

# Etiopathologie du TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) : anticorps anti-HLA et NADPH oxydase phagocytaire

Kathy Khoy

► **To cite this version:**

Kathy Khoy. Etiopathologie du TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) : anticorps anti-HLA et NADPH oxydase phagocytaire. Hématologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. <NNT : 2016GREAV041>. <tel-01690690>

**HAL Id: tel-01690690**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01690690>**

Submitted on 23 Jan 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **VIROLOGIE MICROBIOLOGIE IMMUNOLOGIE**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Kathy KHOY**

Thèse dirigée par **Marie-Hélène PACLET**

codirigée par **Christian DROUET**

coendradrée par **Brigitte LE MAUFF**

préparée au sein du **Laboratoire GREPI EA 7408 Université  
Grenoble Alpes**

dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## **Etiopathologie du TRALI (« *Transfusion-Related Acute Lung Injury* »): Anticorps anti-HLA et NADPH oxydase phagocytaire**

Thèse soutenue publiquement le **19 Décembre 2016**,  
Devant le jury composé de :

**Pr Philippe ZAOUI**

PU-PH, CHU Grenoble Alpes (Président)

**Dr Olivier TOUTIRAIS**

MCU-PH, CHU Caen (Rapporteur)

**Dr Jamel EL BENNA**

DR CNRS, Faculté de médecine Xavier Bichat (Rapporteur)

**Pr Pierre TIBERGHEN**

PU-PH, EFS de Besançon (Membre)

**Pr Christian DROUET**

PU, PH, Université Grenoble Alpes (Membre)

**Dr Marie-Hélène PACLET**

MCU-PH, CHU Grenoble Alpes (Membre)





## **Remerciements**

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire sous la direction du Dr Marie-Hélène Paclet. C'est bien évidemment à toi Marie-Hélène que reviennent mes premiers remerciements : je te remercie infiniment pour ta patience, ta grande disponibilité et ta gentillesse légendaire. Merci de m'avoir supportée pendant tout ce temps et de m'avoir vue grandir (un peu) « intellectuellement ».

Je remercie le Pr Christian Drouet de m'avoir accueillie à mes tous débuts et de m'avoir laissé le temps de faire mes preuves au GREPI.

Je tiens à exprimer ma très vive reconnaissance au Pr Brigitte Le Mauff de m'avoir accueillie avec bienveillance au laboratoire d'immunologie du CHU de Caen. Merci pour la confiance que tu as su m'accorder.

Je tiens à remercier le Pr Philippe Zaoui de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma Thèse de Science. Je remercie très sincèrement le Dr Olivier Toutirais et le Dr Jamel El Benna d'avoir accepté la charge d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je leur suis reconnaissante du privilège qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail. Je tiens à remercier le Pr. Pierre Tiberghien pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'être membre du jury de thèse.

Je remercie tous les gens qui ont collaboré de près ou de loin à ce travail.

Un immense merci aux membres du laboratoire HLA: biologistes, techniciens et secrétaires, pour tout ce que j'ai pu apprendre de vous et des techniques du laboratoire ! Je voulais remercier tout particulièrement le Dr Dominique Masson : merci de m'avoir fait partager ton savoir et ta passion du HLA. Tu fais partie de mes plus belles rencontres grenobloises.

Je remercie l'ensemble des membres du GREPI. Merci aux belles jeunes filles qui sont maintenant parties : Sophie, Clara, Pauline, Manon pour les moments d'intenses rigolades qui m'ont (très) souvent fait perdre mon sérieux. Merci aux moins jeunes mais pas moins beaux qui sont toujours présents : Aurélie (mon coup de cœur/foudre), Chuong, Bertrand, Bernard, Arije, Habib. Chacun de vous a donné un sens à ma vie de chercheuse au quotidien. Tout ce que j'ai appris à vos côtés, scientifiquement comme amicalement, ne peut être traduit par des mots...

A tous les membres du laboratoire d'immunologie du CHU de Caen avec qui je prends plaisir à travailler tous les jours en profitant de ma nouvelle vie caennaise !

Merci au CHU de Grenoble et à l'Université de Caen Normandie pour leur soutien financier.



A mes amis,

que j'ai rencontrés depuis le banc de l'école à mon internat de pharmacie (dans l'ordre chronologique) : Laurence, Olivier, Anne-Sophie, Laura, Charlotte, Camille, Marie-Christine, Julie, Maud, Anaïs, Anne, Anne-Cécile, Pascaline, Mélanie, Sara, Camille, Pauline, Delphine, Emmanuel... Vous êtes indispensables à ma vie...

A ma famille,

mes parents et mes sœurs : vous n'imaginez pas tout l'amour que j'ai pour vous !  
mes beaux-parents, mes beaux-frères et mes magnifiques neveux et nièces.

A Minh

*Je dédie ce travail à mes parents...*



<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>16</b>

## Premier chapitre

### **Produit sanguin labile : le médicament de la transfusion sanguine**

<b>I L'activité transfusionnelle .....</b>	<b>16</b>
I.1 Définition de la transfusion sanguine .....	16
I.2 Les indications de la transfusion sanguine .....	17
I.2.1 Qui peut donner ? .....	17
I.2.2 Les indications des produits sanguins labiles.....	19
I.2.3 Les pathologies soignées grâce au don du sang .....	21
I.2.4 Les réserves en produit sanguin labile.....	22
I.3 La Sécurisation du don.....	22
I.3.1 Le prélèvement.....	23
I.3.2 La préparation et transformation .....	23
I.3.3 La qualification biologique du don (QBD).....	23
I.3.4 La distribution et délivrance .....	24
<b>II Les accidents transfusionnels.....</b>	<b>25</b>
II.1 L'hémovigilance .....	25
II.2 Les effets indésirables et les incidents déclarés.....	26
II.2.1 Les Effets indésirables du Receveur (EIR).....	26
II.2.2 Les incidents graves de la chaîne transfusionnelle (IG).....	27
II.2.3 Les effets indésirables graves du donneur (EIGD) .....	27
II.2.4 L'incident post-don (IPD).....	27
II.2.5 L'évolution du nombre de TRALI déclaré de 2000 à 2014 .....	28

## Deuxième chapitre

### **Le TRALI ("Transfusion-related Acute Lung Injury")**

<b>I Du diagnostic.....</b>	<b>30</b>
I.1 Epidémiologie.....	30

I.2	Diagnostic clinique .....	31
I.3	Les produits sanguins mis en cause.....	33
I.4	Le diagnostic différentiel du TRALI.....	34
I.4.1	L'œdème pulmonaire aigu de surcharge.....	34
I.4.2	Le choc anaphylactique post-transfusionnel .....	34
I.4.3	Le choc toxi-infectieux .....	34
I.4.4	Le choc hémolytique par incompatibilité ABO .....	34
I.5	Evolution et traitement.....	35
<b>II</b>	<b>... A la prévention.....</b>	<b>35</b>
II.1	Etiopathogénie du TRALI .....	35
II.2	Relation entre le produit sanguin transfusé et le TRALI.....	36
II.2.1	Le conflit non immunologique.....	36
II.2.1.1	Les lipides activateurs .....	36
II.2.1.2	Les autres facteurs non spécifiques.....	36
II.2.1.3	Le conflit immunologique .....	37
II.2.1.3.1	Les anticorps anti-HLA.....	37
II.2.1.3.2	Les anticorps anti-HNA .....	37
II.3	Le mécanisme du TRALI : hypothèses physiopathologiques.....	38
II.3.1	Mécanisme en une étape .....	38
II.3.2	Mécanisme en deux étapes.....	39
II.3.3	Un cas particulier : le TRALI inversé .....	41
II.4	Les modèles expérimentaux.....	42
II.5	Stratégies et prévention mises en place pour prévenir du risque de TRALI.....	43
II.5.1	La déleucocytation .....	43
II.5.2	La déplasmatisation .....	43
II.5.3	Eviction des donneurs impliqués et/ou à risque dans le déclenchement du TRALI chez le receveur.....	43

### Troisième chapitre

#### **Les acteurs principaux dans la survenue du TRALI**

<b>I</b>	<b>Le système HLA .....</b>	<b>44</b>
I.1	Généralités.....	44
I.2	Génétique du système HLA.....	44
I.3	Structure générale des molécules HLA .....	47
I.3.1	Molécules HLA de classe I.....	47
I.3.1.1	Structure.....	47

I.3.1.2	Fonctions et localisation des molécules HLA de classe I .....	48
I.3.2	Molécules HLA de classe II.....	48
I.3.2.1	Structure.....	48
I.3.2.2	Fonctions et localisation des molécules HLA de classe II .....	49
I.4	Typage et nomenclature HLA.....	50
I.5	L'allo-immunisation HLA.....	51
I.5.1	Structure, propriétés et fonction des immunoglobulines .....	52
I.5.1.1	Généralités .....	52
I.5.1.2	Structure des immunoglobulines.....	52
I.5.1.3	Fonction des immunoglobulines.....	54
I.6	Etude épidémiologique de l'engagement des anticorps anti-HLA dans la survenue du TRALI.....	55
I.6.1	Les anticorps anti-HLA de classe I.....	55
I.6.2	Les anticorps anti-HLA de classe II.....	56
<b>II</b>	<b>Les cellules endothéliales et les polynucléaires neutrophiles : cellules-clé dans la physiopathologie du TRALI.....</b>	<b>57</b>
II.1	L'endothélium.....	57
II.1.1	Origine des cellules endothéliales .....	57
II.1.2	Propriétés des cellules endothéliales .....	57
II.1.3	Fonctions des cellules endothéliales .....	57
II.1.3.1	Barrière de perméabilité sélective.....	58
II.1.3.2	Action anti-adhésive et adhésive .....	58
II.1.3.3	Rôle dans l'homéostasie vasculaire : action anti-trombotique et thrombotique.....	59
II.1.4	La dysfonction endothéliale : impact des ROS .....	60
II.1.5	Perméabilité endothéliale .....	61
II.1.5.1	La voie transcellulaire. ....	61
II.1.5.2	La voie paracellulaire.....	61
II.1.6	Jonctions intercellulaires endothéliales .....	61
II.1.6.1	Les jonctions serrées.....	62
II.1.6.2	Les jonctions communicantes.....	62
II.1.6.3	Les jonctions adhérentes et les desmosomes.....	63
II.1.6.4	Lumière sur la Ve-Cadherine : marqueur de la perméabilité endothéliale ...	63
II.2	Le polynucléaire neutrophile.....	66
II.2.1	Généralités.....	66
II.2.2	La granulopoïèse .....	66

II.2.3	La migration du neutrophile .....	68
II.2.3.1	En condition physiologique .....	68
II.2.3.2	En condition d'inflammation .....	68
II.2.4	Les fonctions anti-infectieuses des neutrophiles.....	70
II.2.4.1	La phagocytose .....	70
II.2.4.1.1	Processus de phagocytose .....	70
II.2.4.1.2	Les récepteurs Fc des neutrophiles .....	72
II.2.4.1.2.1	Généralités .....	72
II.2.4.1.2.2	Récepteurs Fcy .....	73
II.2.4.2	La dégranulation.....	75
II.2.4.3	L'explosion respiratoire.....	77
II.2.5	Fonctions sécrétoires des PMN.....	77
<b>III</b>	<b>Les NADPH oxydases .....</b>	<b>79</b>
III.1	Structure de la NADPH Oxydase.....	79
III.1.1	Les isoformes de la NADPH oxydase.....	79
III.2	Distribution tissulaire des Nox .....	81
III.2.1	La NADPH oxydase phagocytaire Nox 2 .....	82
III.2.1.1	La granulomatose septique chronique (CGD) .....	82
III.2.1.2	La NADPH oxydase phagocytaire.....	83
III.2.1.2.1	Le complexe membranaire : le flavocytochrome b <sub>558</sub> .....	83
III.2.1.2.1.1	Nox2 ou gp91phox .....	83
III.2.1.2.1.2	La sous-unité p22 <sup>phox</sup> .....	84
III.2.1.2.2	Les facteurs cytosoliques .....	84
III.2.1.2.2.1	Sous-unités p47phox .....	84
III.2.1.2.2.2	Sous-unités p67phox .....	85
III.2.1.2.2.3	Sous unité p40phox .....	85
III.2.1.3	Protéine Rac.....	86
III.2.1.4	La protéine Rap1A.....	86
III.2.2	L'activation de Nox2 dans les neutrophiles.....	87
III.2.2.1	« Priming » des PMN : la préactivation de la NADPH oxydase .....	87
III.2.2.2	Mécanismes d'activation de la NADPH oxydase.....	87
III.2.2.2.1	Voies d'activation par le PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate .....	88
III.2.2.2.2	Voies d'activation par le formyl Méthyl-Leucyl-Phénylalanine (fMLP) ...	89
III.2.2.2.3	Voies d'activation par le lipopolysaccharide (LPS) .....	91
III.2.3	Régulation de la NADPH oxydase par compartimentation membranaire .....	92
III.2.4	Le processus de transfert d'électrons par le cytochrome b558 .....	93

