir plusieurs étapes d'engagement et de sélection assez tôt lors du stade DN1

(progéniteur multipotent). Suite à l'engagement, le développement de la cellule dépend du réarrangement et de l'expression du gène récepteur d'antigène (TCR). D'abord, le réarrangement des loci β , δ , et γ du TCR se fait simultanément entre les stades DN3 et DN4, puis c'est le tour du locus α du TCR entre les stades DN4 et DP. Suite au réarrangement des loci β , δ , et γ , certaines cellules se dirigent vers la lignée δ/γ . Les autres poursuivent au stade DN4. Ceux qui poursuivent vont passer à travers l'exclusion allélique, la sélection positive, puis s'engager vers la lignée CD4 ou CD8 tout dépendant de leur spécificité pour les CMH de classe I ou II. Une fois tous les points de contrôles et sélections franchis, la cellule devient un lymphocyte CD4+ ou CD8+ mature en attente d'un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène [35, 36].

1.4.6. Les neutrophiles et les macrophages

Les neutrophiles, bien qu'ils ne fassent pas partie des cellules mononuclées, travaillent de concert avec les macrophages afin de combattre les infections. Les neutrophiles et les macrophages sont les deux types cellulaires principaux participant à la phase initiale de l'inflammation, d'où leur nom de cellules inflammatoires. Ils sont recrutés en très grand nombre dans le tissu infecté et inflammé. Ces cellules sont pourvues de récepteurs de surface pour les constituants bactériens communs ainsi que pour le complément. Ils sont également les cellules qui ingèrent et détruisent les micro-organismes qui tentent d'envahir le corps humain. Lors d'une infection, l'activation des neutrophiles est suivie par celles des monocytes, qui se différencient en macrophages pour appuyer la réponse immunitaire innée[6].

1.5. Hypothèses

Il y a présentement un débat en médecine transfusionnelle concernant l'influence de l'âge des culots globulaires et les effets négatifs sur la transfusion. La différence continentale entre la morbidité et la mortalité des études Européennes et nord-américaines rapportée par van de Watering est surprenante et pourrait être liée à l'utilisation de solutions de conservation et de délais d'entreposage différents [48]. Notre hypothèse était que les culots globulaires préparés avec la solution nutritive SAGM et des délais d'entreposage de 24 heures à 20-24°C (Europe) posséderaient des propriétés pro-inflammatoires moindres que des produits fabriqués à 4°C avec une solution AS-3 (Amérique du nord).

1.6. Objectifs du projet de maîtrise

Dans le cadre du projet de maîtrise, seuls les culots globulaires ont été étudiés, et provenaient de deux procédés de fabrication : procédé à froid (ou procédé AS-3) et procédé des couches leuco-plaquettaires (ou procédé SAGM).

Afin de vérifier notre hypothèse, les objectifs suivants étaient visés :

- Mettre au point un modèle de transfusion *in vitro* permettant de mimer une transfusion sanguine.
- Utiliser ce modèle pour comparer les propriétés inflammatoires des culots globulaires AS-3 et SAGM en utilisant le modèle *in vitro* à différents temps durant leur entreposage de 42 jours.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Produits sanguins

2.1.1. Participants

Pour obtenir les culots globulaires nécessaires au projet, quatre participants sains ont été sollicités par l'infirmière. Ces quatre volontaires ont accepté de contribuer au projet en donnant un prélèvement de sang de 450 mL qui ont été transformés en produits sanguins par la méthode T1. Afin de comparer les procédés de transformation, la même cohorte de donneurs a été sollicitée pour donner une seconde fois après 56 jours. Ce second prélèvement de sang total 450 mL a été transformé par la méthode des couches leuco-plaquettaires. Un participant n'a pu être recruté pour le second prélèvement. Un cinquième individu a donc été sollicité afin d'avoir quatre culots globulaires pour chaque procédé de transformation. Tous les participants ont signé un consentement éclairé approuvé par le comité d'éthique de recherche d'Héma-Québec et les produits sanguins utilisés ont été préalablement dénominalisés de manière irréversible et définitive.

2.1.2. Transformation du sang en culots globulaires

2.1.2.1. Le procédé T1

Le procédé T1 est un procédé semi-automatisé, qui consiste à séparer le sang par centrifugation puis en extraire le plasma avec un extracteur automatisé. Le sang (450 mL) a été récolté dans un dispositif de prélèvement double contenant 63 mL de CP2D (Pall medical corp.). Le sang total a été ensuite refroidi et conservé entre 2 et 6°C dans des boîtes de transport isolées pour une période maximale de 72 heures. Suite à cet entreposage, la quantité de leucocytes doit d'abord être réduite dans le sang total à l'aide d'un filtre intégré au dispositif de prélèvement qui retient la quasi-totalité des leucocytes. Après filtration, la poche contenant le sang leucoréduit a été centrifugée pour séparer les globules rouges du plasma avec une centrifugeuse Sorvall RC 3BP à 4°C, à une vitesse de 5135 x g, pendant 5 minutes (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada). La poche de sang a été placée doucement sur une presse d'extraction automatisée munie d'un détecteur de globules rouges (MacoPress modèle 6-15, Carmel, IN, États-Unis). Une fois le plasma extrait dans une poche satellite vide, 100 mL de solution nutritive AS-3 ont été ajoutés aux globules rouges qui ont été

entreposés à 1-6°C pour un période de conservation maximale de 42 jours. Le plasma a été conservé à <-20°C. Tous les culots globulaires obtenus par le procédé de transformation T1 ont subi le même traitement, et ont été testés sur les cellules mononuclées du sang de trois participants dans notre modèle *in vitro* (voir section 2.2.1).

2.1.2.2. Procédé des couches leuco-plaquettaires

Le procédé des couches leuco-plaquettaires, quant à lui, fait appel à l'appareil automatisé Atreus (TerumoBCT, Lakewood, CO, États-Unis) afin de compléter la transformation du sang total en produits sanguins. Un volume de sang de 450 mL a été récolté dans un dispositif propre au système Atreus contenant l'anticoagulant CPD. Les poches de sang ont été refroidies rapidement à une température ambiante (20-24°C) avec des sachets de Phase 22 (Cryopak, Edison, NJ, États-Unis). Le sang total a été conservé jusqu'à 24 heures avant sa transformation en produits sanguins. L'appareil Atreus transforme le sang total pour produire trois produits sanguins : un plasma, une couche leuco-plaquettaire, ainsi que le culot globulaire contenant 100 mL de solution nutritive SAGM. Le culot globulaire est conservé pour une période maximale de 42 jours à 1-6°C.

2.1.3. Échantillonnage des culots globulaires

À différents jours d'entreposage soit les jours 1, 7, 14, 28 et, 42, deux tubes de 7 mL Monoject avec K3EDTA contenant 0,07 mL de solution à 15% (Tyco Healthcare, Mansfield, MA, États-Unis) ont été utilisés pour prélever un échantillon de chaque culot nécessaire aux analyses et expériences. La poche a d'abord été mélangée 12 fois par inversion à sa sortie du réfrigérateur. Un port sans aiguille (Origen Medical, Austin, TX, États-Unis) a été incorporé à une cheminée de perfusion de la poche. À l'aide d'un barillet (BD Vacutainer, Franklin lakes, NJ, États-Unis) muni d'un raccord de type luer (Venoject, Terumo corporation, Tokyo, Japan), deux tubes avec K3EDTA (14 mL des produits sanguins) ont été récoltés à chaque jour de prélèvement. De cela, une partie a été utilisée pour effectuer une formule sanguine complète, une partie a été conservée pour le dosage de l'hémoglobine libre et la mesure du pH. Le volume résiduel a été centrifugé pendant 25 minutes, à 335 x g, sans frein (Allegra X-12 Centrifuge, Beckman Coulter, Mississauga, ONT, Canada) pour obtenir le surnageant du culot globulaire. Ce surnageant a été ensuite utilisé dans le modèle *in vitro*.

2.1.4. Paramètres biochimiques

Les formules sanguines ont été réalisées par le laboratoire de contrôle de qualité à l'aide d'un analyseur hématologique ACT5dif-AL (Beckman Coulter, CA, États-Unis). Cette formule sanguine permet d'obtenir l'hématocrite (L/L), la concentration d'hémoglobine totale (HGB, g/L) et le compte de globules rouges (GR, $10^{12}/L$). Le pH a été mesuré à 37°C à l'aide d'un pH mètre (Beckman Coulter, modèle Φ 360) muni d'une électrode à petit volume. Les tampons de références ont été utilisés pour l'étalonnage de pH-mètre avant chaque utilisation. Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à l'aide de l'hémoglobine libre, mesurée avec l'hémoglobinomètre (Hemocue Plasma/Low Hb system, Hemocue, Suisse) et l'hémoglobine totale obtenue avec la formule sanguine complète. Le taux d'hémolyse a été calculé à l'aide la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{\text{Concentration hémoglobine libre}}{\text{Concentration d'hémoglobine totale}} \times (100 - \text{hématocrite en pourcentage})$$

À la date de péremption du produit sanguin, soit 42 jours suivant le prélèvement, la stérilité du volume résiduelle de la poche été analysé en anaérobie et en aérobie sur une période de 7 jours avec le système BacT/ALERT 3D (bioMérieux, de l'étoile, France).

2.2. Modèle de transfusion *in vitro*

2.2.1. Produits sanguins

Les produits sanguins utilisés dans le cadre de ce projet de maîtrise proviennent des donneurs sains ayant signés un consentement éclairé. Pour les fins du projet, huit culots globulaires ont été utilisée, soient quatre culots globulaires AS-3 (Procédé T1) et quatre culots globulaires SAGM (Procédé des couches leuco-plaquettaires).

2.2.1.1. Témoins

Plusieurs témoins ont été intégrés dans notre modèle de transfusion *in vitro* afin d'éliminer le plus de biais expérimentaux possibles. Trois contrôles : non-stimulé, stimulé, et le témoin positif pour les essais de mesure de la phosphorylation. D'abord, la première condition contrôle, les cellules non-stimulées, avec seulement de la solution nutritive, permet, lors des analyses, de s'assurer que la solution nutritive elle-même n'affecte pas l'état

des cellules. La seconde condition contrôle, les cellules stimulées, avec seulement de la solution nutritive, permet d'observer l'effet de la stimulation seule sur l'état des cellules, et ainsi la comparer avec la condition des cellules stimulées en présence de surnageant de culot globulaire. La troisième condition contrôle sert de témoin positif lors de l'étude de la phosphorylation des protéines intracellulaires. Le contrôle positif est constitué de cellules aux repos, auxquelles ont été ajoutés, 30 minutes avant la fixation des cellules, du PMA (définir cet acronyme) à une concentration de 31ng/mL (Sigma-Aldrich) et de l'interféron- α à une concentration de $2,82 \times 10^4$ U/mL (PBL Interferon source, NJ, États-Unis). Ce contrôle positif permet de confirmer que toutes les étapes du FCB et de la coloration avec les anticorps ont fonctionnées.

2.2.1.2. Stimulation et stimulants

Afin de vérifier la théorie de la seconde insulte, proposée par Bilgin et Brand, une portion des cellules a été préalablement stimulée à l'aide de différents stimulants inflammatoires [21]. Dans le cadre du projet, trois stimulants ont été utilisés de concert afin de cibler les trois sous-populations prédominantes des cellules mononuclées : les monocytes et les macrophages et les lymphocytes T et B.

Le lipopolysaccharide (LPS) a été utilisé pour stimuler les monocytes. Le LPS est la composante principale de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les monocytes sont spécifiquement sensibles au LPS et répondent en exprimant et sécrétant différentes cytokines inflammatoires. Le LPS se lie au LPS-binding protein (LBP) présent dans le plasma pour ensuite être livré au récepteur de surface CD14. Ensuite, les monocytes activent différentes voies de signalisation qui mènent à l'expression et la sécrétion de cytokines inflammatoires [37].

Des billes activatrices portant des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ont été ajoutées au milieu de culture afin de stimuler les lymphocytes T. Les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 stimulent les lymphocytes T par la liaison multiples de ces anticorps [38].

Le troisième stimulant qui a été utilisé pour activer les lymphocytes B est le Phorbol Myristate Acetate (PMA). Le PMA est un composant biologiquement actif dérivé de l'huile

des graines du croton qui est un activateur important de la protéine kinase C. C'est d'ailleurs de cette façon que le PMA active les lymphocytes B[39].

2.2.2. Activation *in vitro* des cellules mononuclées du sang (PBMC)

2.2.2.1. Source de PBMC

Des donneurs de sang réguliers ont été recrutés par l'infirmière lors de l'entrevue précédant un prélèvement de plaquettes par apherèse avec des appareils Trima Accel (TerumoBCT). Les trois volontaires qui ont acceptés de participer à ce projet ont signé un consentement éclairé approuvé par le comité d'éthique de recherche d'Héma-Québec. Après les procédures d'aphérèse, les chambres de leucoréduction ont été récupérées par l'infirmière. Les chambres de leucoréduction contiennent essentiellement des leucocytes[40].

Population	Compte cellulaire (10 ⁹ /L)	Proportion des leucocytes (%)
Cellules totales	17,1 ± 9,2	N/A
Neutrophiles	0,68 ± 0,33	4,99 ± 2,59
Lymphocytes	11,7 ± 6,7	67,78 ± 8,63
Monocytes	4,2 ± 2,8	24,62 ± 8,94
Eosinophiles	0,05 ± 0,07	0,39 ± 0,49
Basophiles	0,38 ± 0,25	2,22 ± 0,72

Tableau 2.1 Analyse hématologique du contenu des chambres de leuco-réduction des appareils d'aphérèse. Tableau tiré de [34].

Ces chambres représentaient donc la source idéale de leucocytes nécessaires à l'étude. La tubulure des chambres a été scellée avant de la retirer du dispositif de prélèvement. Les chambres ont été conservées à la température ambiante jusqu'à l'isolement des cellules mononuclées du sang pour un maximum de 3 heures au laboratoire.

2.2.2.2. Cellules mononucléées du sang

La récupération des cellules a été faite séparément, un donneur à la fois, de façon aseptique dans une hotte à flux laminaire. La surface extérieure des chambres ainsi que les tubulures ont été désinfectées avec de l'éthanol 70%. La tubulure inférieure de la chambre a été coupée, puis celle du dessus, pour permettre au contenu de la chambre de se vider dans un tube conique stérile de 50 mL. Chaque chambre a ensuite été lavée avec 45 mL de PBS (10 mmol/L potassium, 136 mmol/L NaCl, pH 7,4) supplémenté avec 10% ACD (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL, États-Unis). Le compte des cellules a été effectué à l'aide d'un hémocytomètre après la lyse des globules rouges avec de l'acide acétique 3% (p/v).

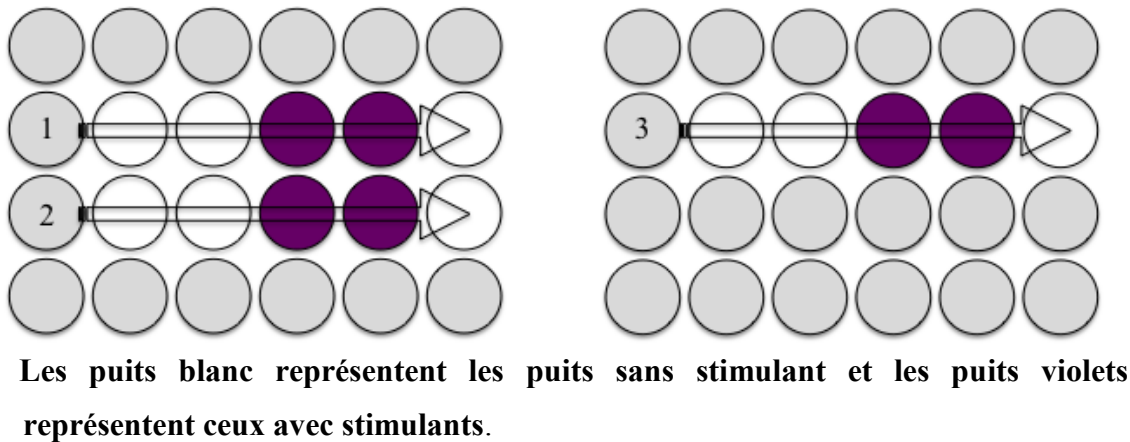
2.2.2.3. Préparation des banques de cellules

Les éluats cellulaires des chambres de leucoréduction, dont le volume variait entre 50 et 55 mL, ont ensuite été utilisés sans délai pour isoler les cellules mononucléées. L'isolement s'est fait par centrifugation dans des tubes d'isolation de cellules mononucléées SepMate (Stemcell technologies, Vancouver, BC) avec la solution de séparation Ficoll (Stemcell technologies) utilisés selon les recommandations du manufacturier. Suite à la centrifugation, les cellules formaient une couche à l'interface du Ficoll, permettant la récupération de la grande majorité des cellules mononucléées. Ensuite, les cellules ont été transférées dans des tubes stériles de 50 mL, lavées dans le PBS-glucose (*Phosphate buffered Saline* avec 10% de glucose) puis centrifugées à 500 xg pendant 10 minutes à deux reprises (Beckman Coulter GS-6). Les cellules des trois participants sont suspendues séparément à une concentration de 15×10^6 cellules/mL dans le milieu de congélation contenant 50 % de milieu *Iscove's modified Dulbecco medium* (Gibco/Life technologies, Burlington, ON, Canada), 40 % de sérum bovin fœtal (SBF) (Fisher Scientific) et 10% DMSO (dimethylsulfoxyde). La suspension de cellules a ensuite été aliquotée dans des cryovials (1mL par vial) et placée dans des contenants de congélation Nalgene (Nalgene Nunc, International, Rochester, NY) à -80°C pour une période de 24 heures, avant d'être transférée dans l'azote liquide jusqu'à son utilisation.

Pour les essais avec le modèle *in vitro*, les cellules ont été rapidement décongelées dans un bain-marie à 37°C, diluées dans du PBS-glucose, puis lavées une fois avant d'être mises en culture. Une fois lavées, les cellules fraîchement décongelées de chacun des trois

participants ont été suspendues dans un volume minimal de milieu nutritif. Les cellules vivantes ont été comptées à l'aide d'un hémocytomètre par la méthode d'exclusion du bleu de trypan (Invitrogen/Life technologies, Burlington, ON, Canada). Les cellules ont ensuite été ajustées dans le milieu nutritif à une concentration de $1,9 \times 10^6$ cellules/mL puis distribuées dans les puits de plateaux stériles de culture cellulaire de 24 puits (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) selon la figure 2.1.

Figure 2.1 : Mise en plateau et stimulation des cellules des trois receveurs.



Pour chacun de ces plateaux, la rangée inférieure ainsi que la supérieure n'ont pas été utilisées afin d'éviter l'influence possible de l'évaporation plus importante dans les puits extérieurs. Ces puits ont été remplis avec du PBS. La mise en plaque a été faite en duplicata, car toutes les analyses faites sur les cellules sont reproduites à deux temps différents : 0,5 et 24h pour simuler un effet immédiat et retardé d'une transfusion.

2.2.2.4. Stimulation polyclonale des cellules mononucléées du sang

Suite à la décongélation et à la mise en plaque, une portion des cellules (puits en mauve dans le schéma 1) a été stimulée avec le LPS et le PMA à des concentrations de $6 \mu\text{g/mL}$ et 31 ng/mL respectivement. Les billes activatrices CD3/CD28 ont été ajoutées à un ratio de 1 bille pour 16 cellules. Les plateaux ont ensuite été placés dans un incubateur (Sanyo Scientific, Japon) à 37°C avec $10\% \text{ CO}_2$, pour une période de 3 à 4 heures. Une fois la première incubation terminée, le surnageant de culot globulaire, décrit dans la section 2.1.2

a été ajouté au milieu nutritif contenant les cellules dans un ratio 1 :5 (surnageant de culot globulaire : milieu de culture). Ce ratio correspondait à celui d'un patient transfusé avec l'équivalent de deux culots globulaires. Comme contrôle, la solution nutritive utilisée pour la conservation des globules rouges a été ajoutée à un ratio 1 :5 également (voir schéma 2.2).

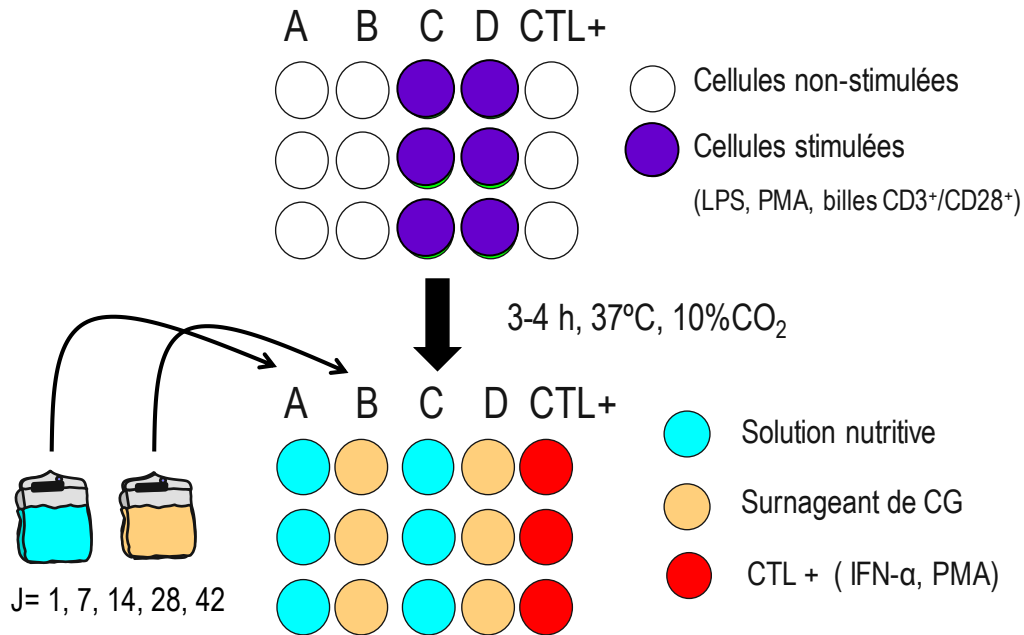


Figure 2.2 Modèle de transfusion *in vitro*. **Condition A:** cellules contrôles non-stimulées; **condition B:** cellules non-stimulées + S/N de culot globulaire; **Condition C:** Cellules contrôles stimulées; **Condition D:** cellules stimulées + S/N de culot globulaire.