<b>IV</b>	<b>Rôle des ROS dans l'éthiopathogénie du TRALI.....</b>	<b>94</b>
IV.1	Les ROS : formes réactives de l'oxygène.....	94
IV.2	Principales sources de génération des ROS .....	95
IV.2.1	La mitochondrie .....	95
IV.2.2	Le système acellulaire Xanthine/Xanthine oxydase .....	95
IV.2.3	Le monoxyde d'azote synthase .....	96
IV.2.4	Les NADPH Oxydases .....	96
	<b>ARGUMENTAIRE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>97</b>
	<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>98</b>
<b>I</b>	<b>Typage HLA .....</b>	<b>98</b>
I.1	Technique de Sérologie : la lymphocytotoxicité complément-dépendante (LCT) ...	98
I.1.1	Principe de la lymphocytotoxicité-complément dépendante .....	98
I.1.2	Protocole de la LCT .....	99
I.2	Technique de biologie moléculaire : Sequence-Based-Typing (SBT) .....	100
I.2.1	Extraction d'ADN génomique.....	101
I.2.2	Principe de la Sequencing Based Typing (SBT).....	101
I.2.2.1	Amplification des gènes HLA par PCR pour la méthode SBT .....	102
I.2.2.2	Contrôle d'amplification par migration sur gel d'agarose .....	103
I.2.2.3	Purification des produits d'amplifications .....	103
I.2.2.4	Réaction de séquençage .....	104
I.2.2.5	Purification des produits des réactions de séquence obtenues.....	105
I.2.2.6	Séparation des séquences par électrophorèse capillaire .....	106
<b>II</b>	<b>Dépistage et Recherche d'anticorps anti-HLA .....</b>	<b>107</b>
II.1	Dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™ .....	107
II.1.1	Principe de la technique Luminex™ .....	107
II.1.2	Protocole de la technique Luminex™ .....	108
II.2	Recherche d'anticorps anti-HLA par la Lymphocytotoxicité-complément dépendante : technique de référence .....	109
II.3	Sélection des sérums dans l'étude .....	110
II.3.1	Sélection des sérums ne présentant pas d'anticorps anti-HLA .....	110
II.3.2	Sélection des sérums présentant des anticorps anti-HLA-A2 .....	110
<b>III</b>	<b>Traitement préalable des PMN.....</b>	<b>111</b>
<b>IV</b>	<b>Analyse protéique .....</b>	<b>112</b>



IV.1	Western-Blot .....	112
IV.1.1	Préparation des fractions membranaires .....	112
IV.1.2	Transfert des protéines .....	112
IV.1.3	Immunodétection des protéines par des anticorps .....	113
IV.2	Cytométrie en flux (FACS).....	113
IV.2.1	La cytométrie en flux : principe .....	113
IV.2.2	Marquage des neutrophiles et de la lignée endothéliale EA.hy926.....	114
IV.2.2.1	Expression de Nox2, de l'antigène HLA-A2 et des récepteurs Fc $\gamma$ des neutrophiles .....	114
IV.2.2.2	Marquage des cellules endothéliales EA.Hy926.....	114
IV.2.2.2.1	Perméabilisation des cellules .....	114
IV.2.2.2.2	Immunomarquage de Nox2 et Nox4.....	115
IV.2.3	Analyse du marquage par cytométrie en flux.....	115
<b>V Analyse de l'ARNm des NADPH oxydases par RT-PCR.....</b>		<b>115</b>
V.1	Extraction des ARN totaux des cellules endothéliales.....	115
V.2	Transcription inverse (RT) : production d'ADNc.....	116
V.3	Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	116
V.4	Séparation électrophorétique sur gel d'agarose des acides nucléiques.....	117
<b>VI Mesure des activités NADPH oxydases .....</b>		<b>1158</b>
VI.1	Mesure de l'activité NADPH oxydase par fluorimétrie (Amplex® Red) .....	118
VI.1.1	Principe de l'Amplex® Red.....	118
VI.1.2	Mesure de l'activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale EA.hy926 ...	118
VI.2	Mesure de l'activité NADPH oxydase par chimioluminescence .....	119
VI.2.1	Principe de la chimioluminescence.....	119
VI.2.2	Mesure de l'activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale EA.hy926...	119
VI.2.3	Mesure de l'activité NADPH oxydase des neutrophiles .....	120
<b>VII Couplage covalent des récepteurs Fc<math>\gamma</math> des PMN aux immunoglobulines G .....</b>		<b>120</b>
VII.1	Couplage des IgG avec la Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC) .....	121
VII.2	Evaluation de la concentration d'IgG saturant tous les récepteurs Fc $\gamma$ des PMN	121
VII.3	Couplage covalent des IgG aux PMN par le Bis-sulfosuccinimidyl suberate (BS <sup>3</sup> )	122

VII.3.1	Rôle du BS <sup>3</sup> .....	122
VII.3.2	Analyse du blocage des récepteurs Fc $\gamma$ des PMN par cytométrie en flux.....	123
<b>RESULTATS.....</b>		<b>124</b>
<b>Premier chapitre</b>		<b>125</b>
<b>Activation des neutrophiles par les anticorps anti-HLA-A2 et conséquence sur l'endothélium</b>		
<b>Article en révision: " <i>Transfusion-related Acute Lung Injury: critical neutrophil activation by anti-HLA-A2 antibodies for endothelial permeability</i>".....</b>		<b>126</b>
<b>Résultats supplémentaires.....</b>		<b>155</b>
<b>I</b>	<b>Les outils de travail : sélection des sérums et des cellules.....</b>	<b>156</b>
I.1	Du dépistage des anticorps anti-HLA à leur purification .....	156
I.1.1	Dépistage et recherche d'anticorps anti-HLA .....	156
I.1.2	Purification des immunoglobulines G à partir des sérums.....	160
I.2	Identification des antigènes HLA : phénotypage HLA des donneurs.....	161
<b>II</b>	<b>Article Transfusion : Impact des anticorps anti-HLA sur l'activation des neutrophiles après priming par le LPS.....</b>	<b>165</b>
II.1	Mesure de l'activité oxydase des neutrophiles sensibilisés avec le LPS.....	165
II.2	Mesure de l'activité oxydase des neutrophiles sensibilisés par le LPS en présence d'immunoglobulines G.....	166
<b>III</b>	<b>Caractérisation des NADPH oxydases de la lignée endothéliales EA.Hy926 .</b>	<b>168</b>
III.1	Mise en évidence de l'ARNm des NADPH oxydases.....	168
III.2	Mise en évidence de l'expression protéique des NADPH oxydases .....	169
III.2.1	Mise en évidence de l'expression de Nox2.....	169
III.2.2	Mise en évidence de l'expression de Nox4.....	170
III.3	Etude de l'activité NADPH oxydase de lignée endothéliale EA.hy926 induites par le TNF $\alpha$ .....	172
III.3.1	Mesure de l'activité NADPH oxydase par chimioluminescence .....	172
III.3.2	Mesure de l'activité NADPH oxydase par fluorescence .....	174

<b><u>Deuxième chapitre</u></b>	<b>176</b>
<b>Mécanismes d'activation des neutrophiles par les anticorps anti-HLA</b>	
<b>I Analyse des cibles des anticorps anti-HLA sur le neutrophile au repos..</b>	<b>178</b>
I.1 Les antigènes HLA-A2 des neutrophiles.....	178
I.2 Les récepteurs Fc des neutrophiles.....	179
<b>II Effet du « priming » des PMN sur la fixation des IgG HLA-A2 .....</b>	<b>180</b>
II.1 Expression de l'antigène HLA-A2 sur les PMN « primés » .....	180
II.2 Expression des récepteurs Fc $\gamma$ sur les PMN « primés ».....	181
<b>III Effet de l'activation des PMN par les IgG HLA-A2.....</b>	<b>182</b>
III.1 Expression des récepteurs Fc $\gamma$ sur les PMN « primés » puis activés par les IgG	182
III.2 Expression membranaire de Nox2 .....	184
<b>IV Impact des radeaux lipidiques sur les mécanismes d'activation des PMN</b>	
.....	<b>186</b>
Effet de la déplétion des radeaux lipidiques .....	186
IV.1 Effet de la déplétion des radeaux lipidiques sur l'expression des récepteurs Fc $\gamma$ , de l'antigène HLA-A2 et Nox2 .....	186
IV.2 Effet sur l'activité NADPH oxydase.....	189
<b>V Etude de l'activation de la NADPH oxydase en présence d'anticorps monoclonaux anti-HLA purifiés .....</b>	<b>191</b>
V.1 Validation des deux anticorps monoclonaux.....	192
V.2 Effet des anticorps monoclonaux anti-HLA sur l'activation des PMN HLA-A2.....	192
V.2.1 Effet de l'anticorps monoclonal murin anti-HLA-A2.....	192
V.2.2 Effet de la combinaison des IgG HLA (-) humaines avec les anticorps monoclonaux murins anti-HLA .....	194
V.2.3 Effet de la combinaison des IgG HLA-A2 humaines avec les anticorps monoclonaux murins anti-HLA .....	196
<b>VI Blocage des récepteurs Fc<math>\gamma</math> .....</b>	<b>197</b>
VI.1 Blocage des récepteurs Fc $\gamma$ par le marquage des PMN avec des IgG couplées au FITC.....	197
VI.2 Blocage des récepteurs Fc $\gamma$ par le couplage covalent avec des anticorps anti-récepteur Fc $\gamma$ par le Bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS <sup>3</sup> ).....	199

<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>202</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>216</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>239</b>

## Table des figures et tableaux

### FIGURES

<b>Figure 1.</b> Evolution du nombre de TRALI d'imputabilité 2 et 3 entre 2000 et 2012.	28
<b>Figure 2.</b> Radiographie du thorax chez deux patients présentant un TRALI.	31
<b>Figure 3.</b> Facteurs entrant en jeu dans la survenue du TRALI.	41
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique des gènes HLA.	45
<b>Figure 5.</b> Nombre d'allèles et de protéines pour chaque gène HLA expliquant le polymorphisme du système HLA.	46
<b>Figure 6.</b> Représentation des molécules HLA de classe I.	47
<b>Figure 7.</b> Représentation des molécules HLA de classe II.	49
<b>Figure 8.</b> La nomenclature HLA.	50
<b>Figure 9.</b> Structure d'une immunoglobuline G.	53
<b>Figure 10.</b> L'action anti-thrombotique et thrombotique des cellules endothéliales.	60
<b>Figure 11.</b> Illustration des jonctions intercellulaires de l'endothélium.	62
<b>Figure 12.</b> Illustration de la VE-cadherine des jonctions adhérences des cellules endothéliales.	64
<b>Figure 13.</b> Sites de phosphorylation de la Ve-cadherine des jonctions adhérentes endothéliales.	65
<b>Figure 14.</b> Illustration d'un polynucléaire neutrophile par examen microscopique	66
<b>Figure 15.</b> La granulopoïèse du polynucléaire neutrophile.	67
<b>Figure 16.</b> La migration trans-endothéliale du neutrophile vers les tissus.	69
<b>Figure 17.</b> Récepteurs impliqués dans la phagocytose du pathogène.	71
<b>Figure 18.</b> Voies de signalisation des récepteurs Fc à motif ITAM et ITIM.	74
<b>Figure 19.</b> Les granules des neutrophiles.	76
<b>Figure 20.</b> Les sept isoformes de la NADPH oxydase.	80
<b>Figure 21.</b> Domaines structuraux de Nox2.	84
<b>Figure 22.</b> Domaines structuraux du facteur cytosolique p40phox de la NADPH oxydase.	85
<b>Figure 23.</b> Domaines structuraux du facteur cytosolique p67phox de la NADPH oxydase.	85
<b>Figure 24.</b> Domaines structuraux du facteur cytosolique p40phox de la NADPH oxydase.	86
<b>Figure 25.</b> Activation de la NADPH oxydase.	88
<b>Figure 26.</b> Voies d'activation de la NADPH oxydase par le PMA.	89
<b>Figure 27.</b> Voie d'activation de la NADPH oxydase par le fMLP.	90
<b>Figure 28.</b> Schéma d'un radeau lipidique.	92
<b>Figure 29.</b> Processus de transfert d'électrons par le cytochrome b558.	93
<b>Figure 30.</b> Réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde.	94

<b>Figure 31.</b> La technique de lymphocytotoxicité complément dépendante.	99
<b>Figure 32.</b> Grille d'évaluation de la lymphocytotoxicité, selon les recommandations de l'ASHI.	100
<b>Figure 33.</b> Exemple du résultat de la séquence obtenue par le séquenceur 3730 ABI Prism.	106
<b>Figure 34.</b> Le dépistage ou la recherche d'anticorps anti-HLA par la technologie Luminex™.	108
<b>Figure 35.</b> Exemple d'un résultat de dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™.	109
<b>Figure 36.</b> Logigramme de sélection des sérums de l'étude.	111
<b>Figure 37.</b> Mesure de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> extracellulaire par Amplex® Red.	118
<b>Figure 38.</b> Principe de la réaction par chimioluminescence.	119
<b>Figure 39.</b> Expérience de fixation par fluorimétrie.	122
<b>Figure 40.</b> Structure chimique du Bis-sulfosuccinimidyl suberate (BS <sup>3</sup> ) comme agent de réticulation.	122
<b>Figure 41.</b> Le dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™.	156
<b>Figure 42.</b> Absence d'anticorps anti-HLA par la technique de lymphocytotoxicité.	158
<b>Figure 43.</b> Présence d'anticorps anti-HLA-A2 par la technique de lymphocytotoxicité.	159
<b>Figure 44.</b> Purification des Immunoglobulines G.	160
<b>Figure 45.</b> Contrôle de l'amplification des exons 2, 3 et 4 des gènes HLA du locus A sur gel d'agarose 1%.	161
<b>Figure 46.</b> Résultat du séquençage de l'exon 2 sous forme d'électrophorégramme.	163
<b>Figure 47.</b> Activité oxydase des PMN stimulés par le LPS.	166
<b>Figure 48.</b> Effet des IgG sur l'activité oxydase des PMN préalablement stimulés par le LPS.	167
<b>Figure 49.</b> Expression de l'ARNm des NADPH oxydases dans la lignée endothéliale EA.hy926.	169
<b>Figure 50.</b> Mise en évidence de l'expression de Nox2 de la lignée endothéliale EA.hy926.	170
<b>Figure 51.</b> Mise en évidence de l'expression de Nox4 de la lignée endothéliale EA.hy926 par cytométrie en flux.	171
<b>Figure 52.</b> Mise en évidence de l'expression de Nox4 de la lignée endothéliale EA.hy926 par western-blot.	172
<b>Figure 53.</b> Activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale EA.hy926 par chimioluminescence.	173
<b>Figure 54.</b> Activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale EA.hy926 par fluorimétrie (Amplex®Red).	175

<b>Figure 55.</b> Fixation des IgG à la surface des PMN HLA-A2.	177
<b>Figure 56.</b> Expression de l'antigène HLA-A2 à la membrane plasmique des PMN HLA non A2 et des PMN HLA-A2.	178
<b>Figure 57.</b> Expression des récepteurs Fcγ (FcγRI, FcγRII et FcγRIII) à la membrane plasmique des PMN à l'état basal.	179
<b>Figure 58.</b> Expression de l'antigène HLA-A2 à la surface des PMN HLA-A2 en condition de priming.	180
<b>Figure 59.</b> Expression des récepteurs Fcγ (FcγRI, FcγRII et FcγRIII) à la membrane plasmique des PMN primés.	181
<b>Figure 60.</b> Induction du récepteur FcγRI (CD64) des PMN par l'IFNγ.	182
<b>Figure 61.</b> Expression des récepteurs Fcγ (FcγRI, FcγRII et FcγRIII) à la membrane plasmique des PMN HLA-A2 activés par les IgG.	183
<b>Figure 62.</b> Expression de Nox2 des neutrophiles.	184
<b>Figure 63.</b> Expression de Nox2 à la membrane plasmique des PMN HLA-A2 activés par les IgG.	185
<b>Figure 64.</b> Effet de la déplétion des radeaux lipidiques sur l'expression des sites antigéniques HLA-A2, de Nox2 et de récepteurs Fc des PMN HLA-A2.	187
<b>Figure 65.</b> Effet de la déplétion des radeaux lipidiques sur la fixation des IgG HLA (-) et des IgG HLA-A2 à la surface des PMN HLA-A2.	188
<b>Figure 66.</b> Effet de la déplétion des radeaux lipidiques sur l'activation des PMN HLA-A2.	190
<b>Figure 67.</b> Expression de l'antigène HLA-A2 à la membrane plasmique des PMN HLA-A2.	192
<b>Figure 68.</b> Comparaison de l'activité oxydase des PMN HLA-A2 après stimulation par les IgG HLA-A2 humains et l'anticorps monoclonal anti-HLA-A2.	193
<b>Figure 69.</b> Activité NADPH oxydase des PMN HLA-A2 primés par le fMLP, après stimulation par les anticorps monoclonaux murins anti-HLA (BB7.2 et W6/32).	194
<b>Figure 70.</b> Activité oxydase des PMN HLA-A2 primés par le fMLP, après stimulation par les IgG HLA-A2 ou les anticorps monoclonaux (BB7.2 et W6/32).	195
<b>Figure 71.</b> Etude des conditions optimales du blocage des récepteurs Fcγ des PMN par des IgG couplées au FITC.	198
<b>Figure 72.</b> Blocage du récepteur FcγRII après traitement par le Bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS <sup>3</sup> ).	200
<b>Figure 73.</b> Etude du marquage des IgG et des antigènes HLA-A2 à la membrane plasmique des PMN HLA-A2 après traitement avec le BS <sup>3</sup> .	201
<b>Figure 74.</b> Modèle de l'activation de la NADPH oxydase des PMN par les anticorps anti-HLA-A2 dans les radeaux lipidiques.	211

**TABLEAUX**

<b>Tableau 1.</b> Récapitulatif de la durée du prélèvement et du nombre de dons autorisés par an.	18
<b>Tableau 2.</b> Les contre-indications au don.	18
<b>Tableau 3.</b> Répartition des effets indésirables du receveur selon leur délai d'apparition.	26
<b>Tableau 4.</b> Appréciation de l'EIR selon le grade de sévérité et le niveau d'imputabilité.	26
<b>Tableau 5.</b> Critères de l'ALI selon la conférence de consensus Américano-Européenne de 1994.	32
<b>Tableau 6.</b> Critères du TRALI selon la conférence de consensus canadienne de 2004.	32
<b>Tableau 7.</b> Incidence du TRALI selon les produits sanguins transfusés.	33
<b>Tableau 8:</b> Le système HNA (Human Neutrophil Antigen).	37
<b>Tableau 9.</b> Situations favorisant la survenue du TRALI.	40
<b>Tableau 10.</b> Données expérimentales contribuant à une meilleure connaissance physiopathologique dans la survenue du TRALI.	42
<b>Tableau 11.</b> Illustration des isoformes de récepteurs Fc.	73
<b>Tableau 12.</b> Les formes génétiques de la granulomatose chronique septique et leur fréquence.	82
<b>Tableau 13.</b> Mélange réactionnel pour l'amplification des gènes HLA par PCR.	102
<b>Tableau 14.</b> Programme d'amplification de l'ADN génomique par PCR.	103
<b>Tableau 15.</b> Programme de purification des produits de PCR.	104
<b>Tableau 16.</b> Mélange réactionnel pour le séquençage des gènes HLA par PCR.	104
<b>Tableau 17.</b> Amorces de séquences AlleleSEQR® HLA-A pour l'amplification et le séquençage du locus HLA-A.	105
<b>Tableau 18.</b> Programme d'amplification pour le séquençage.	105
<b>Tableau 19.</b> Couples d'amorces utilisés pour les amplifications avec leur séquence, leur température d'hybridation et la taille du fragment d'ADN amplifié.	117
<b>Tableau 20.</b> Récapitulatif des étapes de sélection des sérums.	161
<b>Tableau 21.</b> Acronymes utilisés pour les PMN de cette étude.	164



## LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide arachidonique
Acmo	Anticorps monoclonal
ADCC	Cytotoxicité dépendante des anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
ANSM	Agence française de la sécurité sanitaire des produits de santé (anciennement AFSSAPS)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BS3	bis sulfosuccinimidyl suberate
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CDC	Cytotoxicité dépendante du complément
CD	Cluster de différenciation
CE	Cellule endothéliale
CGR	Concentré de Globules Rouges
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPS	Concentré Plaquettaire Standard
CTSA	Centre de Transfusion Sanguine des Armées
DAG	Diacylglycérol
DFP	Diisopropyl fluorophosphate
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMF	Diméthylformamide
DPI	Diphényliodonium
DUOX	Dual oxidase
EFS	Etablissement Français du Sang
EIGD	Effet Indésirable Grave du Donneur
EIR	Effet Indésirable du Receveur
ELISA	Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
F'ab	Fragment antigen binding
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FC	Fragment cristallisable
fMLP	formyl-methyl-Leu-Phe
FT	Facteur Tissulaire
GPI	Groupement phosphosylphosphatidylinositol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HLA	Human Leukocyte Antigen
HNA	Human Neutrophil Antigen
HO	Hème Oxygénase
HRPO	Horse Radish Peroxidase
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IG	Incident Grave de la chaîne transfusionnelle
Ig	Immunoglobuline
IL-1 $\beta$	Interleukine-1beta
IP3	Inositol-3-phosphate
IPD	Incident Post Don
ITAM	Immunoreceptor-based Tyrosin Activator Motif
ITIM	Immunoreceptor-based Tyrosin Inhibitor Motif
LCT	Lymphocytotoxicité-complément Dépendante
LFB	Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies
Lyso-PC	Lysophosphatidylcholine

kDa	Kilodaltons
KO	Knock out
LPB	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
mAb	monoclonal Antibody
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDS	Médicaments Dérivés du Sang
MEC	Matrice Extracellulaire
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NK	Natural Killer
Nox	NADPH oxydase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
OH <sup>•</sup>	Radical hydroxyle
PAI	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PB	Paire de base
PBS	Tampon phosphate isotonique « Phosphate Buffer Saline »
PCR	Polymerase chain reaction
PFC	Plasma Frais Congelé
Phox	Phagocyte Oxidase
PKC	Protéine Kinase C
PLA2/C/D	Phospholipase A2/C/D
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	Polymorphonuclear neutrophil
PSL	Produit Sanguin Labile
QBD	Qualité Biologique du Don
RLU	Relative luminescence unit
RFU	Relative fluorescence unit
ROS	Reactive Oxygen Species
SBT	Sequencing Based Typing
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel polyacrylamide en présence de SDS
SSO	Sequence Specific Oligonucleotide
SSP	Sequence Specific Primer
SOD	Superoxyde dismutase
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TACO	Transfusion-Associated Circulatory Overloaded
TCA	Temps de Céphaline Activé
TAE	Tampon Tris, Acétate, EDTA
TGF-β	Transforming growth factor beta
TLR4	Toll-like récepteur 4
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TRALI	Transfusion-Related Acute Lung Injury
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
WT	Wild type ou sauvage
XO	Xanthine Oxydase