Suite à l'ajout du surnageant de culot globulaire ou de la solution nutritive, les plateaux ont été incubés une seconde incubation de 0,5 heure ou 24 heures, avant de faire les analyses aux deux temps d'incubation différents avec le surnageant des culots globulaires.

2.2.2.5. Sélection du milieu nutritif

Pour toutes les cultures de cellules mononucléées du sang, le milieu de base utilisé est un milieu exempt de protéines bovines, composé d'IMDM supplémenté de 10 µg/mL d'insuline humaine, de 5.5 µg/mL de transferrine humaine, de 6.7 ng/mL sélénite de sodium (Invitrogen/ Life Technologies, Burlington, ON, Canada), de 0,125% d'une solution de lipides mixtes définie chimiquement (Sigma-Aldrich) et de 15 ng/mL de long-R3-insulin-

like-growth-factor (IGF) (Sigma-Aldrich) basé sur une formulation utilisée pour la cultures des lymphocytes B[41].

2.3. Analyses cellulaires

2.3.1. Cytométrie en flux

2.3.1.1. Marqueurs extracellulaires

2.3.1.1.1. Anticorps

Tous les anticorps utilisés lors des analyses extracellulaires en cytométrie en flux sont des anticorps monoclonaux de souris. Les anticorps anti-CD3 couplés au peridinin chlorophyll protein (PerCp; IgG₁,κ), anti-CD14 couplés à l'allophycocyanine, (APC; IgG_{2b}, κ), l'anti-CD16 couplés à fluorescéine isothiocyanate (FITC; IgG₁,κ), l'anti-CD19- couplés à la phycoérythrine (PE; IgG₁, κ), l'anti-CD69 couplés à fluorescéine isothiocyanate (FITC; IgG₁, κ), ainsi que les isotypes contrôles proviennent de BD Pharmingen, New Jersey, États-Unis. L'anti-HLA-DR couplés à l'allophycocyanine (APC-eFluor 780; IgG_{2b}, κ), et l'anti-CD25 couplés à la phycoérythrine (PE Cy7; IgG₁, κ) proviennent de eBioscience (San Diego, CA) et l'anti-CD45 couplés au Krome Orange (IgG₁) provient de Beckman Coulter.

2.3.1.1.2. Viabilité

Toutes les analyses des marqueurs extracellulaires sont faites sur les cellules viables uniquement. Le colorant de viabilité Pacific Blue™ DMPE (Life technologies) est donc utilisé afin de différencier les cellules viables des cellules mortes, car le colorant ne pénètre que les cellules mortes.

2.3.1.1.3. Préparation des cellules pour les colorations

Les cellules sont récoltées suite à l'incubation de 30 minutes ou de 24 heures après l'ajout de surnageant des culots globulaires. Les manipulations étaient les mêmes pour les deux temps d'incubation. D'abord, la portion conservée pour l'analyse des marqueurs extracellulaires sur les cellules viables, qui correspond au départ à approximativement 750 000 cellules, a été centrifugée 3 minutes à 5 900 x g (Microfuge 18 centrifuge, Beckman Coulter). Lors des expériences réalisées après 24 heures, le surnageant de chaque condition a été conservé pour le dosage ultérieur des cytokines sécrétées par les cellules. Le culot de

cellules a été reconstitué dans du PBS afin de procéder au marquage de viabilité avec le colorant Pacific Blue. Le Pacific Blue a été ajouté à une concentration de 0,1 µg/mL pour chaque échantillon et le tout a été incubé à la noirceur pour une période de 30 minutes. Après l'incubation, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS avant le marquage extracellulaire. Suite au lavage, les cellules ont été reconstituées dans du PBS contenant du Sérum Bovin Fœtal à 1% (p/v) et du NaN₃ à 0,01% (p/v) (PBS-SBF-NaN₃) puis séparées en deux parties pour permettre les deux séries de marquages extracellulaires (voir tableau 2.1). Puisque le cytomètre en flux CyFlow Partec utilisé pour analyser les échantillons utilisait trois lasers, permettant ainsi l'utilisation de huit fluorochromes (incluant le marqueur de viabilité Pacific Blue) qui émettent à des longueurs différentes, deux séries de coloration ont été effectuées afin d'étudier plus de sept marqueurs extracellulaires en simultanément.

Tableau 2.1. Anticorps ajoutés pour les deux séries de marquages extracellulaires.

Série	Anticorps	Fluorochrome	Cellules cibles
1	Anti-CD3	PerCp Cy 5.5	Lymphocyte T
	Anti-CD19	PE	Lymphocytes B
	Anti-CD25	PE Cy 7	Lymphocytes B et T activés
	Anti-CD69 FITC	FITC	Lymphocytes B et T activés
	Anti-HLA-DR	APC efluor 780	Lymphocytes B et monocytes/macrophages
	Anti-CD45	Krome orange	Cellules mononucléées du sang
	Pacific Blue	s/o	Cellules mortes
2	Anti-CD14	APC	Monocytes/Macrophages
	Anti-CD16	FITC	
	Anti-CD45	Krome Orange	Cellules mononucléées du sang
	Anti-HLA-DR	APC efluor 780	Lymphocyte B et monocytes/macrophages
	Pacific Blue	s/o	Cellules mortes

Lors du marquage, les anticorps ont été utilisés selon les recommandations des manufacturiers et les cellules ont été incubées à la noirceur avec les anticorps pendant 20 minutes. Après ce délai, la paraformaldéhyde a été ajoutée à 2% (p/v) final pour fixer les cellules puis la suspension a été incubée pour 10 minutes supplémentaires à la noirceur. Ensuite, les cellules ont été lavées une dernière fois avec du PBS-SBF- NaN_3 puis reconstituées dans du PBS-SBF- NaN_3 afin d'être conservées à 4°C à la noirceur jusqu'à leur analyse par cytométrie en flux. Les cellules pouvaient être conservées jusqu'à sept jours à 4°C avant l'analyse. [42] Une fois les échantillons comptabilisés au cytomètre, les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FCSexpress4 (De Novo Software, Los Angeles, CA, États-Unis).

2.3.1.1.4. Paramètres des analyses

Le cytomètre en flux a été ajusté avant chaque utilisation, en utilisant des billes de compensations (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) selon les instructions du manufacturier. Ces billes sont marquées avec des isotypes contrôles couplés aux fluorochromes correspondants aux anticorps utilisés lors de l'analyse des marqueurs extracellulaires. Cela a permis de déterminer les gains qui ont permis l'analyse des échantillons. Une fois les gains déterminés, les échantillons ont pu être comptabilisés au cytomètre pour ensuite être analysés à l'aide du logiciel FCSexpress4.

Toutes les analyses ont été effectuées sur une population variant entre 10 000 et 15 000 événements. Pour cela, avant l'acquisition des échantillons, une première région a été établie en fonction de la taille et de la granularité en utilisant le contrôle qui ne comprenait aucun anticorps. Puis, le cytomètre a été ajusté afin qu'il comptabilise 10 000 ou 15 000 événements dans cette région. Cette première région a permis d'éliminer la majorité des débris cellulaires et des agrégats de cellules. Ensuite, le logiciel FCSexpress4 a été utilisé pour établir une seconde sélection pour sélectionner les cellules positives pour le CD45 Krome Orange (cellules mononucléées) et négatives pour le Pacific Blue (cellules viables). Pour l'analyse des marqueurs extracellulaires mentionnés dans la section 2.3.1.1.1, il a d'abord fallu déterminer l'emplacement des quadrants, qui ont servi à dessiner la ligne entre les cellules positives et les cellules négatives. Ces quadrants ont été placés à des intensités de

fluorescence différentes pour chaque combinaison de marqueurs et ils ont été établis avec des contrôles de fluorescence moins un (FMO).

2.3.1.1.5. Fluorescence Minus One (FMO)

Afin d'établir les intensités de fluorescence des quadrants lors des analyses avec le logiciel FCSexpress4, des contrôles ont été effectués afin de fixer les quadrants de manière à rendre plus facile la comparaison entre les différentes analyses faites aux différents jours. D'abord, un contrôle a été fait pour chacun des fluorochromes utilisés pour chaque série de marquage. Chaque contrôle consistait à utiliser tous les anticorps utilisés dans la série A ou B, sauf celui à l'étude pour définir les compensations (voir tableau 2.2). Par exemple, pour le contrôle de l'anti-CD3 PerCp Cy 5.5, il fallait ajouter tous les anticorps du marquage, sauf l'anti-CD3 PerCp Cy 5.5 (voir tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Contrôles permettant d'orienter les quadrants lors de la compensation selon les différents anticorps utilisés pour chacun des marquages A et B.

A : Fluorescence Minus One (FMO) pour le premier marquage (A).

FMO Ac. Ajoutés	FL1 FITC	FL2 PE	FL3 PerCp	FL4 PE Cy7	FL5 APC	FL6 APC- efluor	FL7 Pacific Blue	FL8 Krome Orange
CD69	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CD19	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CD3	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓
CD25	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓
CD14	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓
HLA-DR	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓
Pacific Blue	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓
CD45	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x

B. Fluorescence Minus One (FMO) pour le second marquage (B).

FMO	FL1	FL2	FL6	FL7	FL8
Ac ajoutés	FITC	PE	APC-eFluor	Pacific Blue	Krome Orange
CD69 FITC	x	✓	✓	✓	✓
CD19 PE	✓	x	✓	✓	✓
HLA-DR APC-eFluor	✓	✓	x	✓	✓
Pacific Blue	✓	✓	✓	x	✓
CD45 Krome orange	✓	✓	✓	✓	x

Les crochets signifient que l'anticorps a été ajouté au cocktail d'anticorps qui ont servi à déterminer l'emplacement des quadrants pour chacune des combinaisons impliquant l'anticorps mentionné dans la première colonne. L'anticorps pour lequel les compensations doivent être déterminées est représenté par un X.

Ces contrôles ont permis d'éliminer tout faux positif qui pourrait être causé par les autres fluorochromes qui émettent, de façon non spécifique, de la fluorescence dans le canal du fluorochrome voisin. Cette émission non spécifique est due à l'intensité du signal de certains fluorochromes qui dépassent la fenêtre de longueur d'onde de reconnaissance du laser correspondant.

2.3.1.2. Cibles intracellulaires – cascade de signalisation

2.3.1.2.1. Anticorps

Tous les anticorps utilisés pour les analyses intracellulaires étaient des anticorps monoclonaux de souris. Les anticorps anti-pERK1/2 couplés au colorant Alexa Fluor647 (pT202/pY204) (IgG₁), anti-pSTAT1 couplés au colorant Alexa Fluor647 (pY701) (IgG_{2a}), anti-pSTAT3 couplés au colorant Alexa Fluor647 (pY705) (IgG_{2a}, κ), et anti-pSTAT5

couplés au colorant Alex Fluor647 (pY694) (IgG₁, κ) proviennent de chez BD Phosflow (Mississauga, ON, Can). Lors des analyses intracellulaires, certains marqueurs de surface, tels CD3 et CD22 ont également été suivis afin de distinguer les lymphocytes T des lymphocytes B respectivement. Pour ce faire, les anticorps anti-CD3 couplés à fluorescéine isothiocyanate (FITC) (UCHT1) de eBioscience et les anticorps anti-CD22 couplés à la phycoérythrine (PE; IgG₁) de Beckman Coulter ont été ajoutés aux cellules en même temps que les anticorps ciblant les protéines intracellulaires phosphorylées. Pour la coloration des cellules, les colorants Pacific Blue DMPE (Life Technologies) et DyLight 800 (ThermoScientific) ont été utilisés à différentes concentrations.

2.3.1.2.2. Code-barres cellulaires en fluorescence (FCB)

Une technique récente mise au point par le Dr. PO Krutzik *et al*, appelée le « fluorescent cell barcoding » peut être utilisée lors de l'analyse intracellulaire, et apporte ainsi plusieurs avantages[43]. La technique consiste à attribuer une signature unique de concentration de coloration à chaque échantillon, pour ensuite pouvoir les recombinaison dans un seul tube avant d'y ajouter des anticorps intracellulaires ou extracellulaires. Cette technique permet non seulement de réduire la consommation d'anticorps, mais surtout elle permet d'éliminer la variabilité inter échantillon, en plus de diminuer le temps d'acquisition au cytomètre. Dans ce projet, trois concentrations différentes de DyLight 800 (Thermo Scientific, Rockford IL, ÉTATS-UNIS) ont été utilisées pour distinguer les cellules des trois participants de notre modèle *in vitro*. Aussi, cinq concentrations de Pacific Blue (Life Technologies, Burlington, ON) ont été utilisées, pour distinguer les quatre conditions et le contrôle positif de chaque participant.

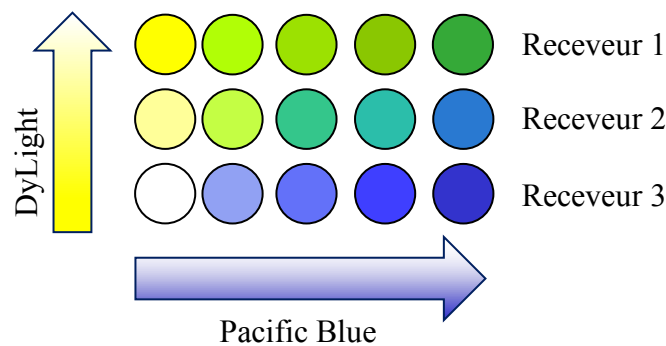


Figure 2.4. Patron de coloration des quinze échantillons avec les colorants Pacific Blue DMPE et DyLight 800.

Cette technique a été adaptée à notre modèle. Tout d’abord, la portion des cellules dédiée à l’étude de la phosphorylation des protéines intracellulaires a été récupérée en même temps que ceux pour l’analyse des marqueurs extracellulaires décrits plus haut (section 2.4.1.1), soient 30 minutes ou 24 heures après l’ajout des surnageants de culot globulaire. Approximativement 750 000 cellules par condition ont été récoltées et centrifugées 3 minutes, à 5 900 x g (Microfuge 18 centrifuge, Beckman Coulter). Le surnageant a été conservé pour le dosage ultérieur des cytokines, et les cellules ont été suspendues dans du PBS. Une fois suspendues, les cellules ont été immédiatement fixées avec de la formaldéhyde à une concentration finale de 1,5%, pour une période minimum de 10 minutes. A moins d’indications contraires, toutes les incubations ont été réalisées à température pièce et à la noirceur. Suite à la fixation, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS, puis suspendues dans du méthanol 50% afin de perméabiliser les cellules. Ensuite, les colorants Pacific Blue et DyLight 800 ont été ajoutés aux échantillons selon les concentrations présentées au tableau 2.4 et incubé pour une période de 60 minutes.

Tableau 2.4. Combinaison de concentrations de colorants de chaque condition testée pour les trois receveurs à l’étude.

	A	B	C	D	CTL+
Receveur 1	PB 0,02 ng/mL DL 25 ng/mL	PB 1,6 ng/mL DL 25 ng/mL	PB 6,25 ng/mL DL 25 ng/mL	PB 25 ng/mL DL 25 ng/mL	PB 100 ng/mL DL 25 ng/mL
Receveur 2	PB 0,02 ng/mL DL 17 ng/mL	PB 1,6 ng/mL DL 17 ng/mL	PB 6,25 ng/mL DL 17 ng/mL	PB 25 ng/mL DL 17 ng/mL	PB 100 ng/mL DL 17 ng/mL
Receveur 3	PB 0,02ng/mL DL 0,8 ng/mL	PB 1,6 ng/mL DL 0,8 ng/mL	PB 6,25 ng/mL DL 0,8 ng/mL	PB 25 ng/mL DL 0,8 ng/mL	PB 100 ng/mL DL 0,8 ng/mL

Légende: A= Cellules CTL B= Cellules avec du surnageant C= Cellules activées CTL D= Cellules activées avec du surnageant PB= Colorant Pacific Blue DL= Colorant DyLight 800

Après 30 minutes d’incubation, chaque condition a été mélangée avec un vortex vigoureusement et replacer à la noirceur. Ensuite, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS avec 1% BSA (p/v) (PBS-BSA 1%) en centrifugeant 3 minutes à 300 x g pour enlever

tout colorant résiduel qui n'aurait pas pénétré les cellules. Les quinze échantillons des différentes conditions expérimentales ont été combinés ensemble dans du PBS-BSA 1% pour former un seul regroupement de cellules. Les cellules ont été distribuées dans cinq tubes numérotés requis pour les quatre séries de marquage et le contrôle sans marquage. Dans chaque tube, sauf pour le contrôle, l'anti-CD3 FITC ainsi que l'anti-CD22 PE mentionnés plus haut ont été ajoutés selon les recommandations du fabricant.

Par la suite, les anticorps spécifiques à phospho-ERK1/2, phospho-STAT1, phospho-STAT3, et phospho-STAT5 tous couplés avec l'Alexa fluor 647 ont été ajoutés dans les tubes 1 à 4 respectivement. Le cinquième demeurait sans anticorps pour être utilisé comme contrôle de cellules non-marquées lors de l'analyse au cytomètre. Tous les anticorps ont été utilisés selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont été incubées avec les anticorps pour une période de 20 minutes à la noirceur, puis lavées avec du PBS-BSA 1%. Finalement, les cellules ont été suspendues dans 1 mL de PBS-BSA 1% et conservées à 4°C à la noirceur jusqu'à leur analyse. Afin d'assurer la qualité de résultats, les échantillons ont été analysés dans les minutes suivant la suspension des cellules dans le PBS-BSA 1%. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FCSEXpress4.

2.3.1.2.3. Stratégie des analyses

Le même principe d'utilisation du cytomètre s'applique pour l'étude des cibles intracellulaires. Le cytomètre a été ajusté avant chaque utilisation, en utilisant des billes de compensations (BD Biosciences) marquées avec des isotypes contrôles couplés aux fluorochromes correspondants à ceux utilisés dans nos analyses. Cela a permis de déterminer les gains donnant la meilleure visibilité pour l'analyse des marqueurs. Ensuite, pour déterminer les gains pour les colorants Pacific Blue et DyLight 800, le tube contrôle sans anticorps qui contient les 15 échantillons colorés, a été utilisé. Il était important de s'assurer que les 15 échantillons soient bien visibles et distincts l'un de l'autre avant de comptabiliser les autres tubes. Une fois le cytomètre ajusté et les 15 populations distinctes, toujours en utilisant le tube contrôle, une première région a été établie en fonction de la taille et de la granularité des événements. Puis, le cytomètre a été ajusté afin d'analyser 150 000 ou 200 000 événements dans cette région. Cette première région permettait d'éliminer la plupart des débris cellulaires et des agrégats de cellules. Comme un total de 15 échantillons a été

combiné en un seul tube avant les quatre séries de marquages intra et extracellulaires, il était important de comptabiliser d'avantage d'évènements que pour les analyses extracellulaires, afin de s'assurer que chaque échantillon compte approximativement 10 000 évènements.

À l'aide du logiciel FCSEXpress4, trois régions ont été établies à partir de la taille en fonction du colorant DyLight 800 pour laquelle chaque région représentait les cellules d'un receveur. Chaque participant a été étudié individuellement. Ensuite, cinq sous-régions ont été déterminées à l'aide de l'intensité de fluorescence du colorant Pacific Blue, puisque chaque condition d'un receveur a une intensité de coloration différente. Ces sous-régions ont permis d'étudier le niveau de phosphorylation des différentes cibles intracellulaires, notamment ERK1/2. Plus l'intensité de fluorescence est élevée, plus la protéine intracellulaire à l'étude est phosphorylée (voir Figure 2.3). L'analyse est répétée pour chaque protéine intracellulaire ciblée.

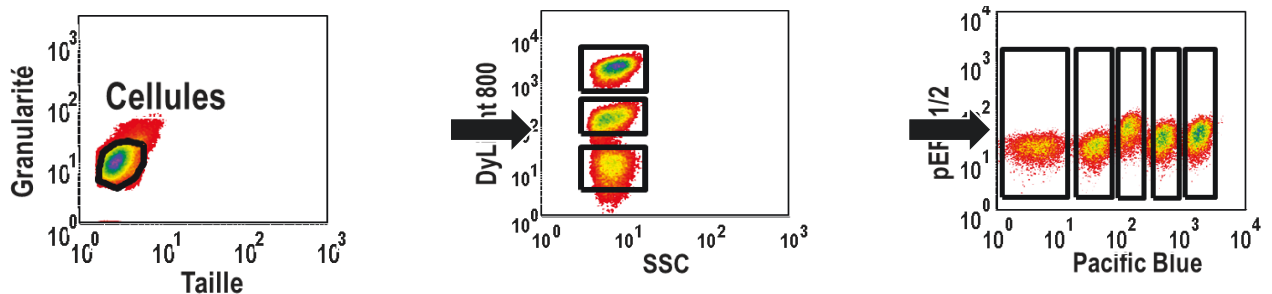


Figure 2.3. Stratégie utilisée pour la détermination des régions pour l'analyse de la phosphorylation des protéines intracellulaires.