# **INTRODUCTION GENERALE**



# INTRODUCTION GENERALE

L'introduction générale de ce travail est une revue générale de la littérature. Elle se compose de trois chapitres :

- **Premier chapitre** : Le produit sanguin labile : le médicament de la transfusion sanguine
- **Deuxième chapitre** : L'histoire du TRALI (« *Transfusion-related Acute Lung Injury* »)
- **Troisième chapitre** : Les acteurs principaux dans la survenue du TRALI



## **PREMIER CHAPITRE**

### **PRODUIT SANGUIN LABILE : LE MEDICAMENT DE LA TRANSFUSION SANGUINE**

#### **I. L'activité transfusionnelle**

##### **I.1 Définition de la transfusion sanguine**

La transfusion sanguine est définie par l'administration de l'un des composants issus du sang d'un donneur vivant humain : globules rouges, plaquettes, globules blancs et plasma. Ils sont appelés produits sanguins labiles (PSL) car ils ont tous une durée de vie limitée. La transfusion sanguine représente une thérapeutique substitutive indispensable car il n'existe pas de produit capable de se substituer complètement au sang humain. Les PSL provenant d'un ou plusieurs sujets appelés « donneurs » vont être administrés à un ou plusieurs patients appelés « receveurs ». Les PSL proviennent de dons de sang effectués sur un site de prélèvement spécialement dédié. En France, il existe environ 150 sites de prélèvements et 40.000 collectes mobiles sont organisées chaque année sur l'ensemble du territoire. La mise à disposition des produits doit obligatoirement se référer aux principes de bonnes pratiques de transfusion définis par la décision du 6 novembre 2006 : le prélèvement, la préparation, la qualification biologique ainsi que la sécurisation des PSL répondant à ces principes, valident la sécurité de leur distribution après prescription médicale par les sites transfusionnels dont fait partie l'Etablissement Français du Sang (EFS).

Chaque année, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) publie les données nationales de l'activité transfusionnelle sous forme de rapport. Le dernier rapport mis en ligne à ce jour concerne les données de 2014. En France, environ 3 millions de PSL sont transfusés chaque année à plus de 570 000 malades (Rapport d'hémovigilance, 2014). Selon la loi du 4 janvier 1993 (CSP 1993), le don de sang en France est bénévole, volontaire, anonyme et sans profit (Ferguson et al. 2008). Le respect des bonnes pratiques de transfusion est sous la responsabilité de deux organismes : l'EFS et le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA).

Depuis sa création au 1<sup>er</sup> janvier 2000, l'EFS est un établissement public sous autorité du Ministère de la Santé. Il est chargé de veiller à satisfaire les besoins en PSL et à l'adaptation de l'activité transfusionnelle aux évolutions médicales, scientifiques et technologiques dans le respect des principes éthiques. Il approvisionne le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) en plasma, matière première nécessaire pour la production des médicaments dérivés du sang (MDS) tels que l'albumine, les facteurs de coagulation et les



immunoglobulines. A l'inverse des PSL issus directement du don, les MDS permettent la production de produits stables.

Le CTSA est un organisme du Service de Santé des Armées sous autorité du Ministère de la Défense. Sa mission prioritaire est l'approvisionnement en sang des forces armées en opération. Il collecte le sang dans les établissements du Ministère de la Défense. Il prépare, contrôle et distribue les produits sanguins obtenus.

Il existe 2 types de don :

➤ **Le don de sang total**

Il correspond au prélèvement de sang veineux (7 ml/kg) dans une poche de recueil et permet la préparation de concentrés de globules rouges (CGR), de concentrés plaquettaires standard (CPS) et d'unité de plasma, encore appelé plasma frais congelé (PFC).

➤ **Le don par aphérèse**

Il permet le prélèvement de tous types de PSL avec l'avantage d'obtenir un produit en plus grande quantité. Il utilise des séparateurs cellulaires automatisés qui, par la centrifugation, assurent la séparation des constituants sanguins. Le plasma, les plaquettes, les granulocytes ou les globules rouges sont recueillis dans une poche de recueil qui sera transfusée alors que les autres éléments sont restitués au donneur.

En 2014, les dons étaient constitués pour 90% de dons de sang total et pour 10% de dons d'aphérèse.

## **I.2 Les indications de la transfusion sanguine**

### **I.2.1 Qui peut donner ?**

Selon la législation française (République française 2016), toute personne en bonne santé, pesant au moins 50 kg et âgée de 18 à 65 ans (plasma et plaquettes) ou 70 ans (sang total) peut donner son sang. La durée de prélèvement pour chaque type de PSL ainsi que le nombre de dons maximum autorisés sont illustrés dans le Tableau 1:

**Tableau 1. Récapitulatif de la durée du prélèvement et du nombre de dons autorisé par an.** Adapté de l'arrêté du 5 avril 2016 fixant les critères de sélection des donneurs de sang. (JORF n°0085 du 10 avril 2016. p.1067 (République française, 2016))

Type de don	Sang total	Plasma Frais Congelé (PFC)	Plaquettes
<b>Durée de prélèvement</b>	10 min	1h30	2h30
<b>Volume maximum prélevé par don</b>	500 ml	750 ml	650 ml
<b>Nombre de dons maximum dans l'année</b>	6 (homme) 4 (femme)	24	12
<b>Intervalle minimum entre 2 dons de même nature</b>	8 semaines	2 semaines	4 semaines

Sur une période de 12 mois, le nombre de dons, tout type confondu doit être inférieur ou égal à 24. Pour chaque don, le donneur fait l'objet d'un entretien médical confidentiel et d'un examen général pour s'assurer que le don ne présente pas de risque ni pour lui ni pour le receveur. Un document de préparation à l'entretien médical est remis à chaque donneur lors de l'enregistrement afin d'éliminer certaines contre-indications (Tableau 2). Une contre-indication est une mesure réglementaire définie sur la base de critères médicaux et épidémiologiques. Elle est temporaire et de courte durée, dans 80% des cas. Cette liste n'est pas exhaustive et fait l'objet de mises à jour régulières. Les situations à risque pour le receveur, mêmes mineures, entraînent systématiquement l'exclusion de l'individu au don. Cette exclusion stricte ne contribue pas à combler le nombre de dons indispensables aux patients en attente de transfusion. En 2014, la France comptait près de 1 500 000 donneurs ce qui représente moins de 4% de la population en âge de faire un don.

**Tableau 2. Les contre-indications au don.** Adapté de l'arrêté du 5 avril 2016 fixant les critères de sélection des donneurs de sang. (JORF n°0085 du 10 avril 2016. p.1067)

Les contre-indications	
Définitives	Temporaires
Infections actives connues comme transmissibles par le sang : hépatites virales, syphilis, VIH, HTLV, maladie de Chagas et paludisme	Traitement endoscopique ou une intervention chirurgicale importante de moins de 4 mois
Traitements suivants : transfusion sanguine, hormone de croissance, greffe de tissu ou d'organe	Séjour de moins de 4 mois dans un pays où sévit le paludisme, la maladie de Chagas, le West Nile virus et le Chikungunya
Séjours dans les îles britanniques de plus d'un an cumulé entre 1980 et 1996	Infection ou traitement antibiotique au moment ou dans les 6 jours qui précèdent le don
Consommation de drogue par voie intraveineuse ou intra musculaire	Soins dentaires ou détartrage au cours des 3 derniers jours
Avoir dans sa famille un membre atteint de la maladie de Creutzfeld-Jacob	Réalisation d'un piercing ou d'un tatouage au cours des 4 derniers mois
Sujets dont le comportement sexuel expose au risque de contracter des maladies infectieuses transmissibles par le sang	Vaccination avec un vaccin vivant atténué dans les 4 dernières semaines (rougeole, rubéole, oreillons, BCG, fièvre jaune)

## I.2.2 Les indications des produits sanguins labiles

Cette partie n'énumère pas toutes indications des PSL à transfuser ; elle préconise la valeur seuil du PSL à partir duquel le patient a besoin d'une transfusion.

### ○ Les globules rouges (CGR)

Ils ont pour fonction de rétablir la capacité d'oxygénation des tissus et participent aux traitements substitutifs de certaines anémies.

La quantité de CGR à transfuser est la quantité minimale pour remonter l'hémoglobine à un niveau acceptable. Cette quantité dépend du taux d'hémoglobine du patient et de la valeur cible souhaitée. Pour augmenter de 1g/dL le taux d'hémoglobine, il faut transfuser approximativement un CGR (une poche) chez l'adulte ou 4 ml/kg de CGR chez l'enfant (Klein et al. 2007). Les valeurs normales du taux d'hémoglobine varient en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique. Elle est en général de 13 à 17 g/dL chez l'homme et de 12 à 16 g/dL chez la femme.

La transfusion de globules rouges est recommandée pour maintenir le taux d'hémoglobine au-dessus de :

- 7 g/dL chez les personnes sans antécédents particuliers (Hebert PC et al. 2014)
- 8-9 g/dL chez les personnes ayant des antécédents cardio-vasculaires
- 10 g/dL chez les personnes ne tolérant pas cliniquement les concentrations inférieures, atteintes d'insuffisance coronaire aiguë ou d'insuffisance cardiaque avérée.

Au-delà de 10 g/dL, il n'y a pas d'indication de transfusion de CGR.

- **Selon la directive européenne (JOCE 2003), les CGR se conservent entre +2°C et +6°C pendant 42 jours à partir de la date de prélèvement.**

### ○ Le plasma frais congelé (PFC)

Il contient notamment les facteurs de l'hémostase. Leur transfusion est nécessaire lorsque la concentration de ces facteurs est trop basse, dans le but de prévenir une hémorragie ou d'en faciliter l'arrêt. Les PFC sont préparés et délivrés dans des volumes compris entre 200 et 600 mL.

L'administration de PFC doit être orientée en fonction des tests d'hémostase pouvant expliquer un risque hémorragique. Sa transfusion est recommandée lorsque :

- La concentration de fibrinogène plasmatique est inférieure à 1 g/L [valeur de référence : 2 - 4g/L]

- Le temps de céphaline activé (TCA) s'inscrit entre 1,5 à 1,8 fois supérieur de la valeur témoin [valeur de référence : 0,8 - 1,2]
- L'activité du complexe prothrombinique est inférieure à 40% [valeur de référence : 70 - 130%].

➤ **Selon la directive européenne (JOCE 2003), les PFC se conservent à -25°C jusqu'à 1 an à partir de la date de prélèvement.**

- **Les plaquettes**

Elles sont indispensables à l'hémostase. Comme pour le plasma, elles sont transfusées si leur concentration est très insuffisante, pour prévenir une hémorragie ou en faciliter l'arrêt.

Les transfusions plaquettaires sont indiquées dans la prévention ou le traitement curatif des hémorragies chez les patients porteurs de thrombopénie d'origine centrale (qui correspond à une diminution des plaquettes par destruction périphérique ou par absence de production médullaire) ou d'une thrombopathie (fonction des plaquettes altérée). La concentration normale des plaquettes est comprise entre 150 et 450 G/L ce qui correspond à un nombre de  $9 \times 10^{11}$  à  $2,7 \times 10^{12}$  plaquettes. Une fourchette de 2 à  $8 \times 10^{11}$  plaquettes sont contenues dans 200 à 600 mL de plasma. Chez un adulte, le nombre de plaquettes à prescrire est de 0,5 à  $0,7 \times 10^{11}$  plaquettes pour 7 kg de poids.

Pour les thrombopénies centrales, la prévention des accidents hémorragiques est réservée principalement aux hémorragies aiguës ou iatrogènes. En général, la concentration de plaquettes doit être maintenue au-dessus de 10 G/L.

➤ **Selon la directive européenne (JOCE 2003), les plaquettes se conservent entre +20°C à +24°C sous agitation lente et continue pendant 5 jours à partir de la date de prélèvement.**

- **Les globules blancs**

Ils contribuent à la défense de l'organisme contre l'infection. Ils sont rarement transfusés sauf en cas d'urgence vitale tel que l'échec d'un traitement d'antibiotique lors d'infection et de neutropénie sévère.

### I.2.3 Les pathologies soignées grâce au don du sang

La transfusion sanguine est indispensable, voire vitale, dans le traitement de nombreuses pathologies. Selon l'Institut National de Transfusion Sanguine (INTS) qui est en charge de la veille et de la sécurité sanitaire de la transfusion sanguine, les PSL sont prescrits dans trois grandes indications thérapeutiques :

- **Les cancers (leucémie, lymphome) et les maladies du sang.**

Les patients atteints d'hémopathies malignes représentent près d'un tiers des patients transfusés et un peu plus de la moitié des produits sanguins utilisés. L'induction thérapeutique intensive par des traitements par chimiothérapie ou les greffes de moelle osseuse diminue fortement le renouvellement des cellules sanguines par la moelle osseuse. Pendant cette période critique, la transfusion de concentrés de globules rouges et de concentrés de plaquettes est indispensable pour prévenir les complications d'une anémie profonde et le risque hémorragique. Les infections liées à la leucopénie sont le plus souvent traitées par des antibiotiques, mais, dans de rares cas, une infection résistant aux antibiotiques peut être traitée par des concentrés de globules blancs.

Dans la thalassémie, maladie héréditaire qui se traduit dans sa forme grave par une anémie récurrente, nécessite l'apport d'un support transfusionnel récurrent. En outre, la drépanocytose, maladie génétique qui se caractérise par la présence d'hématies falciformes agrégant de faible demi-vie entraînent des crises vasculo-occlusives. Les patients atteints de drépanocytose ont besoin de transfusion à intervalles réguliers (Boulat et al. 2013).

- **Les hémorragies.**

Les hémorragies représentent environ 20% des transfusions et près de 15% des produits sanguins utilisés. Des transfusions de concentrés de globules rouges sont nécessaires en cas de saignements importants, de l'hémorragie digestive aux saignements liés à des troubles majeurs de l'hémostase. Le traitement transfusionnel y est le plus souvent de courte durée, le temps de corriger la perte entraînée par le saignement.

- **Les interventions chirurgicales.**

Pour près de 40% des transfusés et un quart des produits sanguins prescrits, la transfusion est parfois nécessaire au cours des interventions chirurgicales. Les besoins transfusionnels les plus forts sont en chirurgie cardiaque et en orthopédie ou lors d'opérations réalisées en urgence après traumatisme accidentel.

Outre ces trois grands domaines représentant plus de 90% des patients transfusés et près de 95% des produits sanguins, il faut ajouter les patients pris en charge dans les unités de soins

intensifs pour 5 à 10% des malades transfusés soit moins de 5% des PSL. La transfusion chez les femmes parturientes lors de situations obstétricales difficiles concerne 2% des patients transfusés (1% des produits sanguins). Enfin, de manière beaucoup plus rare le nouveau-né peut nécessiter l'apport d'une transfusion (moins de 1 % des transfusés) lors qu'il s'agit de prématurés ou à la suite d'une anémie hémolytique consécutive à la présence d'anticorps chez la mère.

#### **I.2.4 Les réserves en produit sanguin labile**

En France, tout comme dans de nombreux pays, le niveau d'approvisionnement en produits sanguins est très bas. A cela, s'ajoute la durée de vie limitée des PSL et notamment des plaquettes qui ont une durée de vie de 5 jours. Dans ce contexte, des dons réguliers par des donneurs volontaires non rémunérés sont nécessaires pour constituer une réserve suffisante. L'OMS organise chaque année une Journée mondiale du don de sang qui vise à sensibiliser des potentiels donneurs sur la nécessité de donner son sang régulièrement afin de garantir la qualité, la sécurité et la disponibilité de produits sanguins. Les mesures de sécurité préconisées peuvent entraîner à juste titre l'exclusion du don mais la mise à l'écart de certains donneurs potentiellement à risque semble être une mesure excessive et favorise la pénurie de dons de sang.

### **I.3 La Sécurisation du don**

A partir des années 1980, l'absence de mesures de sécurité dans le domaine de la transfusion a conduit à la mort de milliers de patients hémophiles par transmission du VIH dans le produit sanguin transfusé (Leveton et al. 1996). A cette époque, seuls quelques rares cas de patients atteints de SIDA avaient été décrits sans toutefois en connaître les modes de transmission (Gottlieb et al. 1981 ; Coffin et al. 1986). En France, ce scandale prit le nom de « *l'affaire du sang contaminé* » mais n'a été dénoncé qu'après 1991 par une journaliste qui publia un article dans lequel elle prouva que le Centre Nationale de la Transfusion Sanguine (CNTS) distribuait sciemment des lots de sang contaminé (Badou et al. 1995). Quelques années plus tard, un autre scandale éclata pour dénoncer la transmission massive du prion chez de nombreux patients transfusés (Llewelyn et al. 2004 ; Urwin et al. 2016). La transmission du prion aboutit à la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou à ses formes variantes, plus connue sous le nom de « *la maladie de la vache folle* ». Ces évènements dramatiques ont justifié la mise en place des mesures de sécurisation des produits transfusionnels. Depuis la loi du 4 janvier 1993, relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament, les poches de sang recueillies lors des dons ne sont jamais transfusées

directement au patient. Après le prélèvement, elles sont préparées, transformées et qualifiées avant d'être distribuées.

### **I.3.1 Le prélèvement**

La sécurisation du PSL commence dès le prélèvement. La sélection du donneur par le médecin est la première étape de la sécurisation pour la transfusion (Crespin et al. 2013). Le donneur remplit un questionnaire l'interrogeant sur son mode de vie et ses antécédents médicaux qui est analysé par le médecin lors de l'entretien médical. Celui-ci évalue si le donneur est apte au don. Le prélèvement est ensuite effectué par une infirmière spécialement formée.

### **I.3.2 La préparation et transformation**

La poche de sang prélevée passe ensuite par l'étape de préparation où le produit sanguin subit une filtration systématique pour diminuer le nombre de leucocytes résiduels dans les PSL, qui est appelée l'étape de déleucocytation. Cette procédure a été mise en œuvre en 1998 pour les CGR et les plaquettes et en 2001 pour le plasma pour réduire le risque de transmission de virus, d'infections bactériennes ou encore l'apparition d'anticorps anti-HLA (De clippel et al. 2014 ; Triulzi et al. 2009).

La transformation est la modification de la composition et des caractéristiques du PSL. En fonction de la prescription médicale, une poche de sang peut subir le processus de déplasmatisation, de cryoconservation ou encore d'irradiation.

### **I.3.3 La qualification biologique du don (QBD)**

Pour répondre aux exigences du système de qualité, des examens biologiques sont réalisés sur des tubes supplémentaires pour chaque don. La qualification biologique détermine le statut immuno-hématologique du donneur afin de garantir la compatibilité des produits sanguins avec le receveur et assure sa sécurité vis-à-vis des agents transmissibles. D'ailleurs, l'Organisation Mondiale de la Santé (l'OMS ou WHO pour world health Organization) recommande un dépistage systématique des infections pour tous les dons de sang avant leur utilisation.

Selon l'article D.1221-6 du Code de la Santé Publique (CSP 2013), sur chaque prélèvement sont effectués :

1° / La détermination des groupes sanguins érythrocytaires, avec :

- La détermination des groupes ABO et Rh(D), ce dernier dénommé Rh 1 (RH1)
- La détermination du phénotype Rh : C(RH2), E(RH3), c(RH4) et e(RH5) et Kell (KEL1) lors des deux premiers dons

2°/ La recherche des anticorps anti-érythrocytaires pouvant avoir une incidence clinique transfusionnelle

3°/ La détection des anticorps anti-A et anti-B immuns

4°/ Le dosage de l'hémoglobine

5°/ Les tests et analyses biologiques en vue du dépistage de maladies transmissibles:

- Le dépistage sérologique de la syphilis
- La détection de l'antigène HBs
- La détection des anticorps anti-VIH 1 et anti-VIH 2
- La détection des anticorps anti-VHC
- La détection des anticorps anti-HTLV-I et anti-HTLV-II
- La détection des anticorps anti-HBc
- La détection du génome viral des virus VIH-1 et VHC

En outre, les analyses ci-dessous sont effectuées en fonction du contexte épidémiologique et clinique :

1°/ Le dépistage des anticorps anti CMV

2°/ Le dépistage d'anticorps anti-paludéens et anti-*trypanosoma cruzi* (maladie de Chagas) chez les donneurs ayant séjourné dans une zone d'endémie palustre depuis plus de quatre mois et moins de trois ans après le retour.

4°/ Le dépistage des anticorps anti-HLA chez les femmes participant au don de plasma ou plaquettes et ayant eu au moins un enfant dans le but de réduire la survenue du TRALI (De clippel et al. 2014 ; Triulzi et al. 2009).

5°/ Le phénotypage étendu pour les antigènes des systèmes Duffy, Kidd, MNS et autres selon des besoins spécifiques

D'après l'article D.1221-7 du Code de la Santé Publique, « *Le sang ou ses composants ne peuvent être utilisés en vue de préparer des produits sanguins labiles destinés à un usage thérapeutique direct que si les résultats des tests de dépistage prévus au 5° de l'article D. 1221-6 sont négatifs* ».

#### **I.3.4 La distribution et délivrance**

La mise à disposition de PSL se fait sur prescription médicale en vue de leur administration à un patient déterminé. Elle est effectuée en veillant à la compatibilité immunologique, dans le respect des bonnes pratiques de transfusion.



## II. Les accidents transfusionnels

### II.1 L'hémovigilance

La loi du lundi 4 janvier 1993 relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament a mis en place un dispositif d'hémovigilance (CSP 1993). L'hémovigilance est un organisme de la chaîne transfusionnelle qui a pour objet la surveillance, l'évaluation et la prévention des incidents et des effets indésirables survenant chez les donneurs ou les receveurs de PSL.

Selon l'article L 1211-12 du Code de la Santé Publique modifié par le décret n°2006-99 du 1 février 2006 : *"On entend par Hémovigilance l'ensemble des procédures de surveillance organisées depuis la collecte du sang et de ses composants jusqu'au suivi des receveurs, en vue de recueillir et d'évaluer les informations sur les effets inattendus ou indésirables résultant de l'utilisation thérapeutique des produits sanguins labiles en vue d'en prévenir l'apparition, des incidents graves ou inattendus survenus chez les donneurs. L'hémovigilance comprend également le suivi épidémiologique des donneurs"*.