Pour l'analyse des sous-populations à l'aide des marqueurs extracellulaires CD3 pour cibler les lymphocytes T) et CD22 ciblant les lymphocytes B), il a d'abord fallu déterminer l'emplacement des quadrants, comme pour les analyses extracellulaires. Cependant, comme il n'y avait que deux anticorps ciblant des marqueurs extracellulaires, deux marquages indépendants ont été faits, utilisant un anticorps anti-CD3 couplé au FITC ou un anticorps anti-CD22 couplé au PE.

2.3.2. Détection et dosages des cytokines

2.3.2.1. Criblage des cytokines modulées

Avant de doser les cytokines sécrétées par les cellules suite à l'ajout des surnageants de culot globulaire, les surnageants ont d'abord subi une étape de défrichage avec la trousse TranSignal™ Human Cytokine Antibody Array 3,0 (Panomics Inc., Redwood City, CA, ÉTATS-UNIS) (tableau 2.5). Cette biopuce a permis d'évaluer semi-qualitativement la sécrétion de 36 cytokines pro- et anti-inflammatoires et ainsi cibler les cytokines modulées par l'ajout de surnageant de culot globulaire, notamment l'interleukin-6, l'interleukin-1 β et la chimiokine RANTES. Ces cytokines ciblées ont ensuite été dosées quantitativement par la méthode d'ELISA sandwich.

La trousse TranSignal™ Human Cytokine Antibody Array 3,0 a été utilisée selon les recommandations du fabricant. Toutes les solutions utilisées étaient comprises dans la trousse. Brièvement, les membranes ont été incubées avec le tampon bloquant pour une période de 50 minutes avant d'être lavées et incubées à nouveau avec les échantillons pour une période maximale de 75 minutes. Les surnageants de culture ont été dilués 1:5 avec le milieu de culture. Après l'incubation de 75 minutes avec les échantillons, les membranes ont été incubées avec le mélange d'anti-cytokines biotinylées pendant deux heures, puis pendant une heure avec la streptavidine couplée à la HRP (Horseradish peroxidase). Les résultats ont été révélés par luminescence avec l'appareil Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada). Les résultats correspondants aux diverses cytokines ont été comparés aux contrôles positifs et négatifs.

Tableau 2.5 : Cytokines humaines ciblées par la trousse TranSignal™ Human Cytokine Antibody Array 3,0 (Panomics Inc.).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	Apol/Fas		Leptin		Rantes		ICAM-1		IL-2		IL-7		POS	
B	CTLA		MIP1 α		TGF- β		VCAM-1		IL-3		IL-8		POS	
C	Eotaxin		MIP1 β		IFN- γ		VEGF		IL-4		IL-10		NEG	
D	GM-CSF		MIP4		TNF- α		IL-1 α		IL-5		IL-12		NEG	
E	EGF		MIP-5		TNFR1		IL-1 β		IL-6		IL-15		POS	
F	IP-10		MMP3		TNFR2		IL-1ra		IL-6R		IL-17		POS	

Note : POS=contrôle positif; NEG= contrôle négatif

2.3.2.2. Dosage de l'interleukin-6 par ELISA

Pour le dosage de l'IL-6, les surnageants des cellules mononuclées correspondantes aux trois receveurs ont été combinés pour obtenir suffisamment de volume pour le dosage. Ce qui signifie que pour un même culot globulaire testé sur les trois receveurs, les trois surnageants correspondants à la même condition expérimentale (voir figure 2.2) ont été combinés.

Pour le dosage de la cytokine, une trousse de développement pour ELISA (Peprotech, Rocky Hill, NJ, ÉTATS-UNIS) contenant un anticorps de capture purifié anti-hIL-6, un anticorps de détection biotinylé anti-hIL-6, et un standard d'IL-6 recombinant a été utilisée. L'avidine couplée à la peroxydase était également fournie. Les manipulations ont été effectuées selon les recommandations du fabricant, mis à part quelques modifications. Afin de minimiser le bruit de fond et augmenter l'efficacité des incubations, les solutions pour l'adsorption, pour le blocage, pour les dilutions des échantillons et pour la préparation du substrat ont été remplacées. Pour l'adsorption, l'anticorps de capture a été dilué dans du tampon carbonate 0,1M pH 9,4. La solution bloquante utilisée était le PBS-Caséine-Tween

20 plutôt que le PBS-BSA1%. La solution bloquante a également été utilisée pour la dilution du standard, des échantillons et de l'anticorps de détection biotinylé. Le TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) a été utilisé comme substrat à une concentration de 1N, et le H₂SO₄ à 1N a été ajouté pour arrêter la réaction enzymatique après 30 minutes à la noirceur. Pour le témoin du bruit de fond, la solution bloquante, PBS-Caséine-Tween a été utilisée, et ce pour tous les dosages. Une dilution à 0,5 ng/mL d'IL-6 recombinante provenant de Peprtech a servi de contrôle interne. La courbe standard utilisée pour calculer la concentration dans les échantillons allait de 0 à 2 ng/mL, selon la recommandation du manufacturier.

Tous les dosages ont été faits avec des microplaques à fonds ronds de 96 puits (Dynex technologies Inc., Chantilly, VA, ÉTATS-UNIS). Les densités optiques ont été mesurées avec le lecteur de plaques ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale CA, ÉTATS-UNIS) à une longueur d'onde de 450 nm avec une longueur d'onde de référence à 630 nm, selon les recommandations du manufacturier.

2.3.2.3. Dosage de la chimiokine RANTES par ELISA

Pour ce dosage, une trousse de développement pour ELISA de Peprtech, semblable à celle pour le dosage de l'IL-6 a été utilisée. Dans la trousse étaient fournis l'anticorps de capture purifié anti-hRANTES, l'anticorps de détection anti-hRANTES biotinylé, le standard de hRANTES recombinant, ainsi que l'avidine couplée à la peroxydase. Les manipulations ont été effectuées selon les recommandations du manufacturier et les mêmes modifications y ont été apportées que pour le dosage de l'IL-6 concernant les solutions employées et les temps d'incubation. Une dilution à 0,5 ng/mL d'un plasma riche en plaquettes (PRP) a servi de contrôle interne et la solution bloquante a servi de témoin de bruit de fond. Afin d'obtenir un échantillon de plasma riche en plaquettes, quatre tubes de 7 mL de sang total ont été centrifugés à 2024 xg pour une période de 3m50s. Le surnageant a ensuite été récupéré puis conservé à -35°C. Le standard de hRANTES de la trousse a été utilisé pour préparer une courbe standard allant de 0 à 2 ng/mL.

2.3.2.4. Dosage de l'interleukin-1 β

La trousse Ready-SET-Go de la compagnie eBioscience a été utilisée. Les manipulations ont été effectuées selon les recommandations du manufacturier et aucune modification n'a ont été apportée. Comme pour les dosages de l'IL-6 et de RANTES, le standard d'IL-1 β fourni dans la trousse a été utilisé pour préparer une courbe étalon entre 0 et 2 ng/mL.

3. RÉSULTATS

3.1. Paramètres biochimiques des culots globulaires issus des deux procédés de transformation

Pour s'assurer de la qualité des produits sanguins utilisés dans le cadre de ce projet, différents paramètres biochimiques *in vitro* ont été mesurés tout au long de l'entreposage des culots globulaires. Les résultats présentés dans les tableaux suivants sont un exemple de ce qui est mesuré pour chaque prélèvement effectué lors des journées d'expérience. La composition des quatre culots pour chaque procédé de transformation est représentée dans le tableau 3.1 pour les culots globulaires issus du procédé T1 (AS-3) et ceux issus du procédé des couches leuco-plaquettaires (SAGM).

Paramètres	Critères d'acceptation	Culots globulaires	
		AS-3 (N=4)	SAGM (N=4)
Volume, mL	Sans objet	318 ± 6	251 ± 22
Hémoglobine, g/unité	>35	59 ± 5	57 ± 2,5
Hématocrite, L/L	≤0,80	0,55 ± 0,05	0,56 ± 0,03
Hémolyse au jour 42, %	<0,8	0,2 ± 0,14	0,3 ± 0,06

Tableau 3.1 Composition des culots globulaires issus du procédé AS-3 et SAGM.

Dans le tableau 3.1, on retrouve les mesures des paramètres de contrôle de qualité des culots globulaires AS-3 et SAGM. Le volume a été calculé une seule fois suite à la transformation en utilisant une densité spécifique de 1,06 g/L. Afin de conserver les propriétés des culots globulaires, un volume minimal est récolté lors de chaque prélèvement requis pour les expérimentations. Les autres paramètres ont été mesurés lors de chaque prélèvement effectué dans la poche à chaque journée d'expérience. La concentration de l'hémoglobine totale en g/L et la valeur de l'hématocrite, était de 185 ± 8 et $0,56 \pm 0,03$ pour

les culots globulaires SAGM et 191 ± 16 et $0,55 \pm 0,03$ pour les culots globulaires AS-3. Dans la figure 3.1, on retrouve la valeur, en pourcentage, de l'hémolyse pour chacun des procédés, lorsque les culots sont à terme d'entreposage. Cette valeur, selon les normes établies par Santé Canada, ne doivent jamais dépasser 0,8%. Les culots globulaires utilisés lors du projet sont représentatifs de ce que l'on retrouve dans l'inventaire des produits sanguins pour transfusion de la banque de sang d'Héma-Québec. Par ailleurs, le pourcentage d'hémolyse ainsi que le pH de chacun des culots ont été suivis tout au long de l'entreposage. Le graphique 3.1 démontre les résultats obtenus.

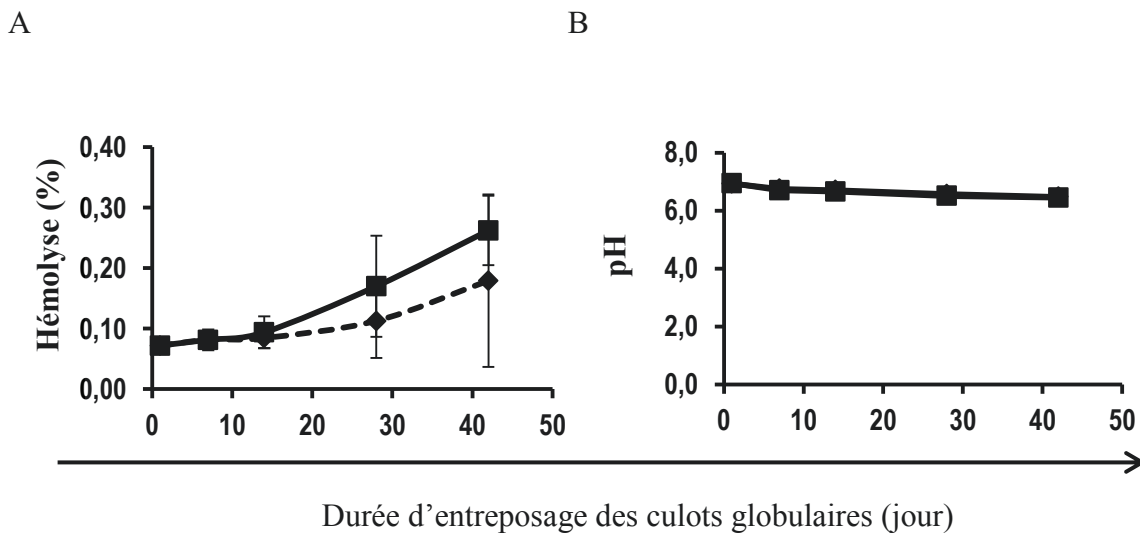


Figure 3.1 Paramètres biochimiques mesurés lors de l'entreposage des culots globulaires issus des deux procédés de transformation. Le graphique A présente la moyenne du pourcentage d'hémolyse pour chacun des procédés de transformation ainsi que l'écart-type à différents jours d'entreposage. Le graphique B présente la mesure moyenne du pH ainsi que l'écart-type. Légende : AS-3 ◆ SAGM ■

Afin de s'assurer que les culots globulaires rencontrent les normes de qualité tout au long de leur entreposage, certains paramètres biochimiques ont été mesurés tout au long de l'entreposage des culots globulaires. Comme mentionnés dans la section Matériel et méthodes, un échantillon de chaque culot globulaire été prélevé à chaque jour d'expérience pour effectuer une formule sanguine complète et pour mesurer le pH et le pourcentage

d'hémolyse. Le graphique de la figure 3.1A présente le pourcentage d'hémolyse, en pourcentage, en fonction du temps d'entreposage des culots globulaires. Pour les culots globulaires issus du procédé SAGM, il y a une légère augmentation du pourcentage de l'hémolyse dès le jour 28, une tendance qui s'accroît au jour 42 d'entreposage. Cette tendance n'est toutefois pas aussi importante pour les résultats obtenus avec les culots AS-3. Comme mentionnée plus tôt, le pourcentage d'hémolyse ne doit pas excéder 0,8% durant l'entreposage de 42 jours. Nous pouvons donc affirmer que tous les culots globulaires, indépendamment du procédé de transformation, répondent à la norme concernant le pourcentage d'hémolyse, car aucun culot globulaire n'a excédé 0,8% d'hémolyse.

3.2. Mise au point de la stratégie des analyses des phénotypes cellulaires

3.2.1. Méthodes de sélection des événements et analyse des données comptabilisées

Les figures 3.2 à 3.4 présentées sont des exemples de résultats bruts obtenus suite à l'analyse des échantillons en cytométrie en flux et leur interprétation à l'aide du logiciel FCS express 4. Ces figures présentent les résultats obtenus lors des essais pour le donneur #4 transformé par le procédé SAGM après 24 heures d'incubation avec le surnageant.

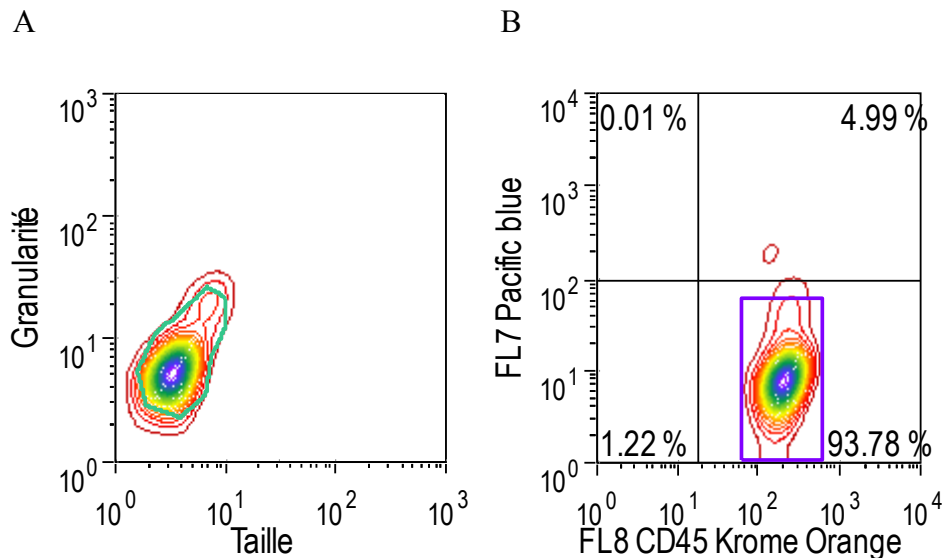
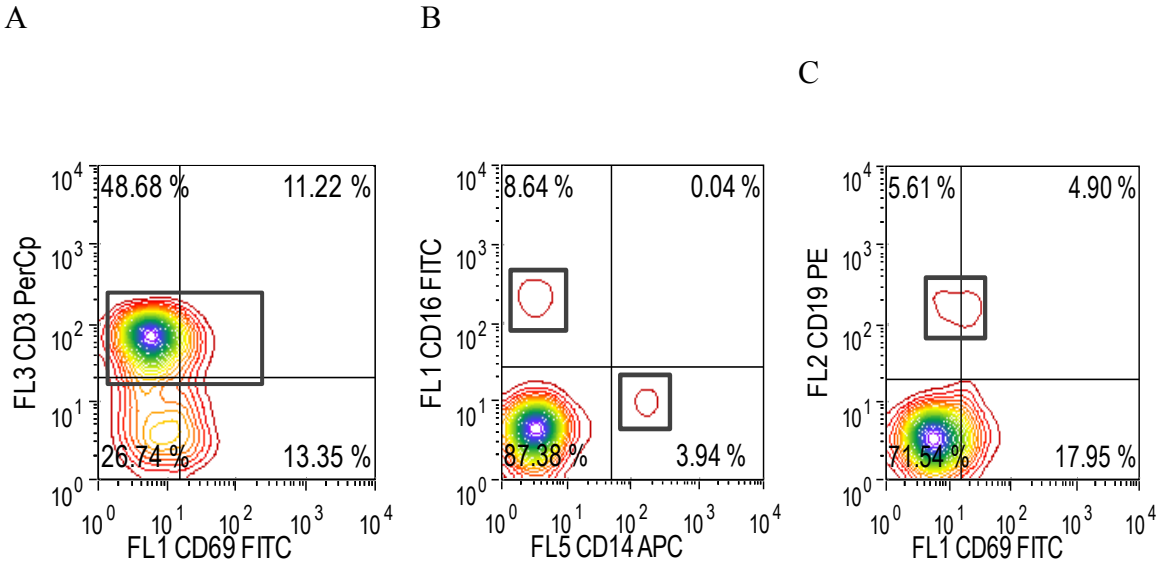


Figure 3.2 Détermination des régions pour la sélection des cellules mononuclées, à l'aide du logiciel FCS Express 4, pour l'analyse des phénotypes cellulaires sur la portion des cellules viables.

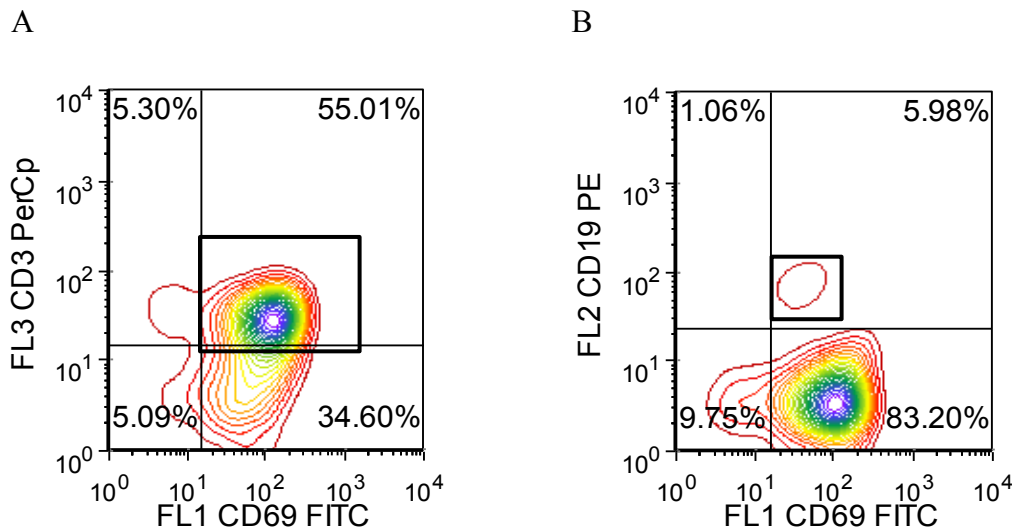
La figure 3.2 présente la stratégie d'analyse utilisée avec le logiciel FCS express. Ces graphiques sont présentés en mode contour. La première sélection, effectuée sur le graphique (A) permet d'éliminer les débris cellulaires et les agrégats de cellules. Ensuite, une seconde région est dessinée dans le graphique montrant le CD45 Krome Orange en fonction du marqueur de viabilité Pacific Blue (B). Les cellules positives pour CD45 mais négatives pour Pacific Blue représentent la population des cellules mononuclées viables.



Sous-population	Cellules positives (%)
Lymphocytes T (CD3 +)	60,00
Lymphocytes B (CD19 +)	10,51
Monocytes/Macrophages (CD14 +)	3,94
Monocytes/Macrophages (CD16 +)	8,64

Figure 3.3 Proportion des sous-populations présentes dans les cellules mononuclées (CD45⁺/ Pacific Blue⁻) au repos, dans un milieu sans protéine bovine, 4 heures après leur décongélation.

La figure 3.3 présente les différentes sous-populations retrouvées dans les cellules mononucléées du receveur #3. Le tableau démontre, en chiffre, le pourcentage des cellules exprimant différents marqueurs de surface tels que vus dans les graphiques A, B et C de la figure 3.3. Le graphique A présente le marqueur extracellulaire CD3 pour les lymphocytes T, en fonction du marqueur d'activation CD69. Lorsqu'au repos, très peu de lymphocytes T expriment le marqueur CD69, comparativement aux lymphocytes T stimulés à l'aide de billes activatrices CD3/CD28 pour une période de 3 heures (voir figure 3.4). Le graphique B présente le marqueur CD19 pour les lymphocytes B, en fonction du marqueur d'activation CD69. À l'état de repos, près de la moitié des lymphocytes B exprime le marqueur CD69, comparativement aux lymphocytes B stimulés avec du PMA, où 90% des lymphocytes B expriment CD69 (voir figure 3.4). Le graphique C présente les marqueurs extracellulaires CD14 et CD16 exprimés par les monocytes et les macrophages.



Sous-population	Cellules positives (%)
Lymphocytes T activés (CD3 ⁺ /CD69 ⁺)	91,2
Lymphocytes B activés (CD19 ⁺ /CD69 ⁺)	84,9

Figure 3.4 Proportion des cellules exprimant le marqueur d'activation CD69 suite à la stimulation au LPS, PMA et billes activatrices CD3/CD28+, pour une période de 3 heures.

Le marqueur extracellulaire CD69 est un marqueur d'activation précoce pour les lymphocytes B et T [44]. Il est donc un marqueur de choix pour suivre l'activation des lymphocytes, soit suite à l'ajout de stimulants, ou suite à l'ajout de surnageant de culot globulaire. La figure 3.4 montre la proportion de lymphocytes T activés (graphique A) et la proportion de lymphocyte B activés (graphique B) trois heures suivant l'ajout de trois stimulants : LPS, PMA et billes activatrices CD3+/CD28+. On peut donc constater qu'environ 90% des lymphocytes T et 85 % des lymphocytes B répondent positivement à la stimulation utilisée.