L'ANSM assure la mise en œuvre de l'hémovigilance. En 2014 (Rapport Hémovigilance, 2014), elle a reçu près de 17000 déclarations d'incidents et d'effets indésirables apparus lors de la transfusion. Ces déclarations sont effectuées par des établissements de transfusion et des établissements de santé. L'unité d'hémovigilance de l'ANSM a pour mission d'examiner et d'évaluer, dans les plus brefs délais, tout incident en relation avec l'activité transfusionnelle. Ces incidents peuvent concerner les receveurs (effet indésirable du receveur, EIR), les donneurs (effet indésirable grave du donneur, EIGD) ou le fonctionnement de la chaîne transfusionnelle (incident grave, IG).

Dans le rapport d'activité 2014 de l'hémovigilance, 3 107 106 PSL ont été distribués dont 79% de CGR, 10% de plaquettes et 11% de plasmas. Le nombre de patients transfusés était de 572 443 soit un nombre moyen de 5 PSL par patient. Ces PSL sont issus de 1 600 690 donneurs qui représentent 4 % de la population de 18 à 65 ans. Les dons sont constitués pour 89,6% de dons de sang total et pour 10,4% de dons d'aphérèse.

## II.2 Les effets indésirables et les incidents déclarés

### II.2.1 Les Effets indésirables du Receveur (EIR)

Ce sont tous les effets indésirables survenus chez un receveur de PSL liés ou susceptibles d'être liés à l'usage thérapeutique de ces produits. On distingue les incidents immédiats qui surviennent dans les 8 jours qui suivent l'acte transfusionnel et les incidents retardés s'ils surviennent au-delà de 8 jours (Tableau 3).

**Tableau 3. Répartition des effets indésirables du receveur selon leur délai d'apparition.**

Effets indésirables du receveur (EIR)	
Effets immédiats	Effets retardés
Réactions fébriles non hémolytiques	Allo-immunisation érythrocytaire
Réactions allergiques	Infection virale post-transfusionnelle
Incompatibilité immunologique (dont incompatibilité ABO)	Hémosidérose
Infection bactérienne transmissible par transfusion	Réaction du greffon contre l'hôte
Œdème pulmonaire de surcharge (TACO: Transfusion-associated circulating overloading)	Purpura post-transfusionnel
<b>Œdème pulmonaire lésionnel (TRALI: Transfusion-related acute lung injury)</b>	
Réaction hypotensive	

Depuis 2010, les EIR sont classés en quatre grades de sévérité et l'imputabilité à la transfusion dans les incidents est appréciée sur une échelle de 0 à 3 (Tableau 4) :

**Tableau 4. Appréciation de l'EIR selon le grade de sévérité et le niveau d'imputabilité.**

Grade de sévérité	Niveau d'imputabilité
<b>Grade 1:</b> EIR non sévère	<b>Imputabilité NE (non-évaluable):</b> données insuffisantes pour évaluer l'imputabilité
<b>Grade 2:</b> EIR sévère	<b>Imputabilité 0 (exclue/improbable):</b> éléments d'appréciation disponibles incitant clairement à attribuer l'EIR à d'autres causes que les PSL
<b>Grade 3:</b> Menace vitale immédiate	<b>Imputabilité 1 (possible):</b> éléments d'appréciation disponibles ne permettant pas d'attribuer clairement l'EIR, ni à la transfusion, ni à d'autres causes
<b>Grade 4:</b> Décès	<b>Imputabilité 2 (probable):</b> éléments d'appréciation disponibles incitant clairement à attribuer l'EIR à la transfusion
	<b>Imputabilité 3 (certaine):</b> éléments probants ne pouvant être mis en doute et permettant d'attribuer avec certitude l'EIR à la transfusion

#### Chiffres 2014:

7 836 EIR ont été déclarés dont 8 cas de décès. Le taux de déclaration était de 252,1 pour 100.000 PSL (soit 1 déclaration pour 400 PSL).

Les 3 principaux diagnostics d'imputabilité 1 à 3 concernent les allo-immunisations isolées (39,46%), les réactions fébriles non hémolytiques (RFNH) (26,79%) et les allergies (14,78%).

### **II.2.2 Les incidents graves de la chaîne transfusionnelle (IG)**

Ce sont des incidents liés aux prélèvements de sang, à la qualification biologique du don, à la préparation, à la conservation, à la distribution, à la délivrance ou à l'utilisation de PSL. Ils sont dus à un accident ou à une erreur, susceptible d'affecter la sécurité ou la qualité du PSL et d'entraîner des effets indésirables graves (entraînant la mort ou mettant la vie en danger, ou entraînant une incapacité).

#### Chiffre 2014 :

2 202 incidents graves de la chaîne transfusionnelle ont été déclarés dont 92% des IG sont des incidents isolés sans transfusion. Parmi les 8% d'IG associé à une transfusion, seulement 23 IG (1% des IG totaux) sont associés à des EIR de grade supérieur ou égal à 1.

### **II.2.3 Les effets indésirables graves du donneur (EIGD)**

Un effet indésirable chez le donneur est défini comme une réaction nocive liée ou susceptible d'être liée au prélèvement de sang.

#### Chiffre 2014 :

5 262 effets indésirables graves chez les donneurs ont été déclarés dont 76% des EIGD sont de grade modéré (grade 2). Il ressort du rapport d'hémovigilance que 93% de ces EIGD étaient sans conséquence pour le donneur.

### **II.2.4 L'incident post-don (IPD)**

L'incident post-don est défini comme toute information communiquée à un établissement de santé après un don, concernant le donneur et mettant en cause la sécurité d'un ou plusieurs de ses dons. Toutes les IPD pouvant comporter un risque sanitaire potentiel ou avéré sont notifiées à l'ANSM. Outre son intérêt de santé publique, la déclaration des IPD intervient dans la protection du donneur comme du receveur.

Chiffre 2014 :

1 555 IPD ont été déclarés par le donneur soit un taux de 55 déclarations pour 100 000 dons (0,055%). Il s'agissait principalement d'informations portant sur des risques infectieux ou des risques d'exposition.

### II.2.5 L'évolution du nombre de TRALI déclaré de 2000 à 2014

Le TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) se définit comme un œdème lésionnel pulmonaire post-transfusionnel et fait partie des effets indésirables immédiats du receveur.

La Figure 1 montre l'évolution du nombre de TRALI d'imputabilité 2 ou 3 entre 2000 et 2014. L'incidence moyenne des déclarations d'œdèmes lésionnels pulmonaires entre 2003 et 2012 est de 0,9 pour 100 000 PSL et passe à 0,3 pour 100 000 PSL en 2014 (rapport hémovigilance 2014). On note en particulier une augmentation du nombre de déclarations de TRALI à partir de 2003 due à la mise en place cette même année d'un groupe de travail d'experts dont le but était de sensibiliser les cliniciens prescripteurs de PSL sur la connaissance de cet accident transfusionnel afin d'évaluer au plus juste la survenue du TRALI même s'il reste encore sous-évalué aujourd'hui.

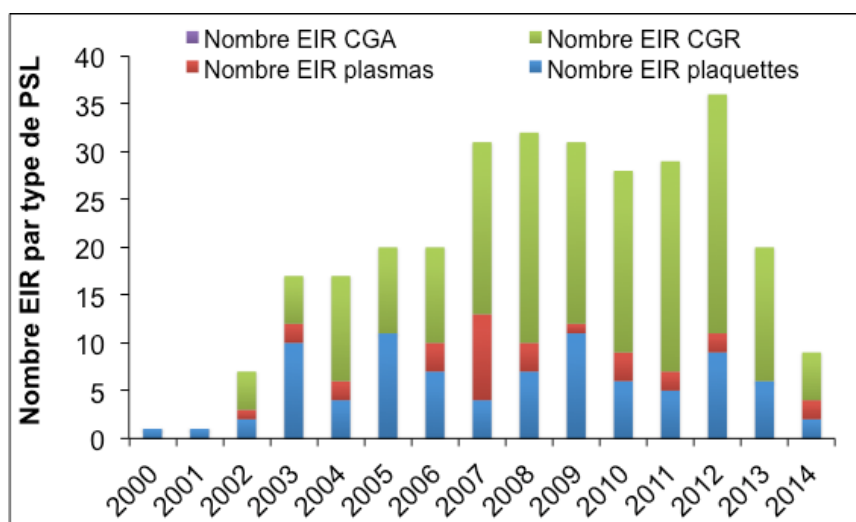


Figure 1. Evolution du nombre de TRALI d'imputabilité 2 et 3 entre 2000 et 2014. Adapté des rapports d'activités hémovigilance 2000 à 2014.

Chiffre 2014 :

Au total, 29 TRALI ont été déclarés en 2014 (dont 9 d'imputabilité 2 à 3) ont été déclarés : 55% avec des CGR, 22% avec les plaquettes, 22% avec le plasma (Figure 1). Aucun décès n'a été déclaré.

Le TRALI représente la 3<sup>ème</sup> cause d'EIR de grade 3 (menace vitale immédiate) après le TACO (« Transfusion-associated circulatory Overload ») et les allergies (Politis et al. 2016).

Le TRALI fut pendant longtemps l'une des premières causes de mortalité transfusionnelle en France (Rebibo et al. 2004) et dans le monde (Alam et al. 2013). Malgré cela, souvent confondu avec l'œdème pulmonaire de surcharge (TACO), il reste encore méconnu et sous-diagnostiqué (Wallis et al. 2003). Du fait d'un diagnostic d'interprétation difficile, une sous-déclaration du TRALI auprès de l'Hémovigilance rend les données étiologiques compliquées et biaisées, d'autant plus que son diagnostic différentiel avec le TACO représente également l'une des premières causes de mortalité transfusionnelle (Alam et al. 2013). Malgré la mise en œuvre en 2003 de la déclaration électronique du TRALI et de la sensibilisation auprès des prescripteurs et des transfuseurs sur cet EIR, la méconnaissance des mécanismes dans la survenue du TRALI ne permet pas de cerner clairement sa participation dans l'activité transfusionnelle.

D'autre part, en se basant uniquement sur les données cliniques attestant que la survenue du TRALI résulte d'un conflit immunologique avec la présence d'anticorps anti-HLA apportés lors de la transfusion, des mesures préventives ont été mises en œuvre entraînant l'exclusion de dons provenant des donneurs immunisés pour le don de plasma et les plaquettes d'aphérèse. Aujourd'hui, cette prévention a permis de réduire de 30% l'incidence du TRALI dans les accidents transfusionnels (Wiersum-Osselton et al. 2011) sans pour autant tous les éliminer. En revanche, ces mesures radicales ne font qu'accentuer le peu de réserves en PSL dont dispose l'EFS, ne représentant que dix jours de consommation (Wallis et al. 2003). Cette mesure ne permet pas actuellement de couvrir le besoin de tous les patients en cas de surconsommation d'autant plus que la demande en PSL ne cesse d'augmenter (multiplication des traitements de cancers par chimiothérapie, population vieillissante nécessitant une hospitalisation et statistiquement plus de transfusion).

## **DEUXIEME CHAPITRE**

### **LE TRALI (« *TRANSFUSION-RELATED ACUTE LUNG INJURY* »)**

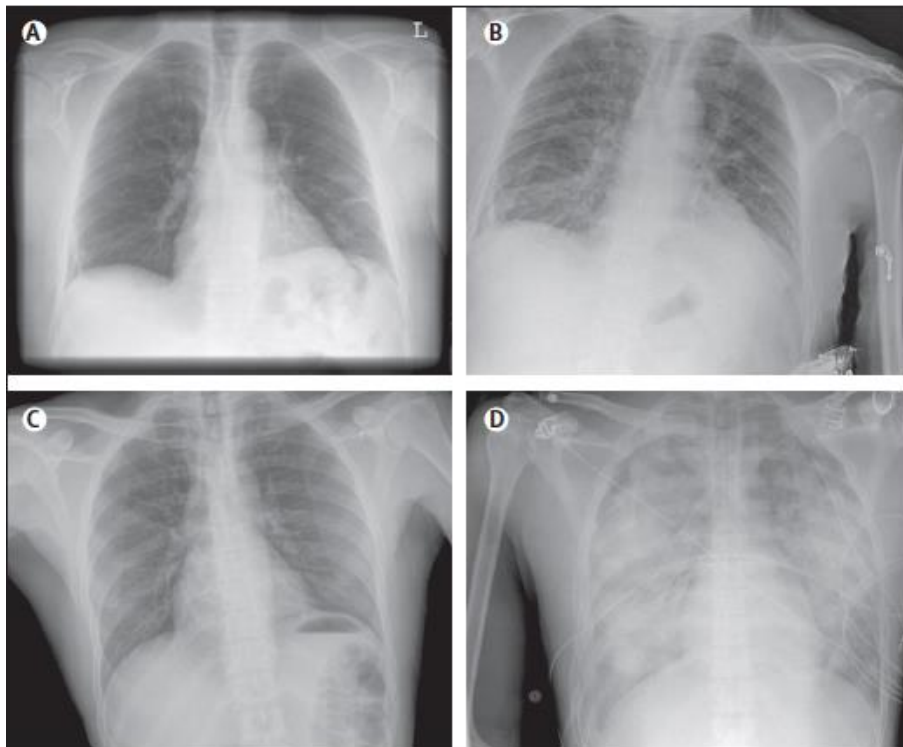
#### **I. Du diagnostic...**

##### **I.1 Epidémiologie**

L'œdème lésionnel pulmonaire aigu post-transfusionnel fut initialement décrit en 1951 chez cinq sujets (Barnad et al. 1951). Ce n'est qu'en 1983 avec les travaux de Popovsky (Popovsky et al. 1985a) que cette pathologie prit le nom de TRALI, acronyme de « *Transfusion-Related Acute Lung Injury* ». Il s'agit d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë survenant lors de transfusion de n'importe quel type de PSL. Les premières données ont rapidement fait reconnaître l'étiologie possible d'un conflit immunologique par les anticorps apportés avec le produit transfusé. Deux ans plus tard, l'équipe de Popovsky avait rapporté que parmi une série de 36 patients ayant eu un TRALI, 89% d'entre eux présentaient des anticorps anti-HLA dans le produit sanguin transfusé (Popovsky et al. 1985b). C'est à partir de cette publication que les médecins transfuseurs prirent conscience de cet incident et de nombreux travaux furent consacrés au TRALI, à ses mécanismes physiopathologiques, à ses circonstances de survenue et à ses caractéristiques cliniques. Dès lors, le réseau d'hémovigilance a tenté d'évaluer l'incidence de l'œdème lésionnel pulmonaire dans les accidents transfusionnels. Ce n'est que depuis une dizaine d'années que le TRALI est considéré comme une cause majeure de morbidité et de mortalité post-transfusionnels. En 2009, le système d'hémovigilance britannique SHOT (Serious Hazards of Transfusion) évaluait la survenue du TRALI comme la première cause de mortalité transfusionnelle (Vamvakas et al. 2009) alors qu'il était considéré comme la première cause de décès entre 2008 et 2012 aux Etats-Unis avec une mortalité de 37% (FDA, 2012) En France, le TRALI occupait le troisième rang de mortalité post transfusionnelle jusqu'en 2009 avec un taux de mortalité pouvant aller jusqu'à 18% (Rapport d'Hémovigilance 2009). Aujourd'hui, le nombre d'accident a diminué du fait des mesures préventives mises en œuvre. Néanmoins, son incidence réelle demeure mal-évaluée et probablement sous-estimée du fait de sa confusion fréquente avec l'œdème de surcharge (TACO) et le peu de connaissance actuelle sur son diagnostic clinique et son mécanisme.

## I.2 Diagnostic clinique

Le diagnostic du TRALI est essentiellement clinique. Il représente un œdème pulmonaire qui partage les mêmes caractéristiques que les œdèmes pulmonaires lésionnels aigus, appelés « *Acute Lung Injury* » (ALI), et des syndromes de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (Ashbaugh et al. 1967). Le TRALI survient dans la majorité des cas dans les trente minutes et au plus tard dans les six heures suivant la transfusion (Toy et al. 2005). Ce lien temporel est un critère diagnostique capital. Il associe, dans sa forme typique, une tachypnée avec cyanose, une fièvre, une toux, une tachycardie inconstamment associée à une hypotension (Toy et al. 2005 ; Kleinman et al. 2004). L'auscultation pulmonaire révèle la présence de râles crépitants diffus dans les deux champs pulmonaires. Une radiographie thoracique montre généralement un infiltrat pulmonaire bilatéral formé d'opacités alvéolaires cotonneuses illustrant l'image d'un « poumon blanc » (Figure 2). L'examen du liquide alvéolaire montre l'existence d'un exsudat riche en protéine avec un rapport des concentrations protéiques liquide alvéolaire/plasma  $\geq 0,7$ .



**Figure 2. Radiographie du thorax chez deux patients présentant un TRALI.** La radiographie montre deux patients avant (A et C) et après (B et D) la survenue du TRALI. A et C montrent un profil normal sans signe d'œdème pulmonaire. B et D illustrent un infiltrat alvéolo-interstitiel diffus présent dans le TRALI. D'après la Revue de Vlaar A.P.J et al, Lancet 2013.

L'étude gazométrique confirme un tableau d'hypoxie puisqu'elle montre une désaturation en oxygène du sang artériel, avec une saturation en oxygène (SpO<sub>2</sub>) inférieure ou égale à 90% et un rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> abaissé au dessous de 300mmHg. Le bilan biologique décrit une

neutropénie transitoire précoce mais inconstante. Son absence ne permet pas d'éliminer un TRALI.

Les similitudes cliniques avec les SDRA suggèrent que le TRALI représente une entité post-transfusionnelle appartenant au groupe des SDRA (Toy et al. 2015). Le tableau clinique est typiquement celui d'un œdème pulmonaire lésionnel aigu répondant aux critères définis à l'occasion de la conférence de consensus réunie en 1994 sous le nom de « American-European consensus on ARDS » (Bernard et al. 1994) qui fournit la base des définitions cliniques permettant d'aboutir au diagnostic d'ALI (Tableau 5).

**Tableau 5. Critères de l'ALI selon la conférence de consensus Américano-Européenne de 1994.**  
D'après Bernard et al. 1994)

<b>Critères retenus pour la définition de l'ALI</b>
<b>Apparition sur un mode aigu</b>
<b>Hypoxémie :</b> Dans un contexte de recherche : $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ ou $SPO_2 < 90\%$ en air ambiant En dehors d'un contexte de recherche : $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ ou $SPO_2 < 90\%$ en air ambiant ou autre évidence clinique d'une hypoxémie
<b>Infiltrat bilatéral sur une radiographie thoracique frontale</b>
<b>Absence de signes d'hypertension dans l'oreillette gauche (pas de surcharge circulatoire)</b>

La définition du TRALI inclut les critères retenus pour la définition de l'ALI et engage un lien temporel avec la transfusion et des critères d'exclusion liés à la présence d'autres causes d'ALI. Il repose sur les critères définis lors de la conférence de consensus de Toronto en 2004 (Kleinman et al. 2004) (Tableau 6).

**Tableau 6. Critères du TRALI selon la conférence de consensus canadienne de 2004.**  
D'après Kleinman et al. 2004)

<b>Critères retenus pour la définition du TRALI</b>
<b>TRALI certain</b> 1. <b>Présence de critères de l'ALI</b> 2. <b>Pas d'ALI préexistant avant la transfusion</b> 3. <b>Survenue dans les 6 heures de la transfusion (pendant ou dans les 6 heures après)</b> 4. <b>Pas de relation temporelle avec un facteur de risque alternatif d'ALI</b>
<b>TRALI possible</b> 1. <b>Présence de critères de l'ALI</b> 2. <b>Pas d'ALI préexistant avant la transfusion</b> 3. <b>Survenue dans les 6 heures de la transfusion (pendant ou dans les 6 heures après)</b> 4. <b>Relation temporelle avec un facteur de risque alternatif d'ALI</b>



### I.3 Les produits sanguins mis en cause

L'incidence réelle du TRALI est difficilement chiffrable en raison d'une sous-évaluation de cet incident résultant de la méconnaissance dans sa physiopathologie mais également du fait d'un diagnostic positif difficile et souvent confondu. Néanmoins, la publication de Popovsky et Moore évoquait déjà en 1985 une incidence de 1 pour 5000 PSL transfusés (Popovsky et al. 1985b). Tous les produits sanguins labiles contenant du plasma ont été mis en cause (Tableau 7 ; II.2.5 Evolution du nombre de TRALI déclaré de 2000 à 2014). Il est important de noter la présence d'un volume résiduel de plasma dans pratiquement tous les PSL.

*Tableau 7. Incidence du TRALI selon les produits sanguins transfusés*

Auteurs, année	Produits Sanguins Labiles					
	PFC	CPA	MCP	CGR	Cryoprécipité	Total
Popovsky et al. 1985a; Silliman CC et al. 1999						1/5000
Silliman et al. 2003a	1/19411	1/1224		1/4410		1/1220
SHOT (Kleinman S. et al. 2004)	1/74000	1/88000	1/88000	1/557000	1/500000	
Québec Hémovigilance (Kleinman S. et al. 2004)	1/61006		1/9306	1/58279	1/25073	
Wallis J.P. et al., 2003						1/5000 à 1/10000
Kopko et al. 2002						1/25000
Silliman C.C. et al. 2005						1/5000 à 1/1323
(Muller, Parpeix et al. 2004)		1/14602				1/5000
Données françaises (Renaudier et al 2009) entre 2003-2006	1/80110	1/20040	1/128550	1/156110		
Système d'hémovigilance britannique (Chapman, et al 2009)	1/81000	1/68000		1/556000		
Système d'hémovigilance allemand (Keller- Stanislawski et al 2009)	1/66 000	1/420000		1/2 860 000		
Système d'hémovigilance française (2009-2013) 2014						1/100000 0,3/100000

PFC : plasma frais congelé ; CPA : concentré de plaquettes d'aphérèse ; MCP : mélange de concentré plaquettaire ; CGR : concentré de globule rouge

## **I.4 Le diagnostic différentiel du TRALI**

Le TRALI doit être distingué des quatre principaux accidents transfusionnels majeurs.

### **I.4.1 L'œdème pulmonaire aigu de surcharge**

L'œdème pulmonaire aigu de surcharge ou encore appelé TACO (*Transfusion-Associated Circulatory Overloaded*) avec lequel le TRALI est le plus souvent confondu, répond à un traitement par vasodilatateurs et diurétiques (Alam et al. 2013 ; Poposky et al. 2006 ; Renaudier et al. 2009). Le TACO se distingue du TRALI par des signes de défaillance circulatoire avec notamment une augmentation des pressions artérielles systoliques et diastoliques mais également par des signes morphologiques avec un cœur augmenté de volume.

### **I.4.2 Le choc anaphylactique post-transfusionnel**

Il se distingue du TRALI par son apparition précoce et brutale ainsi que par l'association de réactions allergiques (choc anaphylactique) de grade I à IV en fonction de la sévérité des signes. On retrouve notamment des réactions cutané-muqueuses, à type d'urticaire ou d'érythème, la présence d'un bronchospasme, ou encore des troubles cardiovasculaires (ANSM 2004). Il n'y a en général pas d'œdème pulmonaire et la radiographie pulmonaire a un profil normal.

### **I.4.3 Le choc toxi-infectieux**

Il résulte de l'injection de sang contaminé qui se distingue par la brutalité de son installation et de sa symptomatologie avec l'apparition d'une hypotension artérielle, un pic fébrile avec frissons, et des marbrures cutanées. Le choc toxi-infectieux peut évoluer vers un sepsis grave avec un syndrome respiratoire aigu et il est difficile de déterminer alors la part de l'infection et celle de la transfusion dans l'étiologie de l'œdème pulmonaire.