Tableau 3.1 Distribution des populations lors de la mise en culture au T=0 pour chacun des receveurs à l'étude dans le modèle de transfusion in vitro. A : Receveur #1 B : receveur #2 C : receveur #3

A.		
Populations	Marqueur de surface	Pourcentage (%)
Lymphocytes T	CD3	54
Lymphocytes B	CD19	16
Monocytes	CD14	21
Monocytes / Cellules NK	CD16	13
B.		
Populations	Marqueur de surface	Pourcentage (%)
Lymphocytes T	CD3	64
Lymphocytes B	CD19	4
Monocytes	CD14	21
Monocytes / Cellules NK	CD16	9
C.		
Populations	Marqueur de surface	Pourcentage (%)
Lymphocytes T	CD3	55
Lymphocytes B	CD19	6
Monocytes	CD14	23
Monocytes / Cellules NK	CD16	12

3.3. Modèle *in vitro*

3.3.1. Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononuclées

Les figures 3.5 à 3.10 montrent les résultats obtenus lors de l'analyse des phénotypes cellulaires. Les graphiques A représentent la moyenne des résultats provenant de quatre culots globulaires AS-3 testés sur les cellules mononuclées de trois individus. Pour les graphiques B, ils représentent la moyenne des résultats provenant de quatre culots globulaires SAGM qui ont été testés sur les cellules des trois mêmes individus utilisés pour les quatre culots AS-3.

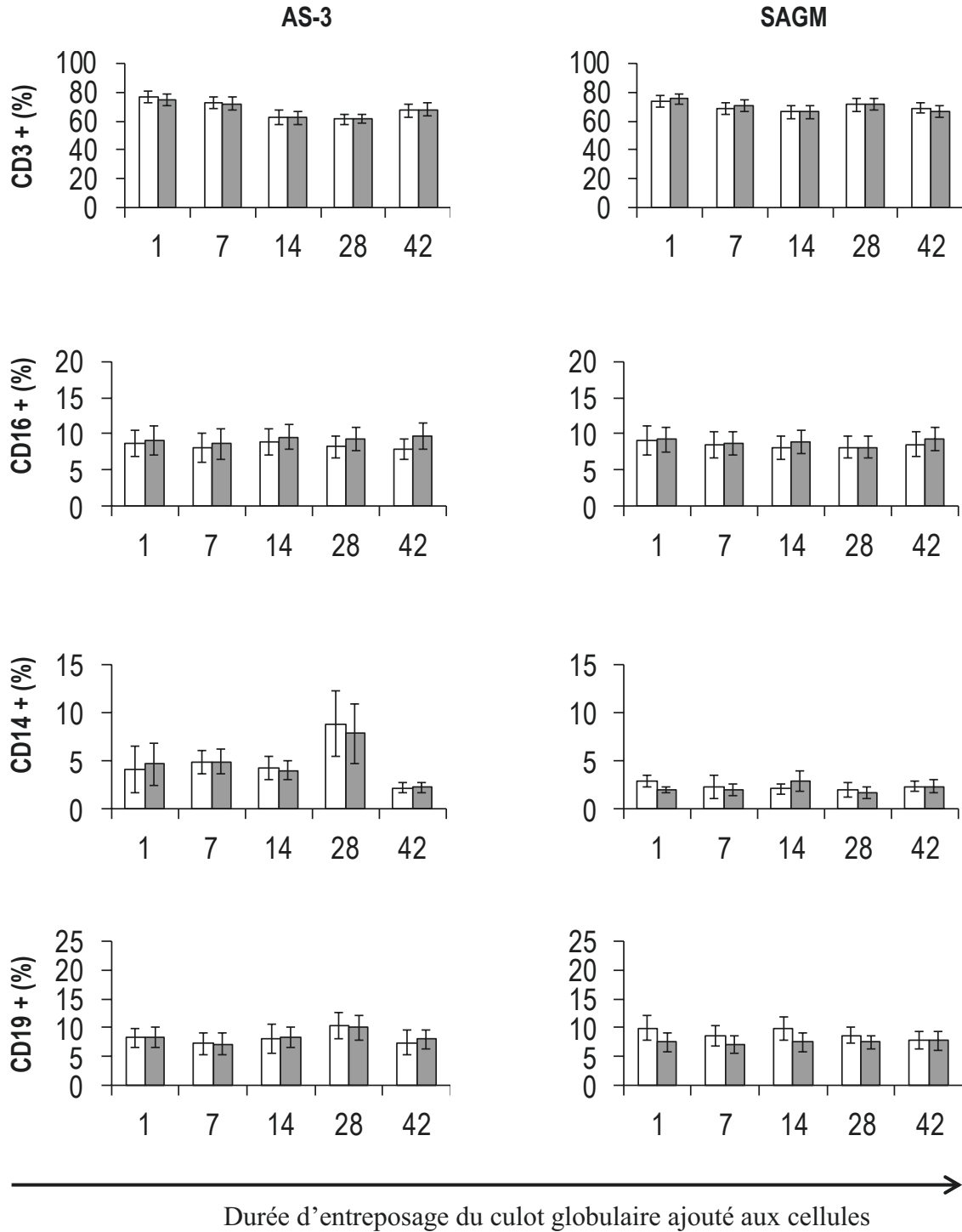


Figure 3.5 Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononucléées 30 minutes après l'ajout de surnageant de culot globulaire (moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un $p < 0,05$.

Légende : Témoin négatif Cellules + S/N

La figure 3.5 montre le pourcentage de cellules positives pour différents marqueurs que l'on retrouve à la surface des cellules mononuclées du sang, pour le témoin négatif et la condition des cellules au repos en présence de surnageant de culot globulaire. Ces résultats ont été obtenus 0,5 heure suite à l'ajout du surnageant de culot globulaire et constituent en fait au point de départ pour l'analyse des marqueurs extracellulaires. Aucune différence significative n'a été observée, que ce soit en fonction de l'entreposage, ou encore en comparant les deux procédés de transformation. Ce résultat était plutôt attendu, car 0,5 heure en présence de surnageant de culot globulaire n'est pas suffisant pour provoquer un changement au niveau de ces marqueurs extracellulaires, et encore moins pour déclencher la prolifération d'une sous-population en particulier.

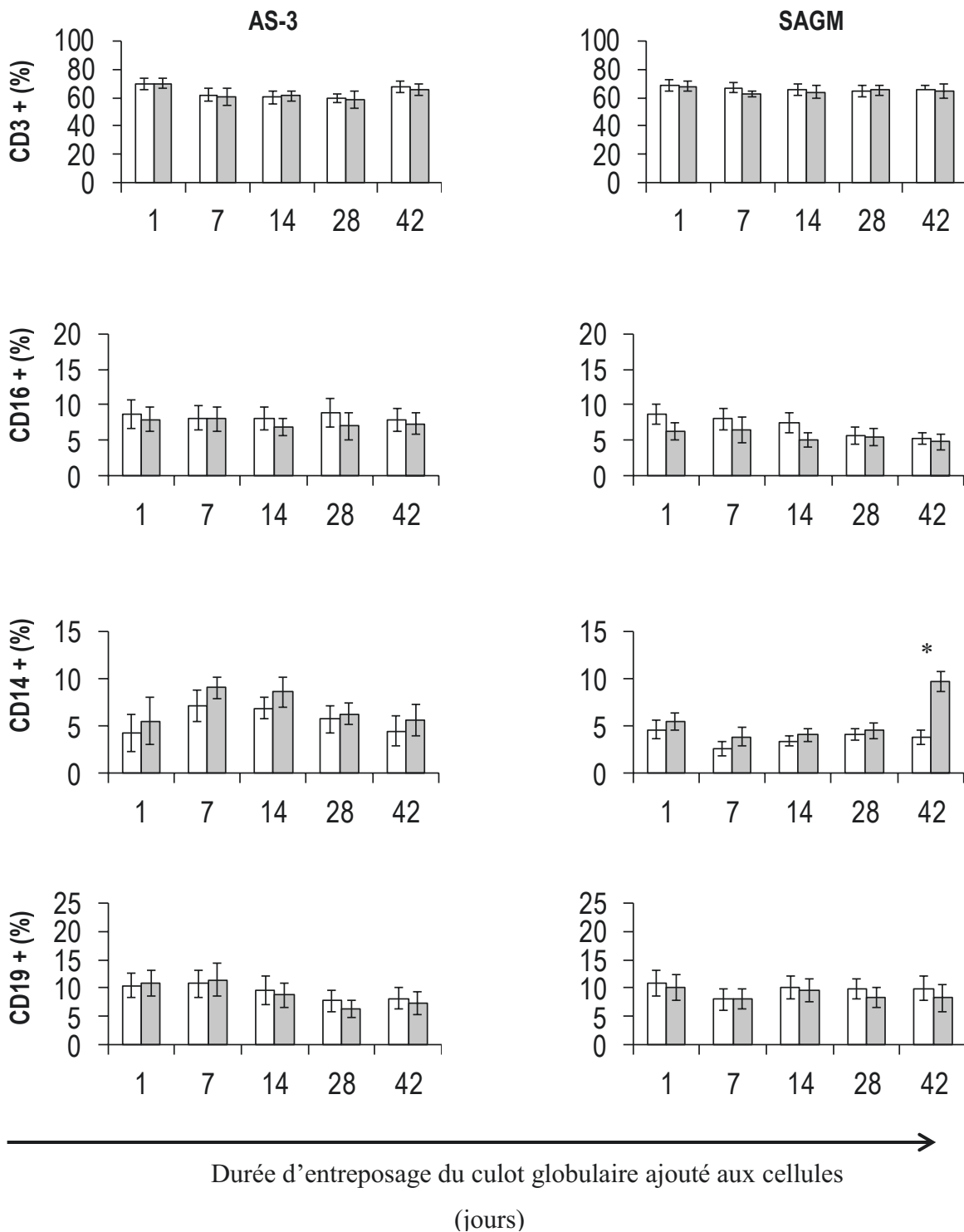


Figure 3.6 Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononuclées 24 heures après l'ajout de surnageant de culot globulaire (moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un $p < 0,05$.

Légende : Témoin négatif □ Cellules + S/N ■

La figure 3.6 montre le pourcentage de cellules positives pour les mêmes marqueurs obtenus 24 heures suite à l'ajout du surnageant des culots globulaires. Pour les quatre marqueurs extracellulaires présentés dans cette figure, aucune différence significative n'a été observée pour les marqueurs CD3, CD19 et CD16, que ce soit au cours de l'entreposage, ou encore en comparant les deux procédés de transformation. Il y a toutefois une différence notable, soit une augmentation de deux fois ($p < 0,05$) de la proportion des cellules qui expriment le marqueur extracellulaire CD14 comparativement au contrôle avec les culots globulaires SAGM de 42 jours. Cette différence n'est toutefois pas observée avec les surnageants de culots globulaires AS-3.

Comme ce marqueur est exprimé exclusivement par les macrophages, ceci suggère que la proportion de monocytes/macrophages double durant la période de 24 heures suivant l'ajout de surnageant de culots globulaires SAGM. Toutefois, comme les analyses sont faites sur les cellules viables seulement, on ne peut attribuer directement cette augmentation à une prolifération des monocytes/macrophages. En effet, il est possible que cette augmentation du pourcentage de cellules CD14+ soit liée à une meilleure survie de cette population dans les conditions expérimentales, ou encore que cette population devient dominante suite à un stimulus présent dans le surnageant de culots globulaires SAGM.

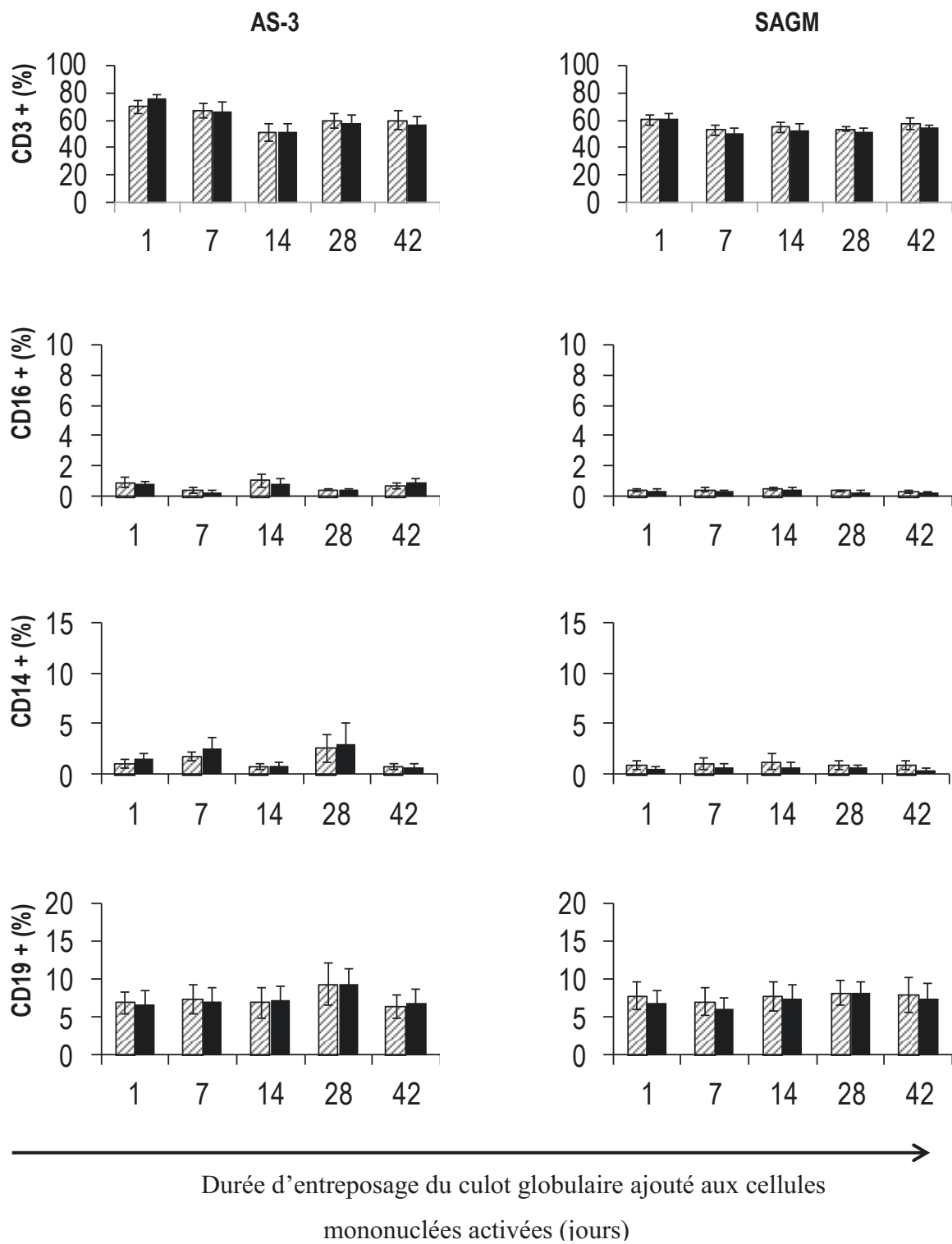


Figure 3.7 Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononuclées stimulées avec du LPS, PMA et des billes activatrices CD3/CD28, 30 minutes après l'ajout de surnageant de culot globulaire (moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un $p < 0,05$. Témoin activé Cellules activées + S/N

La figure 3.7 montre le pourcentage de cellules positives pour différents marqueurs que l'on retrouve à la surface des cellules mononuclées du sang, pour le témoin activé et la condition des cellules activées en présence de surnageant de culot globulaire. Tel que mentionné plus tôt, une transfusion représente parfois un second insulte inflammatoire pour le receveur ayant subi un premier traumatisme. La condition des cellules activées permet d'évaluer la théorie de la seconde insulte [20].

Selon la figure 3.7, aucun effet n'est observé 0,5 heure après l'ajout de surnageant de culot globulaire aux cellules activées, indépendamment de la méthode de transformation et de la durée d'entreposage.

Toutefois, en comparant le témoin activé avec le témoin négatif présenté à la figure 3.6, une différence dans les proportions pour les marqueurs extracellulaires confirme la stimulation des cellules mononuclées. Cela signifie que la stimulation affecte le phénotype des cellules mononuclées. Certains changements étaient attendus, telle la forte expression du marqueur d'activation CD69 des cellules CD19⁺ et CD3⁺. D'abord, la proportion des cellules exprimant les marqueurs CD14 (monocytes) et CD16 (NK et monocytes) devient inférieure à 2%, ce qui peut suggérer différentes choses, telles qu'une diminution de l'expression des marqueurs CD14 et CD16 à la surface des cellules, une perte du marqueur à la surface des cellules[45], ou encore une adhérence importante au plastique des plateaux, qui a rendu la récupération très difficile. Comme le LPS active les macrophages de façon très efficace, il est probable que nous n'ayons pas récupéré toutes les cellules présentes dans le puits. Une combinaison de ces possibilités pourrait être à l'origine de cette observation.

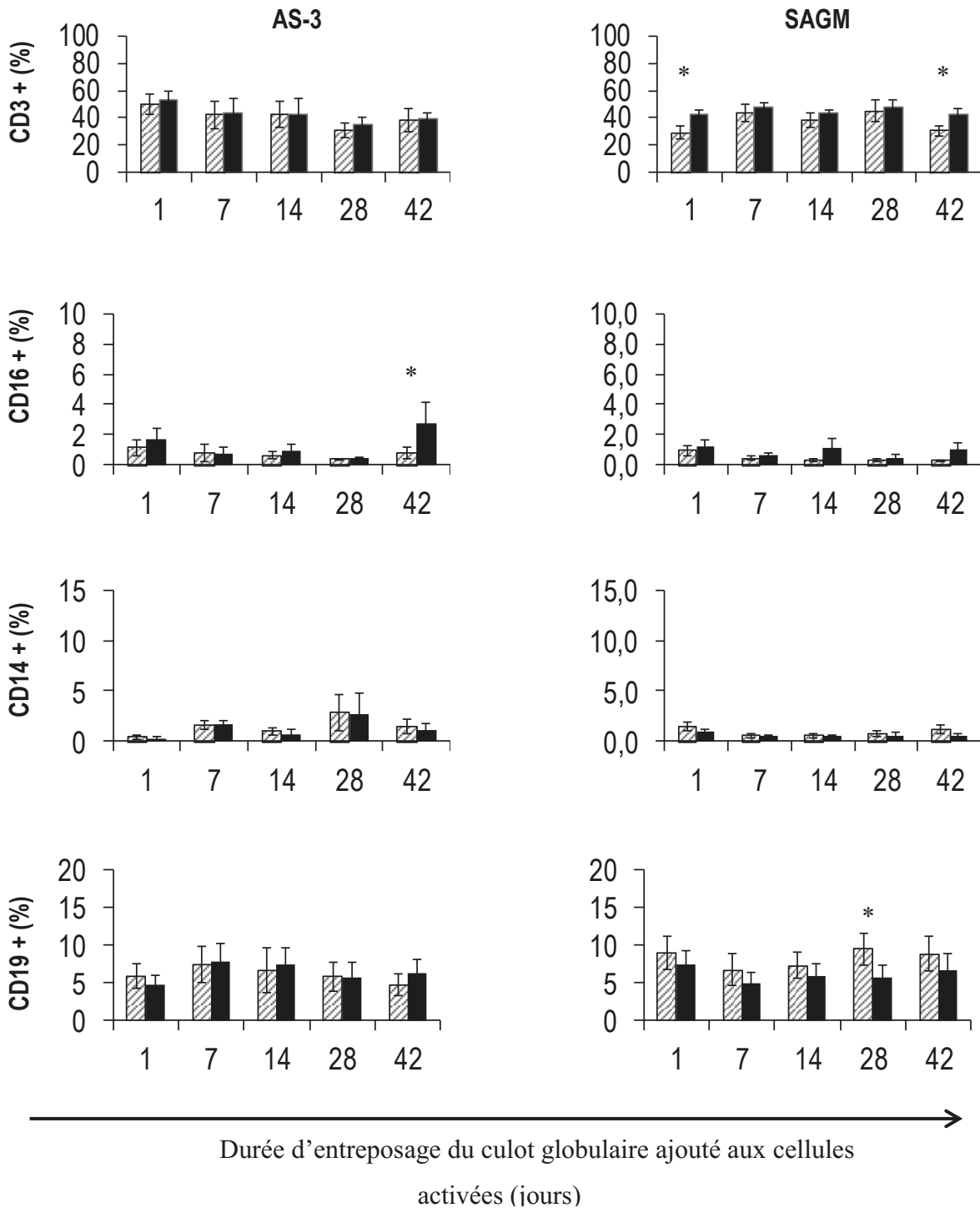


Figure 3.8 Influence de l'âge des culots globulaires sur les populations de cellules mononuclées stimulées avec du LPS, PMA et des billes activatrices CD3/CD28, 24 heures après l'ajout de surnageant de culot globulaire (moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un $p < 0,05$. Témoin activé Cellules activées + S/N

La figure 3.8 montre le pourcentage de cellules positives pour les mêmes marqueurs et les mêmes conditions que la figure 3.7. Ces résultats ont toutefois été obtenus 24 heures après l'ajout de surnageant de culots globulaires. La stimulation des cellules sur une période de 24 heures affecte la proportion des cellules exprimant le marqueur CD3. L'intensité d'expression du marqueur CD3 est significativement réduite lorsque les lymphocytes T sont stimulés [46]. Le même effet est observé après =30 minutes pour les marqueurs CD14 et CD16 présents sur les monocytes et les macrophages (figure 3.7). Toutefois, l'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 âgé de 42 jours semble affecter les monocytes et les macrophages qui expriment CD16 de manière significative en augmentant d'un facteur de 2 ($p < 0,05$) par rapport au témoin. Il est possible que cette augmentation ou conservation de l'expression du marqueur CD16 implique les molécules d'adhésions des monocytes et des macrophages. Cela suggère que le surnageant de culots globulaires AS-3 a un impact sur les molécules d'adhérence des monocytes et des macrophages.

Pour ce qui est du surnageant des culots globulaires SAGM, l'ajout du surnageant aux cellules mononucléées des trois receveurs n'a aucun effet significatif sur les cellules exprimant le marqueur CD14 ou CD16. Toutefois, la proportion de cellules CD3 positives augmente légèrement d'un facteur de 1,6 fois et 1,3 fois au jour 1 et au jour 42 d'entreposage respectivement ($p < 0,05$). La proportion des cellules CD19 positives, quant à elle, diminue suite à l'ajout de surnageant de culots globulaires SAGM et ce indépendamment de l'âge du culot globulaire ($J=28$, $p < 0,05$).

3.3.2. Influence de l'âge des culots globulaires sur les marqueurs d'activation des cellules mononucléées

Les figures 3.9 et 3.10 présentent les résultats obtenus lors de l'étude des marqueurs d'activation des cellules mononucléées incubées avec des surnageants de culots globulaires. Les graphiques A de ces figures représentent toujours la moyenne des résultats provenant de quatre culots globulaires issus du procédé AS-3 qui ont été testés sur les cellules mononucléées de trois individus différents. Pour les graphiques B, ils représentent la moyenne des résultats provenant de quatre culots globulaires issus du procédé SAGM qui ont été testés sur les cellules des trois mêmes individus utilisés

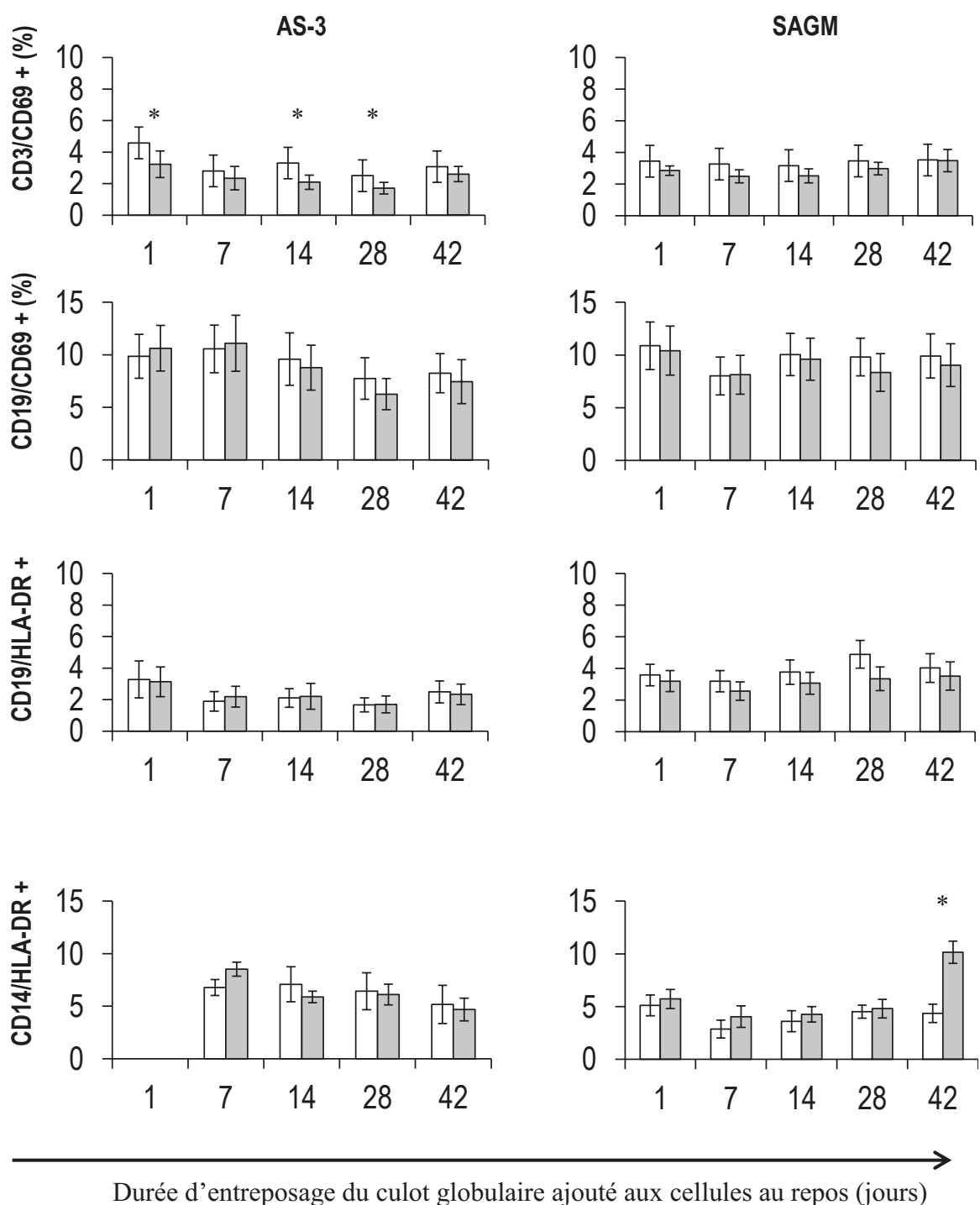


Figure 3.9 Influence des surnageants de culots globulaires sur les marqueurs d'activation des lymphocytes T, B et des monocytes non stimulés après 30 minutes d'incubation avec des surnageant de culots globulaires. Aucun résultat n'a été obtenu avec les surnageants âgés de 1 jour avec les marqueurs CD14/HLA-DR. (Moyenne de 3 individus en triplicata). * indique un $p < 0,05$. Légende : Témoin négatif □ Cellules + S/N ■

Lors des essais, différents marqueurs d'activation pour les cellules mononuclées ont été étudiés, tels les marqueurs extracellulaires CD25, CD69 et HLA-DR. Pour les résultats présentés dans cette figure, seules les proportions pour les marqueurs CD69 et HLA-DR, en combinaison avec différents marqueurs de surface, sont présentées. Puisqu'aucune modulation n'a été observée pour le marqueur CD25, même lors de la stimulation, les résultats ne sont pas présentés.

Pour les deux procédés de transformation, l'ajout de surnageant de culots globulaires n'a pas affecté l'expression des marqueurs d'activation des lymphocytes B selon les résultats présentés à la figure 3.9. Par contre, les surnageants de culots globulaires AS-3 induisent une diminution de la proportion des lymphocytes T exprimant le marqueur d'activation précoce CD69 pour les culots globulaires âgés de 1, 14 et 28 jours ($p < 0,05$) suggérant un effet anti-inflammatoire. Le surnageant de culots globulaires SAGM âgé de 42 jours, quant à lui, a provoqué une augmentation importante de la proportion des monocytes/macrophages exprimant le marqueur de surface CD14 et le marqueur d'activation HLA-DR ($p < 0,05$). Cette observation coïncide avec l'augmentation de la proportion des monocytes/macrophages (CD14+) observée à la figure 3.6. et suggère que le surnageant de culots globulaires SAGM âgé de 42 jours provoque une augmentation de l'expression de CD14.

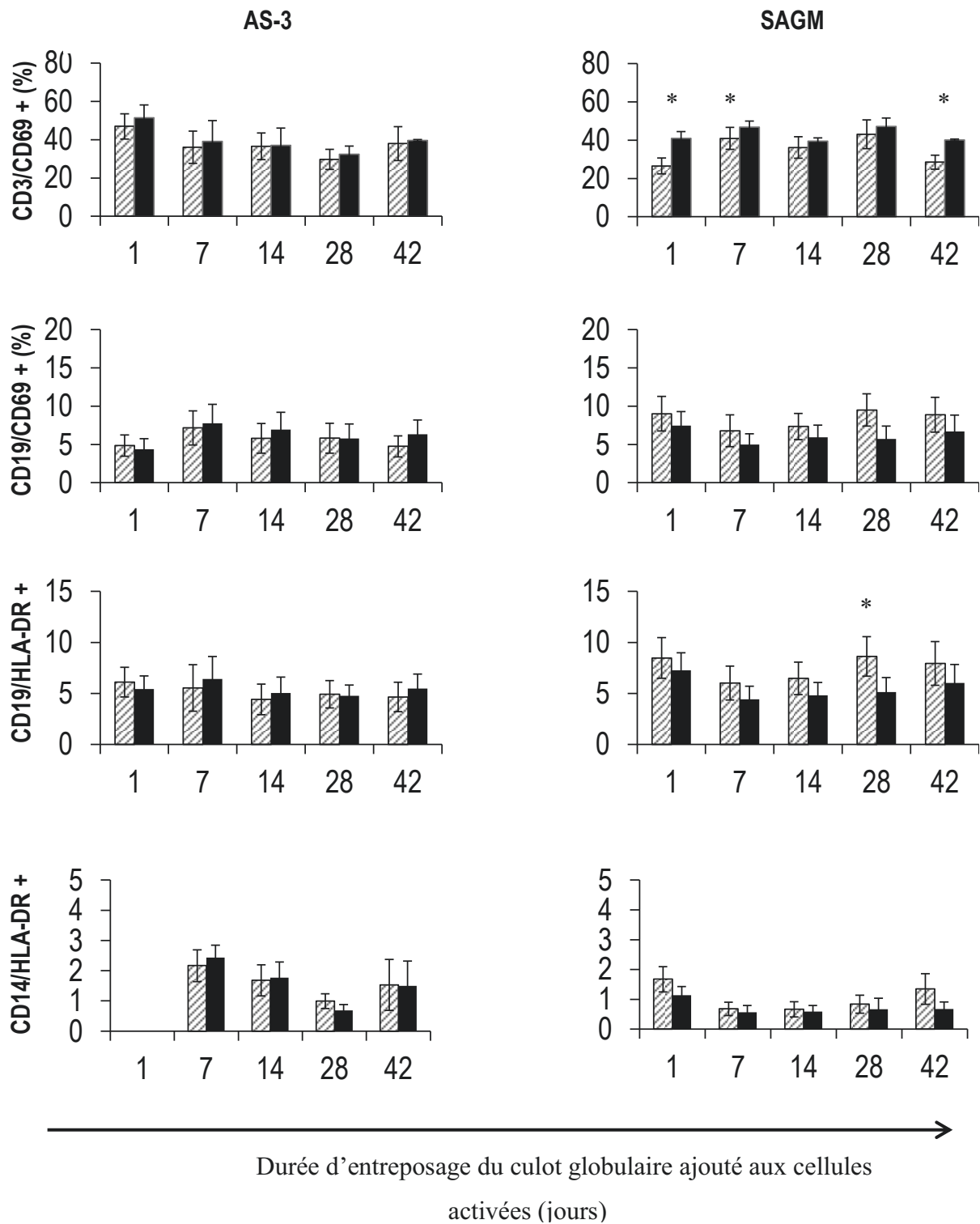


Figure 3.10 Influence des surnageants de culots globulaires sur les marqueurs d'activation des lymphocytes T, des lymphocytes B et des monocytes fortement stimulés après 24 heures d'incubation avec des surnageant de culots globulaires. Aucun résultat n'a été obtenu avec les surnageants âgés de 1 jour avec les marqueurs CD14/HLA-DR. Moyenne de 3 individus en triplicata. * indique un $p < 0,05$.

Témoin activé Cellules activées + S/N

Les résultats de la figure 3.10 montrent la distribution des population cellulaires pour les marqueurs d'activation CD69 et HLA-DR, en combinaison avec les marqueurs de surface CD3, CD14 et CD19, afin d'étudier l'effet du surnageant de culots globulaires sur l'activation des différentes sous-populations, tels les lymphocytes T et B et les monocytes/macrophages lorsque les cellules sont préalablement activées avec le LPS, le PMA et les billes activatrices CD3/CD28. Ces conditions ont été utilisées pour vérifier la théorie de la seconde insulte inflammatoire.

Comme pour la figure 3.9, le marqueur CD25 n'est pas présenté, car aucune modulation n'a été observé avec cette population de cellules. Contrairement aux observations obtenues lors de l'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 aux cellules au repos, l'ajout de aux cellules préalablement activées n'a eu aucun impact sur l'expression des marqueurs d'activation.

Toutefois, l'ajout de surnageant de culots globulaires SAGM aux cellules préalablement activées a provoqué une modulation de l'expression de CD69 et de HLA-DR. Une augmentation significative de l'expression du marqueur CD69 à la surface des lymphocytes T est observable aux jours 1, 7 et 42 ($p < 0,05$). Ces résultats suggèrent des propriétés inflammatoires aux culots globulaires SAGM capable de moduler à la hausse l'activation précoce des lymphocytes T. Par contre, le surnageant de ces culots globulaires a également induit une diminution de l'expression des marqueurs d'activation CD69 et HLA-DR à la surface des lymphocytes B, tout au long de l'entreposage suggérant un effet anti-inflammatoire. Cette diminution est plus importante lors de l'ajout de surnageant provenant de culots globulaires âgés de 28 jours ($p < 0,05$), mais elle est présente tout au long de l'entreposage de façon moins prononcée.

3.4. Influence des surnageants de culots globulaires sur la cascade de signalisation intracellulaire

3.4.1. Définition de la stratégie d'analyse des populations de cellules

Les prochaines figures présentées sont des exemples de résultats bruts présentés sous forme de graphiques obtenus en cytométrie en flux et analysés à l'aide du logiciel FCS

express 4. Ces graphiques permettent la sélection des populations d'intérêts afin de les analyser séparément. Les résultats bruts analysés en moyenne d'intensité de fluorescence permettent l'interprétation sous forme de ratio du niveau de phosphorylation entre la condition étudiée et la condition témoin, et ce pour chaque protéine intracellulaire. Ces graphiques ont été obtenus pour chacun des échantillons testés, pour ensuite comparer les résultats comptabilisés pour les deux procédés de transformation.

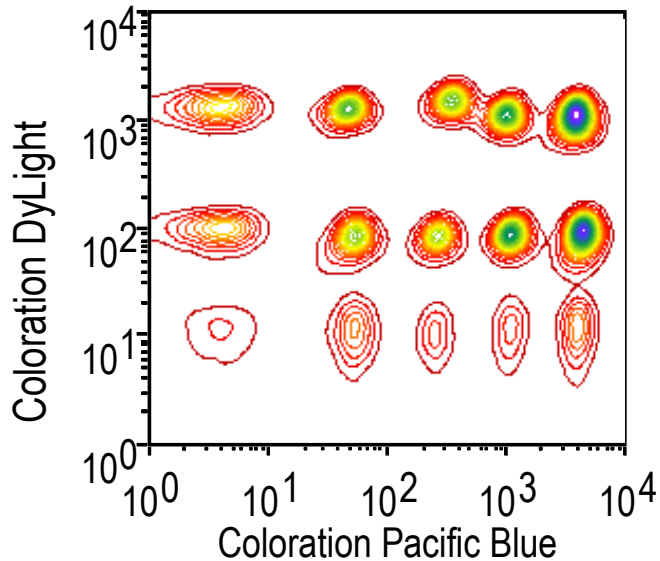


Figure 3.11 Détermination des 15 populations distinctes lors de l'acquisition au cytomètre (acquisition de 150 000 évènements). Les résultats présentés proviennent des analyses faites au T=30 minutes après l'ajout du surnageant du culot globulaire SAGM #4, au jour 14 d'entreposage.

Lors de l'acquisition au cytomètre, la toute première étape consiste à s'assurer que les 15 populations préalablement combinées dans un seul tube sont présentes et distinctes telles que présenté à la figure 3.11. Il faut donc que les quatre conditions ainsi que le contrôle positif soient présents pour chacun des trois receveurs à l'étude, comme le démontre la figure 3.11. Chaque donneur est représenté par une rangée, et chaque rangée compte cinq colonnes qui représentent les différentes conditions, pour un total de 15 populations.

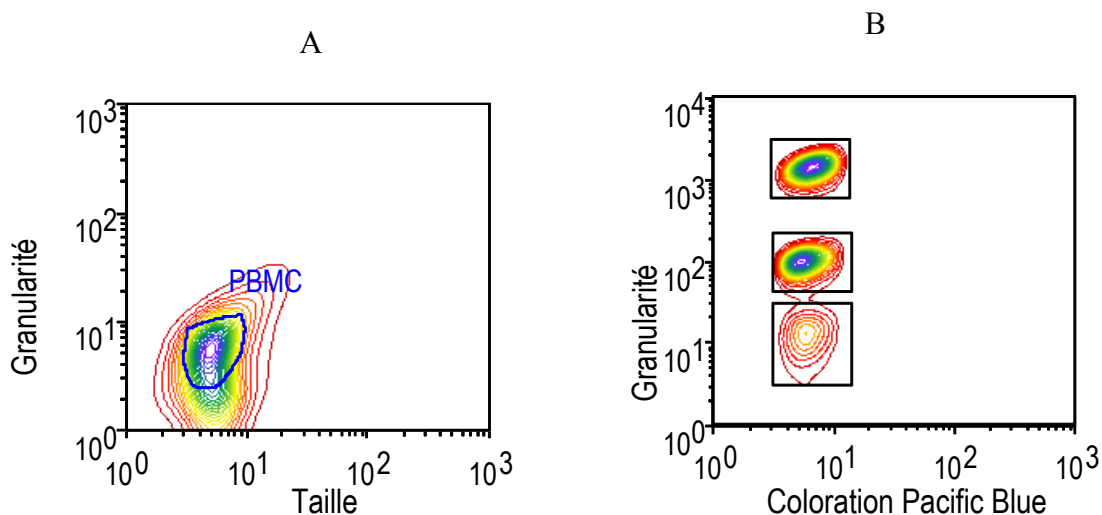
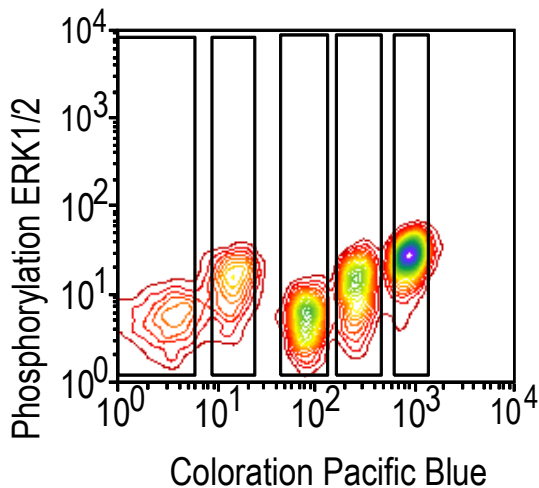


Figure 3.12 Détermination des régions pour la sélection des cellules mononuclées, pour l'analyse du niveau de phosphorylation de différentes protéines intracellulaires, à l'aide du logiciel FCS Express 4. Les résultats présentés proviennent des analyses faites au T=30 minutes après l'ajout du surnageant du culot globulaire SAGM #4, au jour 14 d'entreposage.

À l'aide du logiciel FCS Express 4, une région est déterminée afin de sélectionner la population à analyser, pour éliminer les débris cellulaires et les agrégats de cellules (voir figure 3.12 A). Ensuite, le graphique B de la figure 3.12 présente les trois concentrations différentes du colorant DyLight 800 en fonction de la taille des événements. À l'aide de ce graphique, chaque individu est facilement distingué grâce à leur différence d'intensité de fluorescence et peut être sélectionné et analysé séparément, l'intensité moyenne de fluorescence de chacune des quatre conditions ainsi que le contrôle positif de phosphorylation, pour les différentes protéines intracellulaires, peuvent être mesurées et comparées (voir figure 3.13).



Région	Moyenne d'intensité de fluorescence (MFI)
1	6
2	12
3	6
4	11
5	23

Figure 3.13 Analyse du niveau de phosphorylation de différentes protéines intracellulaires, pour chaque individu, à l'aide du logiciel FCS Express 4. Les résultats présentés proviennent des analyses faites au T=30 minutes après l'ajout du surnageant du culot globulaire SAGM #4, au jour 14 d'entreposage.

La figure 3.13 démontre le niveau de phosphorylation de la protéine ERK1/2 en intensité de fluorescence, en fonction de la concentration de Pacific Blue administrée aux différents échantillons. Les quatre conditions à l'étude ainsi que le contrôle positif sont présentés. Tout d'abord, la première population s'agit du témoin négatif, suivi du témoin activé. Ensuite, on retrouve la condition des cellules au repos en présence de surnageant de culot globulaire, puis la condition des cellules activées en présence de surnageant de culot globulaire. Pour terminer, la dernière population représente le témoin positif de phosphorylation. Chaque population du graphique a été sélectionnée à l'aide d'une région, afin d'obtenir une moyenne d'intensité de fluorescence pour chacune d'elle. Plus la moyenne est élevée, plus le niveau de phosphorylation de la protéine ERK1/2 est élevée. Le tableau B de la figure présente la MFI en chiffre pour chaque région déterminée dans le graphique A. Ces chiffres permettront l'interprétation des résultats en ratio entre la condition témoin et la condition avec du surnageant de culot globulaire.

3.4.2. Cibles intracellulaires

Les résultats présentés aux figures 3.14 à 3.17 sont interprétés sous forme de ratio entre la condition témoin (sans surnageant de culots globulaire) et la condition avec du surnageant. Les résultats des différentes cibles intracellulaires sont présentés en diagramme en boîte (figure 3.14 à 3.17). On y retrouve la moyenne des ratios (ligne de tendance), le ratio minimum et le maximum (les lignes aux deux extrêmes). Les trois niveaux qui forment la boîte représentant le 25^e et le 75^e percentile, ainsi que la médiane. Finalement, la ligne hachurée indique le niveau de base déterminé soit à l'aide du témoin négatif ou du témoin activé.

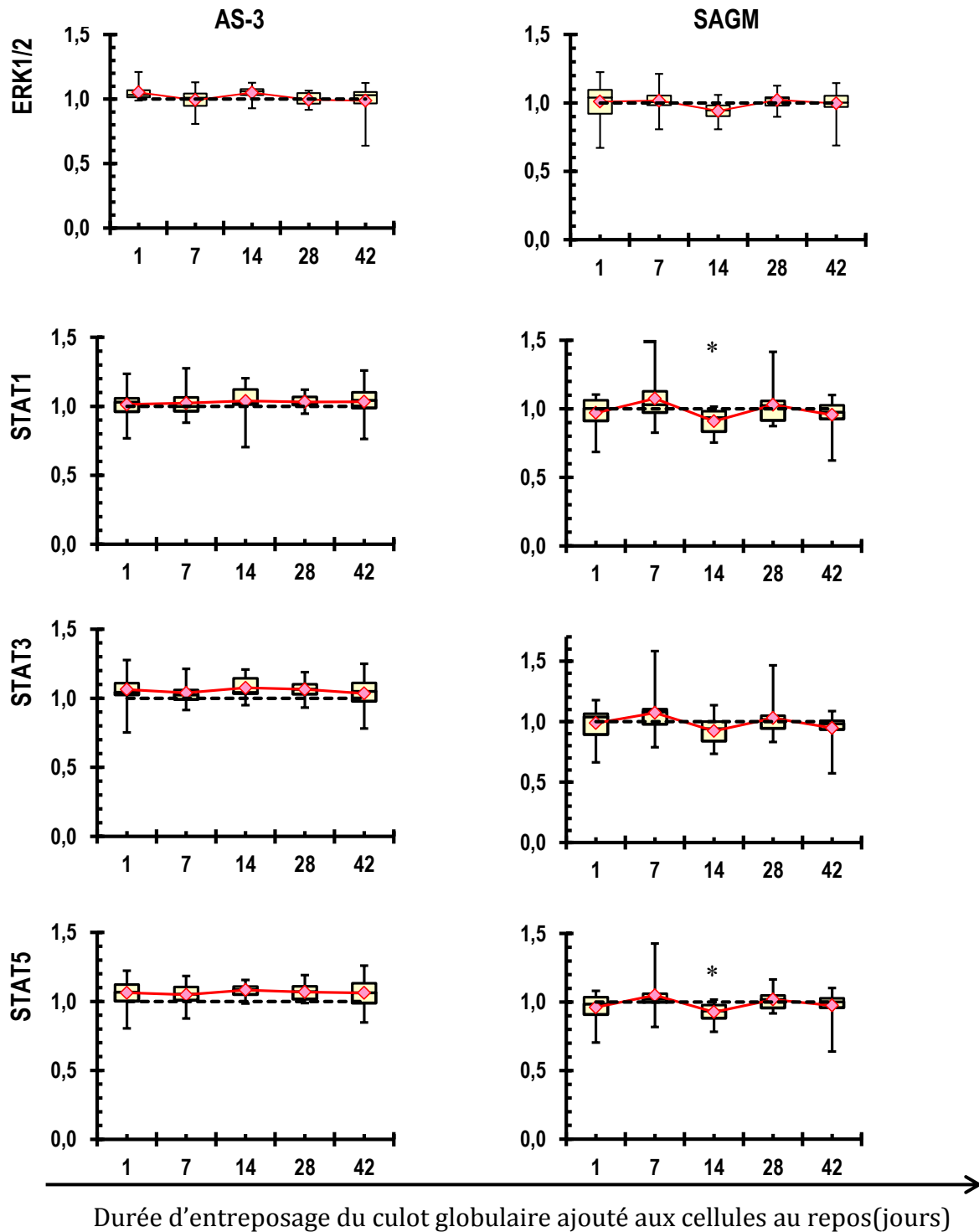


Figure 3.14 Ratio des niveau de phosphorylation de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 5 exprimé en fonction du témoin sans surnageant après 30 minutes d'incubation avec les surnageants des culot globulaire AS-3 et SAGM. Moyenne de 3 individus en triplicata. * indique un $p < 0,05$.

La figure 3.14 présente le ratio du niveau de phosphorylation de quatre protéines intracellulaires impliquées dans la réponse inflammatoire : ERK1/2, STAT1, STAT3, et STAT5, pour la condition des cellules au repos en présence de surnageant de culot globulaire. Pour le surnageant obtenu de culots globulaires AS-3, aucune différence n'a été observée. Toutefois, pour le surnageant obtenu de culots globulaires SAGM, il semble y avoir une légère diminution de la phosphorylation des quatre protéines intracellulaires après une incubation de 30 minutes avec les surnageants provenant de culots globulaires âgés de 14 jours. Cet effet est statistiquement significatif pour les protéines STAT1 et STAT5 ($p < 0,05$).

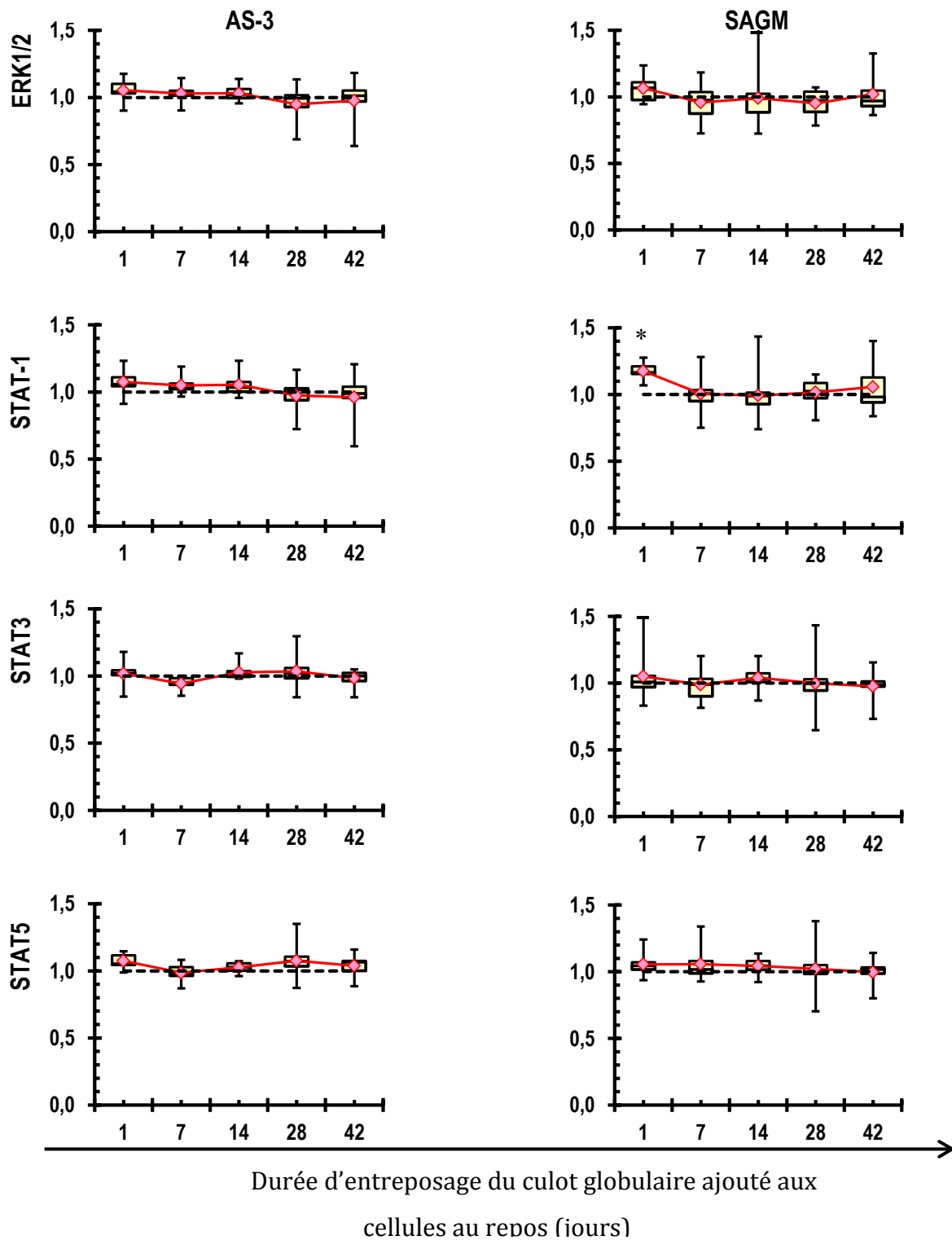


Figure 3.15 Ratio des niveau de phosphorylation de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 5 exprimé en fonction du témoin sans surnageant après 24 heures d'incubation avec les surnageants des culot globulaires AS-3 et SAGM. Moyenne de 3 individus en triplicata. * indique un $p < 0,05$.

La figure 3.15 présente les résultats de la stimulation des cellules mononucléées après 24 heures d'incubation avec les surnageants de culots globulaires. Pour les surnageants obtenus de culots globulaires AS-3, aucune différence n'est observée. Il n'y a donc aucun effet immédiat, ni retardé, lors de l'ajout de surnageant provenant de culots globulaires AS-3 à des cellules au repos, pour ces quatre protéines intracellulaires.

Pour les surnageants obtenus de culots globulaires SAGM, l'ajout de surnageant frais (1 jour) augmente le niveau de phosphorylation de la protéine STAT1 après 24 heures d'incubation. Le niveau de phosphorylation de la protéine STAT1 est faiblement mais significativement augmenté ($p < 0,05$) après l'incubation de 24 heures après l'ajout de surnageant de culot SAGM âgé d'une journée, suggérant que le surnageant de culots globulaires SAGM âgé d'un jour a un effet pro-inflammatoire retardé sur les cellules au repos.

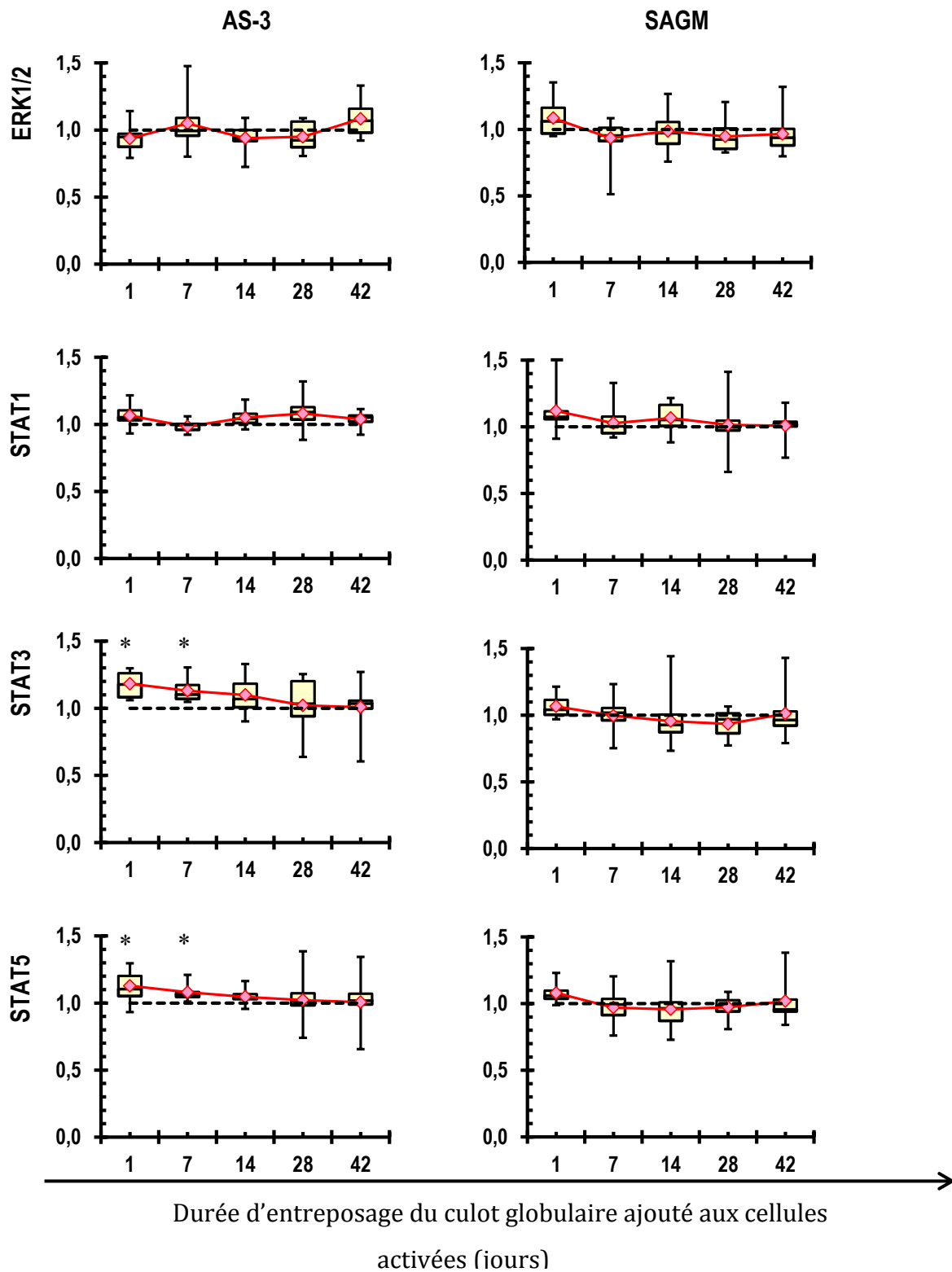


Figure 3.16 Ratio des moyenne des intensités de fluorescence de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 5 exprimé en fonction du témoin sans surnageant après 30 minutes d'incubation avec les surnageants des culot globulaires AS-3 et SAGM. Moyenne de 3 individus en triplicata. * indique un $p < 0,05$.

La figure 3.16 présente les résultats des ratios du niveau de phosphorylation de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 3 de cellules préalablement stimulées après 30 minutes d'incubation avec les surnageant de culots globulaires. Pour les surnageants provenant de culots globulaires AS-3, l'ajout de surnageant frais, âgé de 1 et 7 jours, augmente le niveau de phosphorylation des protéines STAT3 et STAT5 ($p < 0,05$), comparativement au témoin activé suggérant. Cette effet inflammatoire n'est pas observé avec les surnageants de produits âgés de plus de 14 jours. Pour les surnageants provenant de culots globulaires SAGM, l'ajout de celui-ci n'a eu aucun impact immédiat lorsqu'ajouté aux cellules activées.

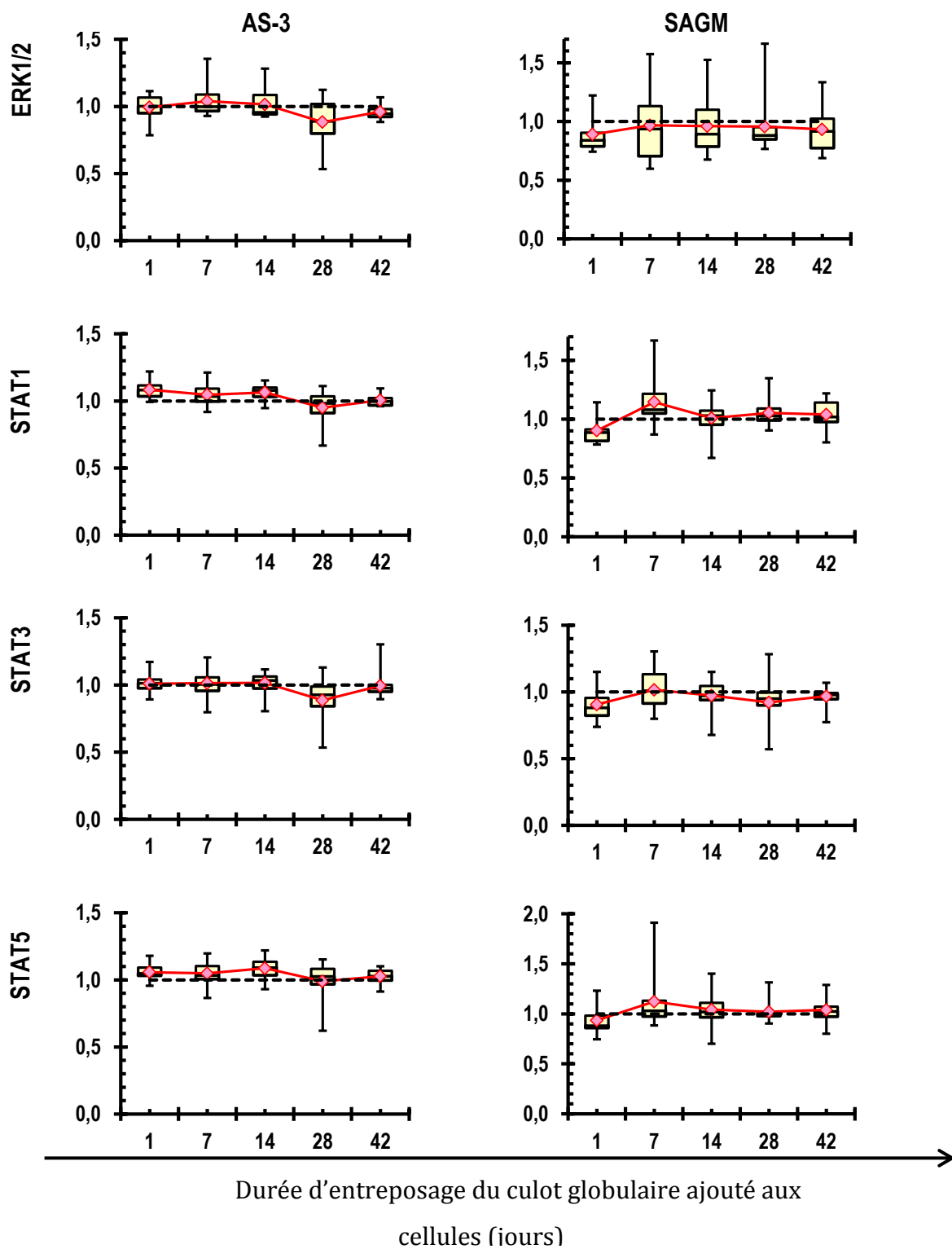


Figure 3.17 Ratio des niveau de phosphorylation de ERK1/2, STAT 1, STAT 3 et STAT 5 exprimé en fonction du témoin sans surnageant après 24 heures d'incubation avec les surnageants des culot globulaires AS-3 et SAGM. Moyenne de 3 individus en triplicata. * indique un $p < 0,05$.

Finalemant, la figure 3.17, présente l'analyse des quatre cibles intracellulaires pour la condition des cellules activées et incubées en présence de surnageant de culot globulaire pour une période de 24 heures. Aucune différence n'est observée, peu importe le procédé de transformation, suggérant qu'il n'y a pas d'effet retardé suite à l'ajout de surnageant de culot globulaire aux cellules préalablement activées.

3.5. Identification et dosage des cytokines secrétées par les cellules mononuclées

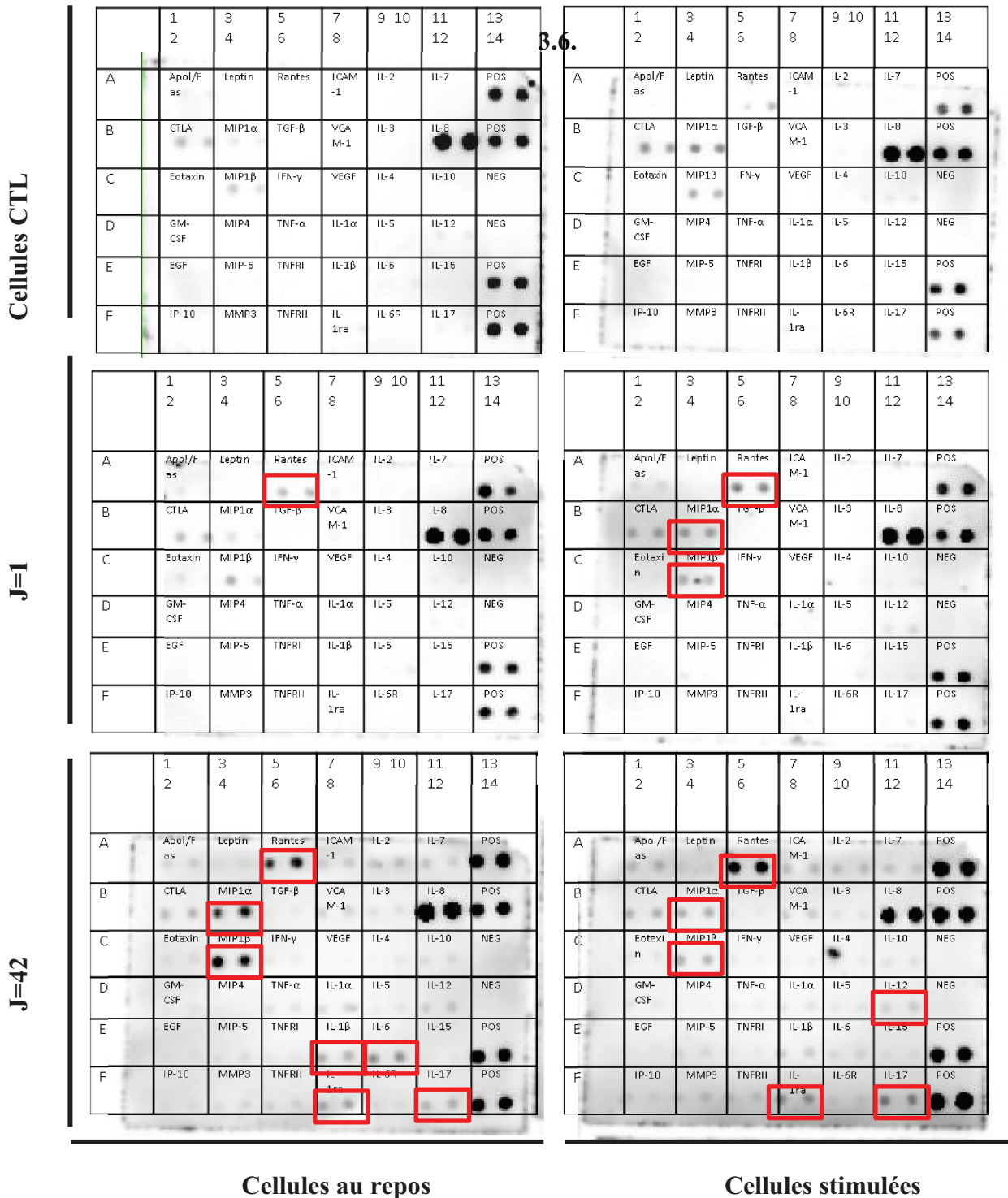


Figure 3.18 Détection de 36 cytokines simultanément à l'aide de la trousse TranSignalTM Human cytokine array 3.0. Encadrés en rouge sont les cytokines ciblées qui semblent être modulées par le surnageant de culot globulaire. Résultats du donneur SAGM #4 au jour 1 et 42 ainsi que les cellules contrôles au repos et stimulées.

La trousse TranSignal™ Human Cytokine antibody array 3.0 nous a permis de cibler quelques cytokines qui semblaient être modulées par l'ajout de surnageant de culot globulaire. Pour ces essais, nous avons analysés le surnageant des cellules du receveur #3 récolté après une incubation de 24 heures en présence d'un surnageant de culot globulaire SAGM. Les témoins négatifs et activés ont été testés, ainsi que les conditions au repos et activées en présence de surnageant, pour les jours 1, 28, et 42 (les résultats du jour 28 ne sont pas présentés). Cette expérience a permis de constater que l'ajout de surnageant de culot globulaire avait un effet pro-inflammatoire sur la sécrétion de cytokines par les cellules mononuclées exposées au surnageant de culots globulaires, qu'elles soient au repos ou activées par le LPS, PMA et les billes activatrices CD3/CD28. Une augmentation de l'intensité des signaux est aussi observée entre le surnageant frais de produits sanguins et celui testés après 42 jours d'entreposage.

Les surnageants d'un culot globulaire SAGM frais (âgé d'une journée), induisent une réponse inflammatoire et la sécrétion de RANTES lorsqu'ajoutés à des cellules mononuclées au repos ou préalablement activées. Les surnageant de culots globulaires SAGM âgés de 28 jours ont provoqué la sécrétion de nombreuses cytokines tel que montré à la figure 3.18, comparativement à celui âgé d'une journée. Pour les cellules au repos, l'ajout de surnageant des culots globulaires âgés de 28 jours a induit la sécrétion des MIP1 $-\alpha$ et $-\beta$, RANTES, IL-1 β et IL-6. Avec les cellules mononuclées préalablement activées, on observe une sécrétion accrue des cytokines RANTES et IL-17

La détection de ces 36 cytokines simultanément nous a permis de cibler plusieurs cytokines intéressantes, telle RANTES, MIP1 $-\alpha$ et $-\beta$, IL-1 β , IL-6 et IL-17. De ces cytokines, trois cytokines, soit RANTES, IL-6 et IL-1 β , ont été choisies pour effectuer une quantification plus précise de leur concentration par méthode d'ELISA quantitatif. Notre choix s'est également appuyé sur le fait que ces protéines sont fréquemment associées à la réponse inflammatoire [47-49].

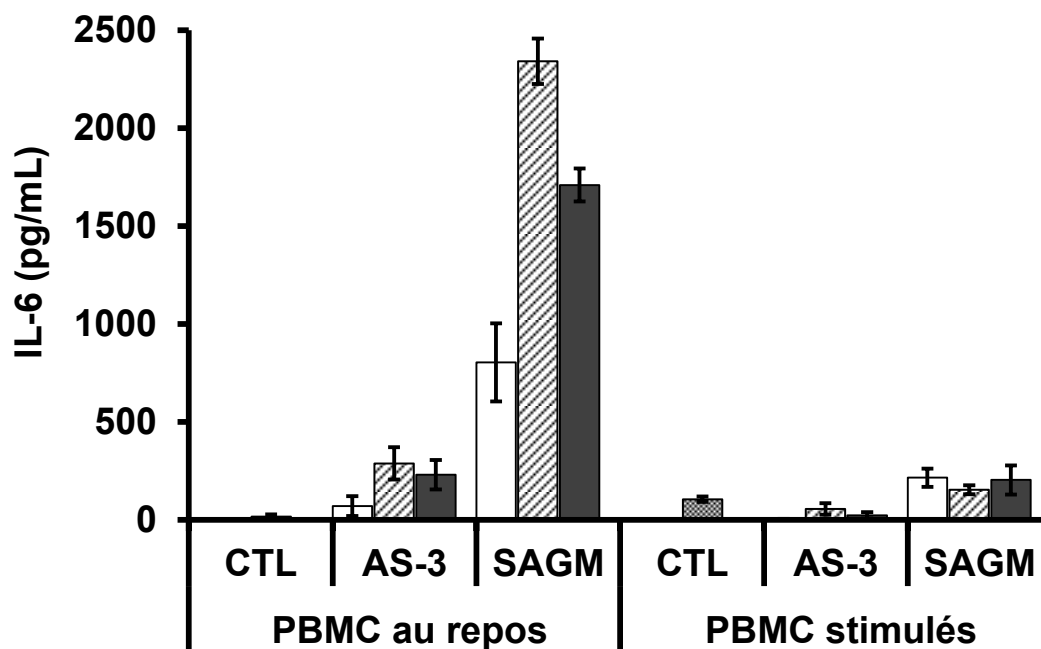






Figure 3.18 Concentration de la cytokine pro-inflammatoires IL-6, dans le surnageant de culture après 24 heures d'incubation avec le surnageant de culot globulaire AS-3 ou SAGM (n=4). Les cellules contrôles (CTL) représentent la condition témoin au repos ou préalablement stimulée. Chaque barre correspond à la moyenne des quatre culots globulaires testés ainsi que l'erreur-type correspondant. **Légende :** Contrôle  J=1  J=28  J=42 

La figure 3.18 présente la concentration de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, dans le surnageant de culture. Le niveau d'IL-6 a également été dosé dans chacun des culots globulaires à différents temps d'entreposage. Pour tous les culots globulaires, indépendamment de leur procédé de fabrication, la concentration d'IL-6 était trop faible pour être détectée. Le niveau de base pour comparer avec les différentes conditions correspond au niveau de sécrétion des contrôles utilisés tout au long de l'étude. Pour les cellules au repos, le niveau de base est de 10 pg/mL, et celui des PBMC activés est très bas également soit 105 ± 23 pg/mL. Une différence significative est observée entre les deux procédés de transformation pour la condition des cellules au repos, lors de l'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 ou SAGM. Nos résultats suggèrent que les culots globulaires SAGM sont plus inflammatoire que les culots globulaires AS-3 en induisant une forte sécrétion d'IL-6..

De plus, la sécrétion est beaucoup plus importante lors de l'ajout de surnageant de culots SAGM âgé de 28 et 42 jours suggérant que l'effet proinflammatoire est plus importante pour des produits sanguins plus âgés. Pour la condition stimulée, qui représente la théorie de la seconde insulte, l'ajout de surnageant de culots globulaires SAGM a induit une sécrétion d'IL-6, toutefois plus de dix fois moins importante que l'exposition des cellules au repos. Les concentrations d'IL-6 sont assez stables entre le jour 1 et le jour 42 suggérant que l'entreposage n'affecte pas l'issue de la sécrétion lorsque le surnageant est ajouté aux cellules activées. Par ailleurs, les surnageant de culots globulaires AS-3 n'ont induit aucune sécrétion d'IL-6 lorsqu'ajouté aux PBMC préalablement activées.

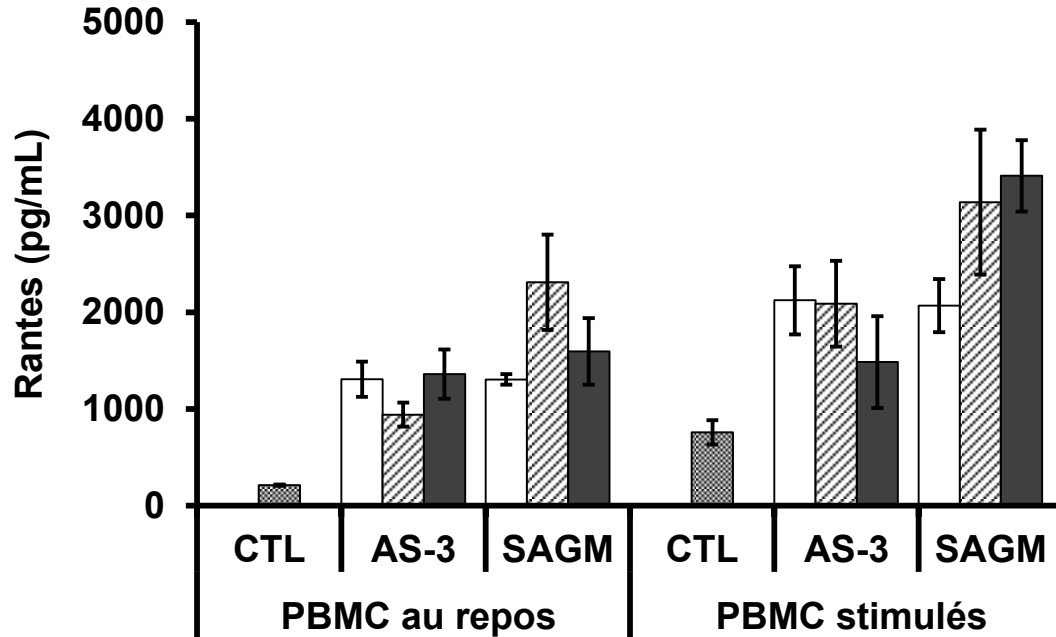


Figure 3.19 Concentration de la cytokine pro-inflammatoires RANTES, dans le surnageant de culture après 24 heures d'incubation avec le surnageant de culot globulaire AS-3 ou SAGM (n=4). Les cellules contrôles (CTL) représentent la condition témoin au repos ou préalablement stimulée. Chaque barre correspond à la moyenne des quatre culots globulaires testés ainsi que l'erreur-type correspondant. Légende : Contrôle J=1 J=28 J=42

La figure 3.19 montre l'effet de l'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 et SAGM, sur la sécrétion de la chimiokine RANTES par les cellules au repos et préalablement stimulés. Au repos (témoin), les cellules ont une sécrétion de base de 213 ± 7 pg/mL qui augmente à 756 ± 126 pg/mL après l'activation des cellules avec LPS, PMA et billes activatrices. Comme le montre le graphique de la figure 3.19, l'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 ou SAGM aux cellules au repos, induit une sécrétion de RANTES au moins deux fois plus élevée que la stimulation au LPS, PMA et billes activatrices, et ce peu importe la durée d'entreposage des culots globulaires. Le même effet est observé lorsque le surnageant est ajouté à des cellules préalablement stimulées avec des niveaux de RANTES atteignant jusqu'à 4000 pg/mL avec la condition de cellules activées en présence de surnageant de culots SAGM âgés de 28 et 42 jours. Ces observations suggèrent que les surnageants de culots globulaires peu importe leur âge ou le procédé de transformation, peuvent induire une réponse inflammatoire dans notre modèle *in vitro* qui se manifeste par la sécrétion de la cytokine RANTES.

La concentration de RANTES a été dosée dans chacun des culots globulaires AS-3 et SAGM. La concentration de RANTES dans les culots globulaires AS-3 était de 199 ± 155 pg/mL et elle est demeurée stable tout au long de l'entreposage. Pour ce qui est des culots globulaires SAGM, la concentration moyenne de RANTES au jour 1 était de 813 ± 53 pg/mL puis a diminué graduellement au cours de l'entreposage pour atteindre une moyenne de 249 ± 75 pg/mL à 42 jours.

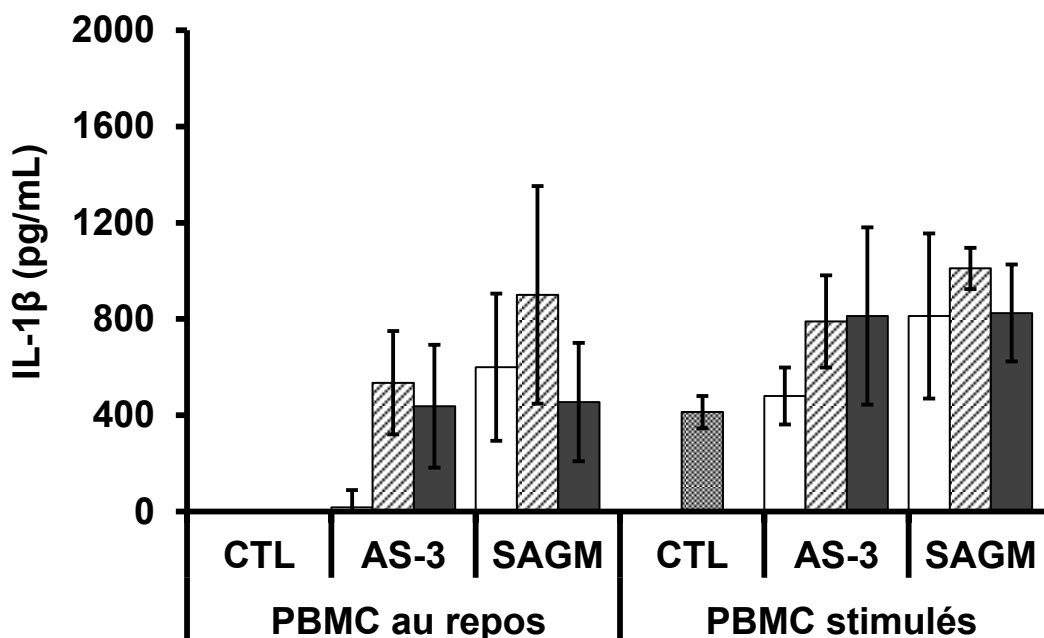


Figure 3.20 Concentration de la cytokine pro-inflammatoires IL-1 β , dans le surnageant de culture après 24 heures d'incubation avec le surnageant de culot globulaire AS-3 ou SAGM (n=4). Les cellules contrôles (CTL) représentent la condition témoin au repos ou préalablement stimulée. Chaque barre correspond à la moyenne des quatre culots globulaires testés ainsi que l'erreur-type correspondant. Légende : Contrôle J=1 J=28 J=42

La figure 3.20 présente la concentration de la cytokine IL-1 β sécrétée suite à l'ajout de surnageants de culots globulaires AS-3 et SAGM. Avec les témoins, les cellules au repos ne sécrètent pas un niveau d'IL-1 β détectable avec le test ELISA. La stimulation avec le LPS, le PMA et les billes activatrices a induit une sécrétion d'IL-1 β à de niveaux de 413 ± 77 pg/mL. Chacun des culots globulaires AS-3 et SAGM a été dosé avec la méthode d'ELISA afin de quantifier la concentration d'IL-1 β dans le surnageant. Les niveaux d'IL-1 β étaient inférieurs à la limite de détection du test.

L'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 âgés d'une journée ne provoque aucune sécrétion inflammatoire ou anti-inflammatoire après une incubation avec les cellules mononuclées non stimulées. Toutefois, avec les surnageants de culots globulaires AS-3 âgés de 28 et 42 jours, une forte sécrétion d'IL-1 β (513 ± 200 pg/mL et 438 ± 230 pg/mL) comparable à celle du témoin activé est observée, suggérant que les culots globulaires âgés

de plus de 28 jours ont un effet pro-inflammatoire. Pour les culots globulaires SAGM, les surnageants induisent, dès le jour 1 de l'entreposage, une forte sécrétion d'IL-1 β atteignant 900 ± 200 pg/mL au jour 28 et 455 ± 200 pg/mL au jour 42.

Pour la condition de cellules préalablement activées, l'ajout de surnageants, peu importe leur âge ou le procédé de transformation, favorise la sécrétion d'IL-1 β . Pour les cellules activées, le niveau de base est de 400 ± 50 pg/mL. La concentration d'IL-1 β est comparable au contrôle suite à l'ajout de surnageants de culots globulaires AS-3 frais. Par contre, les concentrations mesurées lors de l'incubation des cellules avec du surnageant de 28 et 42 jours sont plus importantes et semblables (à 800 ± 105 pg/mL vs. 800 ± 215 pg/mL respectivement). Cette augmentation de sécrétion suggère un effet pro-inflammatoire ajouté à la stimulation, en plus d'être plus important que lorsque le surnageant de culots globulaires AS-3 est ajouté aux cellules au repos.

L'ajout de surnageant de culots globulaires SAGM aux cellules activées a également un effet pro-inflammatoire sur les cellules. Cette augmentation atteint un facteur de 2,5 fois plus élevé pour les culots globulaires SAGM âgé de 28 jours (1010 ± 95 pg/mL), et un facteur de 2 fois pour les jours 1 et 42 soit une concentration de 800 ± 155 pg/mL. Ces observations suggèrent un effet pro-inflammatoire pour les culots globulaires A-3 et SAGM, bien que SAGM semble avoir un effet plus prononcé.

4. DISCUSSION

Il y a présentement un débat en médecine transfusionnelle concernant l'influence des procédés de transformation et l'âge des culots globulaires sur les effets négatifs suite à la transfusion. La différence continentale entre la morbidité et la mortalité des études Européennes et Nord- américaines décrite par de van de Watering dans une étude rétrospective est surprenante et pourrait être liée à l'utilisation de différentes solutions de conservation et aux délais d'entreposage pré-transformation différents[50]. Notre hypothèse était que les culots globulaires préparés avec la solution nutritive SAGM et des délais d'entreposage de 24 heures à 20-24°C (Europe) posséderaient des propriétés pro-inflammatoires moindres que les produits fabriqués à 4°C et conservés dans la solution de conservation AS-3 (Amérique).

Afin de vérifier notre hypothèse, un modèle de transfusion *in vitro* permettant de mimer une transfusion sanguine a été mis au point pour comparer les propriétés inflammatoires des culots globulaires AS-3 et SAGM à différents temps durant leur entreposage de 42 jours en utilisant un modèle *in vitro*. Une même cohorte de donneurs a été utilisée pour obtenir les culots globulaires AS-3 et SAGM afin d'assurer que les différences observées n'étaient pas dû au facteur de l'individu. Dans ce projet, les résultats suggèrent que les culots globulaires SAGM peuvent entraîner une réaction pro-inflammatoires plus importante que les culots globulaires AS-3 suite à l'ajout de leur surnageant à des cellules mononucléées cultivées *in vitro*.

4.1. Le modèle d'étude *in vitro*

Au cours des dernières années, plusieurs études rétrospectives ont été complétées afin d'obtenir des données concernant l'immunomodulation reliée aux transfusions sanguines [3, 50-54]. Les études ont pour but de relater les différents incidents survenus suite à une transfusion de culots globulaires, de plasma, de concentrés plaquettaires ou tout autre produit sanguin. Toutefois, peu de données sur l'impact des procédés de transformation, des solutions de conservation utilisées et des lésions d'entreposage n'ont été rapportées [1, 17, 19, 22, 55]. La mise au point et l'utilisation de modèles *in vitro* permettent d'obtenir des informations complémentaires aux observations cliniques. Par exemple, Karam *et al.* ont mis au point un modèle *in vitro* en utilisant des cultures de sang total diluées 1:4 dans le milieu

RPMI auxquelles ils ajoutaient du surnageant de culots globulaires. Le sang total était frais, et les surnageants de culots globulaires étaient congelés. À une partie des cultures a été ajouté du LPS et l'autre demeurait sans stimulation. Suite à une période d'incubation de 24 heures, le niveau de sécrétion de différentes cytokines a été mesuré[17]. D'autres travaux, ceux de Sparrow *et al.* ont étudié le potentiel inflammatoire sur les neutrophiles du surnageant de trois types de culots globulaires à l'aide d'un modèle *in vitro*. Des neutrophiles frais isolés de sang total étaient mis en culture dans du RPMI supplémenté de 10% sérum bovin puis le surnageant de culots globulaires congelés était ajouté aux cultures[56]. Suite à une incubation de 24 heures, la sécrétion d'IL-8 et la migration des neutrophiles étaient mesurées.

Les travaux de Muszynski *et al.* ont étudié l'influence de l'âge des culots globulaires et de la solution de conservation sur les effets immunosuppresseurs des globules rouges. Les monocytes frais étaient d'abord mis en culture avec un des segments de culot globulaire conservé dans différentes solutions de conservation et âgé entre 7 et 21 jours[22]. Un autre modèle *in vitro* a été mis au point dans les travaux de Baumgartner *et al.* pour étudier l'effet du surnageant de culots globulaires sur la réponse inflammatoire induite par le LPS des cellules mononucléées du sang. Les leucocytes étaient d'abord mis en culture pendant 24 heures avec ou sans 5 % (v/v) de surnageant de culot globulaire. Ensuite, les leucocytes étaient stimulés avec LPS pour une période additionnelle de 24 heures [19].

Dans le cadre de ce projet, les produits sanguins ont été utilisés frais et les leucocytes congelés. Le modèle *in vitro* a été conçu pour étudier différents scénarios retrouvés dans la réalité. D'abord, une portion des cellules étaient stimulé avec du LPS, PMA et des billes activatrices CD3/CD28 afin de reproduire la théorie de la seconde insulte alors que l'autre portion des leucocytes ne subissait pas de stimulation pour représenter le scénario où un receveur reçoit une transfusion sanguine lorsque son système n'est pas stimulé. Suite à la stimulation ou le repos d'une période de 3 à 4 heures, le surnageant de culots globulaires étaient ajoutés aux leucocytes, pour une période de 30 minutes, pour mimer une réaction immédiate, et pour 24 heures, pour mimer une réaction tardive. Notre modèle comportait plusieurs avantages que les autres modèles n'avaient pas. Par exemple, la même cohorte de donneur a été utilisée pour les deux procédés de transformation afin d'éliminer la variabilité que représente la source des produits sanguins. De plus, les produits sanguins étaient utilisés

frais et non congelé, comme lors d'une transfusion sanguine. Le milieu de culture était exempt de protéines animales pour éviter d'éventuelles interactions animal-humain qui auraient pu influencer les cellules. Le ratio de volume entre le surnageant et milieu de culture était le 1:5 afin d'imiter une transfusion. L'utilisation de leucocytes plutôt que d'isoler des monocytes ou des neutrophiles représentait également un avantage, car il permettait d'étudier une population hétérogène pouvant interagir entre elles. Finalement, toutes les mesures étaient prises à deux temps d'incubation différents, 30 minutes après l'ajout du surnageant de culot globulaire pour les réactions immédiates, et 24 heures pour les réactions transfusionnelles tardives.

Bien que le modèle apporte plusieurs avantages, il y a également des désavantages. Les essais ont été faits sur un petit nombre d'échantillon, soit un $n=4$ pour chaque procédé de transformation. Aussi, une réaction inflammatoire au niveau de la phosphorylation des protéines intracellulaires peut être très rapide, les temps d'incubation n'étaient peut-être pas optimaux pour détecter une variation. Finalement, bien que la population de leucocytes était hétérogène, elle n'incluait pas les granulocytes, des acteurs importants lors d'une réponse inflammatoire.

4.2. Le surnageant de culots SAGM provoque une augmentation de la proportion de monocytes et de macrophages exprimant le marqueur de surface CD14

Nos résultats montrent que l'ajout de surnageant de culots globulaires SAGM âgé de 42 jours augmente de 2 fois la proportion de monocytes et de macrophages par rapport à la condition contrôle ($p<0,05$) (figure 3.6). Cette augmentation, qui se produit dans un délai de 24 heures après l'ajout du surnageant aux PBMC, peut être expliquée de différentes façons. D'abord, il est probable que le surnageant stimule les monocytes en les amenant à proliférer et à se différencier. Il se pourrait également que le surnageant affecte tout simplement les molécules d'adhésion des monocytes, les rendant ainsi plus facilement récupérables lors de la récupération des cellules pour les analyses cellulaires. Bref, le surnageant provenant de culots globulaires SAGM semble affecter les cellules au repos de manière significative après seulement 24 heures de contact.

Ce résultat, bien que peu attendu, est appuyé par le patron de sécrétion de cytokines par les leucocytes. Comme les cytokines sécrétées par les cellules sont toutes pro-

inflammatoires, la théorie de stimulation des monocytes par le surnageant est plausible. De plus, certains modèles décrits plus tôt appuient également les résultats, tels les travaux de Baumgartner *et al.*[18].

4.3. Le surnageant de culots globulaires SAGM contribue au maintien de l'expression du marqueur de surface CD3 et augmente la proportion de cellules exprimant CD69

L'ajout de surnageant SAGM contribue au maintien de l'expression du marqueur CD3 lorsque les lymphocytes T sont activées (figure 3.8). Le maintien de l'expression du CD3 s'observe tout au long de l'entreposage, mais est significatif ($p=0,01$) seulement lors de l'ajout de surnageant SAGM âgé de 1 et 42 jours d'entreposage. Une explication pourrait être que les cytokines et les leucocytes résiduels dans les culots globulaires SAGM frais affectent les lymphocytes T. La concentration de RANTES, une cytokine pro-inflammatoire, est de 800 pg/mL dans les culots globulaires SAGM frais. Si on compare la concentration avec celle du sérum d'une personne en santé, elle est de $31,13 \pm 10,56$ selon les travaux de Tang *et al.*[57]. Pour ce qui est des culots globulaires SAGM de 42 jours, ce serait les lésions d'entreposage subies par les globules rouges, tels le relâchement de microparticules, qui affectent les lymphocytes T.

La stimulation des cellules avec le PMA peut engendrer une perte d'expression du marqueur CD3 de plus de 40% en 24 heures[46]. Le maintien partiel de l'expression de ce marqueur de surface sur les cellules mononucléées activées suggère que le surnageant de culots SAGM exercerait un effet pro-inflammatoire, car bien qu'il vient contrer l'effet du PMA sur la proportion de CD3, il augmente également la proportion des cellules CD69 positives. L'ajout de surnageant AS-3 n'a aucun impact sur le pourcentage de cellules exprimant le CD3.

Nous avons observé une augmentation de l'expression du marqueur CD69 d'activation précoce des lymphocytes T, avec les cellules stimulées et mises en présence durant 24 heures avec les surnageants de culots globulaires. Cette augmentation est observable avec les surnageants des produits sanguins peu importe la durée de l'entreposage. Une augmentation qui est d'ailleurs statistiquement significative avec l'ajout de surnageant SAGM âgé de 1, 7 et 42 jours ($p<0,05$). Cette observation suggère que l'ajout de surnageant

SAGM frais ou vieux provoquerait une activation précoce supplémentaire à la stimulation ajoutée au milieu de culture. Ces résultats sont, encore une fois, appuyés par différents modèles qui ont observés des effets pro-inflammatoires tels celui de Baumgartner *et al.*, Spitalnik *et al.* et Karam *et al.*[17-19].

4.4. La phosphorylation des protéines intracellulaires

Les figures 3.14 à 3.17 nous présentent la phosphorylation de quatre protéines intracellulaires impliquées lors de la réponse immunitaire. Ces quatre figures démontrent une grande variabilité lorsqu'on regarde les minimums et les maximums. Bien qu'aucune différence majeure n'ait été observée au niveau de la phosphorylation des protéines intracellulaires, les contrôles ont démontré que le système de mesure était fonctionnel. Cela signifie que les temps d'attente n'étaient peut-être pas optimaux, car une réponse immédiate peut être aussi rapide que quinze minutes suivant le stimulus. Il est toutefois possible de constater qu'aucune stimulation chronique ni prolongée n'a été décelée lors de l'étude des quatre protéines intracellulaires.

Comme les variations étaient importante d'une combinaison donneur/receveur à l'autre, une étude à plus grande échelle permettrait probablement d'établir un lien entre l'interaction donneur, produits et receveur et les réactions adverses qui subviennent suite aux transfusions de culots globulaires[9].

4.5. Des cytokines pro-inflammatoires sécrétées suite à l'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 et SAGM

Différents modèles *in vivo* et *in vitro* ont été mis au point afin d'étudier la sécrétion de cytokines de différents types cellulaires suite à l'ajout de produits sanguins [19, 22, 56, 58]. Ces études ont été faites pour étudier les lésions d'entreposage que subissent les produits sanguins, ainsi que leurs effets inflammatoires. Les résultats obtenus pour les différents modèles sont plutôt contradictoires, car certaines études rapportent des effets pro-inflammatoires, alors que d'autre rapportent des effets plutôt anti-inflammatoires. Sparrow *et al.* ont observé que la concentration de la chimiokine RANTES augmentait avec la durée d'entreposage des culots globulaires, un phénomène lié à la présence de leucocytes résiduels dans les poches. En effet, le type de filtre utilisé pour la leucoréduction affectait la concentration de RANTES mesurée dans le surnageant de poches entreposées[56]. Selon les

résultats obtenus dans le cadre de ces travaux, les culots globulaires les plus similaires, conservés dans la solution SAGM, la concentration de RANTES est de 539 ± 93 au jour 1 d'entreposage et 890 ± 93 pg/mL au jour 42. La concentration de RANTES mesurée dans les culots globulaires utilisés pour notre projet est de l'ordre de 200 ± 50 pg/ml dans les culots globulaires AS-3 et de 800 ± 100 pg/ml dans les culots globulaires SAGM au jour 1 et 250 ± 45 pg/mL au jour 42 d'entreposage.

On se réfère parfois aux effets inflammatoires des culots globulaires comme étant de l'immunomodulation lié aux transfusions ou TRIM. Ces effets peuvent être anti-inflammatoires comme l'a constaté l'équipe de Muszynski *et al.*, qui a rapporté que les culots globulaires âgés de 21 jours, lorsqu'ajoutés à une population de monocytes stimulés au LPS *in vitro*, provoquaient une diminution de la sécrétion de TNF- α , et une augmentation de sécrétion de l'IL-10[22]. Karam *et al.* ont également observé des effets pro-inflammatoires, puis anti-inflammatoires dans un modèle *in vitro* en incubant du surnageant de culots globulaires avec du sang total frais[17]. Ils ont ainsi observé une augmentation d'un facteur de $1,7 \pm 0,3$ pg/mL pour les culots globulaires pages de 1 et 6 jours, puis une diminution des niveaux d'IL-6 et de TNF- α dans leurs cultures de sang total en présence de surnageant de culots globulaires AS-3 en fonction de la durée d'entreposage des culots globulaires. Par ailleurs, des effets pro-inflammatoires associés avec l'âge des culots globulaires ont été observé par Spitalnik *et al.* dans un modèle *in vivo* murin avec une augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoire telles IL-6, MIP- β , TNF- α , et MCP-1[18]. Ces observations coïncident avec les résultats obtenus dans le cadre de mon projet de maîtrise, car nous avons également observé une sécrétion de cytokines exclusivement pro-inflammatoire avec les analyses d'immunobuvardage avec les membranes (figure 3.18) et les ELISA, et ce dès le premier jour d'entreposage des produits sanguins. D'ailleurs, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (RANTES, MIP-1 α , IL-1 β , IL-12 et IL-17) semble s'intensifiée au cours de l'entreposage des culots globulaires.

Le dosage par ELISA de trois de ces cytokines, RANTES, IL-1 β , et IL-6, a confirmé la nature pro-inflammatoire des cytokines sécrétées par les cellules au repos et stimulées suite à l'ajout de surnageant de culots globulaires AS-3 et SAGM. Nos observations ont confirmé que l'effet se manifestait dès le jour 1 et s'intensifiait au cours de l'entreposage

(figures 3.19 à 3.21). Nos résultats soulignent la nature pro-inflammatoire des surnageants de culots globulaires SAGM qui ont entraîné une forte sécrétion d'IL-6, de RANTES, et d'IL-1 β lorsqu'ajouté aux cellules au repos et cela peu importe l'âge du culot globulaire. Les surnageants de culots globulaires AS-3 provoquent également la sécrétion de RANTES ainsi que IL-1 β lorsqu'ajouté aux cellules au repos. Par contre, la sécrétion d'IL-6 est environ 10 fois moins élevée que celle provoquée par le surnageant de culots globulaires en SAGM.

Pour les cellules stimulées, le procédé de transformation et l'âge du culot n'ont pas d'importance suggérant que les culots globulaires SAGM et AS-3 sont tous deux pro-inflammatoires dans notre modèle *in vitro*. L'ajout de surnageant induit une sécrétion importante de RANTES et d'IL-1 β , peu importe le procédé et la durée d'entreposage des culots globulaires. Nos résultats sont d'ailleurs comparables à ceux publiés par d'autres groupes [1, 5, 18, 19].

5. CONCLUSION

Mon projet de maîtrise a permis de mettre au point un modèle de transfusion *in vitro* qui offre la possibilité de comparer les propriétés inflammatoires de culots globulaires provenant de deux procédés de transformation différents. Les résultats obtenus dans le cadre du projet démontrent quelques modulations au niveau des phénotypes cellulaires. L'ajout de surnageant de culots SAGM âgé de 42 jours double en effet la proportion de monocytes et macrophages sur une période de 24 heures lorsqu'ajouté à des cellules au repos. De plus, l'ajout de surnageant de culots SAGM frais ou vieux, augmente la proportion de lymphocytes T activés (CD3+CD69+) de façon significative sur une période de 24 heures, et ce pour des cellules préalablement stimulées au LPS, PMA et billes activatrices ciblant CD3 et CD28. Toutefois, les résultats obtenus lors de l'étude de la sécrétion de cytokines suggèrent que les culots globulaires, peu importe l'âge et le procédé de transformation, possèdent des propriétés inflammatoires, qui s'intensifient au cours de l'entreposage. Les résultats obtenus dans les trois volets de mon projet de maîtrise, suggèrent que les culots globulaires SAGM ont des propriétés pro-inflammatoires plus importantes que les culots globulaires AS-3. Bref, selon les résultats obtenus dans le cadre de ce projet, il n'est pas possible de confirmer l'hypothèse. En fait, les résultats suggèrent même le contraire de l'hypothèse. Des essais supplémentaires permettront d'appuyer nos résultats obtenus.

L'immunomodulation reliés aux transfusions demeurent un sujet d'actualité et des études plus approfondies seront nécessaires afin de mieux comprendre la source des réactions transfusionnelles et peut-être éventuellement les diminuer voire les éliminer.

6. PERSPECTIVES

Lors d'études approfondies, il serait intéressant d'appliquer le modèle *in vitro* à différents produits sanguins telles les concentrés plaquettaires et le plasma. Il serait également intéressant d'utiliser différentes sources de cellules afin d'inclure les neutrophiles et les cellules dendritiques, comme ils sont des intervenants majeurs lors des réponses inflammatoires. De plus, seulement trois cytokines ont été dosées par ELISA, alors que plusieurs autres ont été identifiées avec l'immunobuvardage, le dosage de celles-ci pourrait être fait afin de confirmer leur présence dans le milieu de culture et pourrait être associé à des observations cliniques. Finalement, le modèle devrait être utilisé à plus grande échelle afin de confirmer les résultats obtenus.

RÉFÉRENCES

1. Sparrow, R.L., *Red blood cell storage and transfusion-related immunomodulation*. Blood Transfus, 2010. **8 Suppl 3**: p. s26-30.
2. Liumbruno, G.M. and J.P. Aubuchon, *Old blood, new blood or better stored blood?* Blood Transfus, 2010. **8(4)**: p. 217-9.
3. Sparrow, R.L., *Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: a role for "omics" analyses*. Blood Transfus, 2012. **10 Suppl 2**: p. s7-11.
4. normes, C.c.d., *Sang et produits sanguins labiles*, A.c.d. normalisation, Editor. 2010. p. 116.
5. Glenister, K.M. and R.L. Sparrow, *Level of platelet-derived cytokines in leukoreduced red blood cells is influenced by the processing method and type of leukoreduction filter*. Transfusion, 2010. **50(1)**: p. 185-9.
6. Cardo, L.J., D. Wilder, and J. Salata, *Neutrophil priming, caused by cell membranes and microvesicles in packed red blood cell units, is abrogated by leukocyte depletion at collection*. Transfus Apher Sci, 2008. **38(2)**: p. 117-25.
7. Yoshida, T., et al., *Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions*. Vox Sang, 2007. **92(1)**: p. 22-31.
8. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414(6859)**: p. 105-11.
9. Garraud O. , C.F., Hamzeh-Cognasse H., Laradi S., *Blood transfusion and inflammation*. Transfusion clinique et biologique, 2013.
10. 4
11. Kriebardis, A.G., et al., *RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components*. Transfusion, 2008. **48(9)**: p. 1943-53.
12. Jy, W., et al., *Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications*. Transfusion, 2011. **51(4)**: p. 886-93.
13. Spinella, P.C., et al., *Properties of stored red blood cells: understanding immune and vascular reactivity*. Transfusion, 2011. **51(4)**: p. 894-900.
14. Brandao, M.M., et al., *Elastic properties of stored red blood cells from sickle trait donor units*. Vox Sang, 2003. **85(3)**: p. 213-5.
15. Hovav, T., et al., *Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage*. Transfusion, 1999. **39(3)**: p. 277-81.
16. Anniss, A.M. and R.L. Sparrow, *Storage duration and white blood cell content of red blood cell (RBC) products increases adhesion of stored RBCs to endothelium under flow conditions*. Transfusion, 2006. **46(9)**: p. 1561-7.
17. Karam, O., et al., *Length of storage and in vitro immunomodulation induced by prestorage leukoreduced red blood cells*. Transfusion, 2009.
18. Hod, E.A., et al., *Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation*. Blood, 2010. **115(21)**: p. 4284-92.
19. Baumgartner, J.M., et al., *Red blood cell supernatant potentiates LPS-induced proinflammatory cytokine response from peripheral blood mononuclear cells*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29(6)**: p. 333-8.
20. van de Watering, L., *Pitfalls in the current published observational literature on the effects of red blood cell storage*. Transfusion. **51(8)**: p. 1847-1854.

21. Pandey, P., et al., *Transfusion-associated immunomodulation: Quantitative changes in cytokines as a measure of immune responsiveness after one time blood transfusion in neurosurgery patients*. Asian J Transfus Sci, 2010. **4**(2): p. 78-85.
22. Muszynski, J., et al., *Immunosuppressive effects of red blood cells on monocytes are related to both storage time and storage solution*. Transfusion.
23. Bilgin, Y.M. and A. Brand, *Transfusion-related immunomodulation: a second hit in an inflammatory cascade?* Vox Sang, 2008. **95**(4): p. 261-71.
24. Kerkhoffs, J.L., et al., *Clinical effectiveness of leucoreduced, pooled donor platelet concentrates, stored in plasma or additive solution with and without pathogen reduction*. Br J Haematol, 2010. **150**(2): p. 209-217.
25. Bilgin, Y.M., et al., *Mannose-binding lectin is involved in multiple organ dysfunction syndrome after cardiac surgery: effects of blood transfusions*. Transfusion, 2008.
26. Rawlings, D.J., et al., *Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 282-94.
27. Medzhitov, R. and T. Horng, *Transcriptional control of the inflammatory response*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 692-703.
28. O'Shea, J.J., et al., *Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 239-50.
29. Abbas, L., Pillai *Cellular and molecular immunology 7th edition*. 2011: Saunders.
30. Gonzalez-Navajas, J.M., et al., *Immunomodulatory functions of type I interferons*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 125-35.
31. O'Shea, J.J. and P.J. Murray, *Cytokine signaling modules in inflammatory responses*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 477-87.
32. Reich, N.C. and L. Liu, *Tracking STAT nuclear traffic*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 602-12.
33. Shuai, K. and B. Liu, *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 900-11.
34. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
35. Sant'Angelo, D.B., et al., *A molecular map of T cell development*. Immunity, 1998. **9**(2): p. 179-86.
36. Pardoll, D.M., et al., *Early genetic events in T cell development analyzed by in situ hybridization*. J Exp Med, 1987. **165**(6): p. 1624-38.
37. Guha, M. and N. Mackman, *LPS induction of gene expression in human monocytes*. Cell Signal, 2001. **13**(2): p. 85-94.
38. Trickett, A. and Y.L. Kwan, *T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads*. J Immunol Methods, 2003. **275**(1-2): p. 251-5.
39. Blackwell, G.J., et al., *Stimulation and inhibition of secretion by phorbol myristate acetate in different cell types*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **127**(3): p. 950-5.
40. Neron, S., et al., *Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells*. Transfusion, 2007. **47**(6): p. 1042-9.

41. Neron, S., et al., *Effective in vitro expansion of CD40-activated human B lymphocytes in a defined bovine protein-free medium*. J Immunol Methods, 2011. **371**(1-2): p. 61-9.
42. Michelson, A.D., et al., *Flow cytometry*, in *Platelets*, E. Science, Editor. 2002. p. 297-315.
43. Krutzik, P.O. and G.P. Nolan, *Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling*. Nat Methods, 2006. **3**(5): p. 361-8.
44. Radulovic, K., et al., *The early activation marker CD69 regulates the expression of chemokines and CD4 T cell accumulation in intestine*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65413.
45. Scherberich, J.E. and W.A. Nockher, *Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(5): p. 574-8.
46. Weyand, C.M., J. Goronzy, and C.G. Fathman, *Modulation of CD4 by antigenic activation*. J Immunol, 1987. **138**(5): p. 1351-4.
47. Oran, P.E., et al., *Intrapersonal and populational heterogeneity of the chemokine RANTES*. Clin Chem, 2010. **56**(9): p. 1432-41.
48. Bless, N.M., et al., *Role of CC chemokines (macrophage inflammatory protein-1 beta, monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2650-9.
49. Hernandez-Rodriguez, J., et al., *Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis*. Rheumatology (Oxford), 2004. **43**(3): p. 294-301.
50. van de Watering, L., *Pitfalls in the current published observational literature effects of red blood cell storage*. Transfusion, 2011.
51. Waanders, M., L. van de Watering, and A. Brand, *Immunomodulation and allogeneic blood transfusion*. Transfusion alternatives in transfusion medicine, 2008. **10**: p. 127-138.
52. Collins, T.A., *Packed red blood cell transfusions in critically ill patients*. Crit Care Nurse, 2011. **31**(1): p. 25-33; quiz 34.
53. Shaz, B.H., S.R. Stowell, and C.D. Hillyer, *Transfusion-related acute lung injury: from bedside to bench and back*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1463-71.
54. Vamvakas, E.C., *Purported deleterious effects of "old" versus "fresh" red blood cells: an updated meta-analysis*. Transfusion, 2011. **51**(5): p. 1122-3.
55. McFaul, S.J., et al., *Packed blood cells stored in AS-5 become proinflammatory during storage*. Transfusion, 2009.
56. Sparrow, R.L. and K.A. Patton, *Supernatant from stored red blood cell primes inflammatory cells: influence of prestorage white cell reduction*. Transfusion, 2004. **44**(5): p. 722-30.
57. Tang, Y.Q., M.R. Yeaman, and M.E. Selsted, *Antimicrobial peptides from human platelets*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6524-33.
58. Karam, O., et al., *Length of storage and in vitro immunomodulation induced by prestorage leukoreduced red blood cells*. Transfusion, 2009. **49**(11): p. 2326-34.