### **I.4.4 Le choc hémolytique par incompatibilité ABO**

Il concerne les accidents transfusionnels dus à l'incompatibilité entre le groupe sanguin du donneur et celui du receveur. Les signes cliniques apparaissent plus précocement, survenant en général dans les premières minutes suivant la transfusion (Kleinman et al. 2004). Il s'associe souvent à des douleurs lombaires avec des signes cliniques et biologiques d'hémolyse intravasculaire aiguë. L'erreur transfusionnelle est rapidement constatée par la vérification des groupes ABO du donneur et du receveur.

## I.5 Evolution et traitement

L'évolution du TRALI peut être grave. Sa mortalité était évaluée de 5 à 18 % au cours des années 2000 (ANSM, 2004 ; Kleinman et al. 2004). Dans les cas favorables, l'évolution est rapidement résolutive sans séquelle en 72 heures. Ces données sont susceptibles d'évoluer compte tenu de la sous-déclaration actuelle des cas de TRALI.

Le traitement est symptomatique et consiste en une assistance respiratoire par oxygénothérapie ou par une ventilation mécanique si nécessaire (Looney et al. 2004). Le recours au remplissage vasculaire et aux médicaments vasopresseurs est parfois indispensable. En l'absence de signes de surcharge vasculaire comme pour le TACO, le traitement diurétique ou vasodilatateur n'a pas d'intérêt et pourrait être délétère pour le patient transfusé en cas de mauvais diagnostic.

## II. ... A la prévention

### II.1 Ethiopathogénie du TRALI

Sur le plan étiologique, le TRALI représente un œdème pulmonaire inflammatoire aigu avec une atteinte de la membrane basale alvéolaire, secondaire à une activation des polynucléaires neutrophiles (PMN) au contact de l'endothélium des capillaires pulmonaires. L'activation des PMN conduit à la lésion endothéliale pulmonaire et l'augmentation de la perméabilité endothéliale de la paroi alvéolo-capillaire (Silliman et al. 1999). L'étiologie et les mécanismes physiopathologiques précis responsables de cette lésion sont très mal connus mais les constatations anatomiques effectuées sur de patients décédés soulignent la présence de nombreux PMN dans les capillaires pulmonaires (Silliman et al. 2005 ; Dry et al. 1999). Localement les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires sont activées et contribuent à la séquestration des polynucléaires neutrophiles. Cela souligne le rôle fondamental joué par l'interaction entre les PMN et les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires qui constitue le point central de ce conflit (Bux et al. 2007).

L'analyse des cas de TRALI et la relation temporelle avec la transfusion sanguine ont conduit à rechercher chez les donneurs et dans les produits transfusés le facteur déclenchant, responsable de l'activation des PMN.

## II.2 Relation entre le produit sanguin transfusé et le TRALI

Deux grandes catégories de facteurs activateurs d'origine transfusionnelle ont été retenues. D'une part des facteurs induisant l'activation des PMN par une réaction antigène-anticorps spécifique (Bux et al. 2007), d'autre part des facteurs activateurs de PMN sans spécificité immunologique.

### II.2.1 Le conflit non immunologique

#### II.2.1.1 Les lipides activateurs

Le rôle des lipides activateurs des PMN dans le déclenchement du TRALI, notamment celui du lysophosphatidylcholine (Lyso-PC) apporté par dans le produit sanguin transfusé, a été invoqué à maintes reprises (Gajic et al. 2007 ; Maslanka et al. 2012). Ces composés lipidiques s'accumulent dans les poches de PSL au cours de leur conservation. Les lyso-PC sont des composés métaboliques de dégradation des membranes cellulaires qui stimulent un autre médiateur lipidique, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) (Silliman et al. 1994). Leur pouvoir pathogène a été établi cliniquement à partir de l'étude du sérum post-transfusionnel d'une série de patients ayant présenté un TRALI. Ces sérums étaient capables d'activer les PMN (Silliman et al. 1997).

Expérimentalement le rôle de ces lipides activateurs a été établi *ex vivo* dans un modèle de poumon isolé de rat, sensibilisé préalablement par une perfusion de Lyso-PC obtenus à partir de concentrés globulaires ou de concentrés de plaquettes conservés pendant un certain temps (Kehler et al. 2013, Zallen et al. 1999). Ces travaux établissaient également une relation entre la présence de ces lipides et la durée de conservation du produit sanguin en comparant la pathogénicité de concentrés globulaires ou plaquettaires conservés à celui de concentrés frais (Silliman et al. 2003b; Silliman et al. 1999). Dans ce modèle, l'œdème pulmonaire n'a été observé qu'avec les produits conservés dont l'injection devait en outre être précédée par une perfusion de Lyso-PC.

#### II.2.1.2 Les autres facteurs non spécifiques

Au cours de la conservation des concentrés plaquettaires, d'autres médiateurs activateurs des PMN peuvent être libérés. Le ligand du CD40 sous sa forme soluble (sCD40L ou CD154), protéine inflammatoire appartenant à la famille du TNF- $\alpha$ , s'accumule dans le plasma et dans les plaquettes pendant leur conservation (Phipps et al. 2001). Plus récemment, l'expression de CD40 sur les PMN a été rapportée comme faisant de cette cellule une cible potentielle de sCD40L et ouvre la possibilité que cette voie d'activation directe des PMN puisse être en cause dans le TRALI. Des expériences de co-culture *in vitro* avec des cellules

endothéliales humaines en cultures (HMVEC) ont montré le potentiel cytotoxique des PMN activés par sCD40L alors que les PMN non activés n'ont pas cet effet (Khan et al. 2006).

### II.2.1.3 Le conflit immunologique

La responsabilité des anticorps reconnaissant des antigènes exprimés sur les neutrophiles fut suspectée et reconnue depuis longtemps sans clairement être démontrée (Bux et al. 1996 ; Nordhagen et al. 1986 ; Leach et al. 1998 ; Bux 2005). Il peut s'agir d'anticorps dirigés contre le système HLA (« *Human Leukocyte Antigen* ») ou d'anticorps anti-HLA de classe I ou de classe II ou bien des anticorps ciblés sur les déterminants du neutrophile, les anticorps anti-HNA (pour « *Human Neutrophil Antigen* »).

#### II.2.1.3.1 Les anticorps anti-HLA

L'allo-immunisation d'un individu contre le système HLA résulte de 3 grands événements : la greffe d'organe, la transfusion et la grossesse. Les anticorps anti-HLA reconnaissent les déterminants antigéniques HLA de toutes les cellules qui les expriment telles que le neutrophile, les lymphocytes, les cellules endothéliales. On distingue les anticorps anti-HLA de classe I et les anticorps anti-HLA de classe II. Cette partie sera développée plus longuement.

#### II.2.1.3.2 Les anticorps anti-HNA

A la différence des anticorps anti-HLA, ces anticorps reconnaissent des antigènes présents spécifiquement sur les neutrophiles mais peuvent rarement avoir comme cible les lymphocytes ou les plaquettes (Bux 1999, Chu et al. 2013). Les principaux systèmes antigéniques portés par les PMN sont présentés dans le Tableau 8.

**Tableau 8 : Le système HNA (*Human Neutrophil Antigen*). D'après la revue de Bux, Transfusion 1999. Dans ce tableau, sont présentés les systèmes des neutrophiles, avec la distribution cellulaire des phénotypes dits granulocytaires, leur hétérogénéité d'expression et les identifiants moléculaires.**

Systèmes	Antigènes	Fréquences phénotypiques	Expression cellulaire	Structures fonctionnelles
HNA-1	HNA-1a	0,6	100% des PMN	FcγRIIIB, CD1
	HNA-1b	0,8		
	HNA-1c	0,05		
HNA-2	HNA-2a	0,97	40 à 80% des PMN	PRV-1, CD 177
HNA-3	HNA-3a (5b)	0,97	Granulocytes, lymphocytes, plaquettes	
HNA-4	HNA-4a	0,99	PMN, plaquettes	B2 intégrines, CR3, CD11b

Le pouvoir pathogène de l'anticorps anti-HNA-3a (appelé antérieurement anti-5b), a été étudié dans plusieurs modèles dont celui utilisant une perfusion de poumon isolé de lapin *ex vivo*

(Seeger et al. 1990). Dans ce modèle, l'injection simultanée d'un anticorps anti-HNA-3a, de neutrophiles humains portant cet antigène et de complément apporté par du plasma de lapin, produisait un œdème lésionnel sévère survenant, dans des délais de 2 à 6 heures comparables à ceux observés en clinique (Kehler et al. 2009).

La capacité à stimuler les PMN *in vitro* sur des modèles de cellules HMVEC cultivées en monocouche a également été montrée pour les anticorps anti-HNA-A3, HNA-4a et HNA-5a (Kopko et al. 2004 ; Sachs et al. 2006 ; Silliman et al. 2006).

**On note que 80% des cas de TRALI déclarés et documentés résultent de la présence d'anticorps dans le produit sanguin transfusé (Peters et al. 2015). Récemment, de nombreuses équipes évoquaient l'idée de réévaluer la définition du TRALI en distinguant les causes immunologiques des causes non immunologiques. Ceux-ci envisagent d'attribuer le terme de «TRALI I » aux causes immunologiques et le terme « TRALI II » aux causes non immunologiques (Warkentin et al. 2015, Peters et al. 2016).**

### II.3 Le mécanisme du TRALI : hypothèses physiopathologiques

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer les circonstances de survenue du TRALI : un mécanisme en une étape ou un mécanisme en deux étapes.

#### II.3.1 Mécanisme en une étape

La conséquence de la survenue du TRALI dans le mécanisme en une étape correspondrait à la dépendance seule de la transfusion du PSL contenant un facteur activateur. Ce mécanisme est justifié par les arguments cliniques et expérimentaux suivants:

- Des études sur des volontaires sains (Brittingham et al. 1957 ; Dooren et al. 1998) avaient montré que des anticorps apportés lors de la transfusion étaient capables en dehors de tout contexte pathologique de provoquer le TRALI. Dans ces circonstances, les anticorps étaient capables à la fois de stimuler et de provoquer la dégranulation des PMN.
- En 1990, Seeger et ses collaborateurs avaient démontré que la présence de l'anticorps était le seul facteur extrinsèque nécessaire à la lésion endothéliale pulmonaire (Seeger et al. 1990).
- L'observation de nombreux cas cliniques évoque très fortement le rôle exclusif des anticorps. Betbèze *et al* (Betbèze et al. 2007) avait montré que la transfusion de plasma contenant un anticorps anti-HLA de classe II dans le cadre d'un traitement strictement préventif d'accidents purpuriques thrombotiques avait provoqué chez la patiente transfusée la survenue du TRALI.

- A l'inverse, d'autres études soulignaient que la majorité des patients transfusés ayant l'antigène cible ne développait pas forcément un TRALI. L'équipe de Kopko (Kopko et al. 2002) avait constaté dans une étude rétrospective que parmi 36 patients transfusés avec une donneuse porteuse d'un anticorps anti-HNA-3a déjà impliqué dans un TRALI, seul 13 receveurs (36%) avait eu une réaction transfusionnelle, alors que l'antigène cible est présent chez plus de 95% de la population.

Les travaux de Kopko et de ses collaborateurs montrent que la présence d'anticorps dans le produit sanguin transfusé ne peut pas être le seul argument en faveur de tous les incidents de TRALI et qu'aucun anticorps particulier, en présence de sa cible, n'entraînait systématiquement l'apparition d'un œdème lésionnel pulmonaire.

### II.3.2 Mécanisme en deux étapes

Le fait qu'un même conflit immunologique ne déclenche pas systématiquement le TRALI suggère fortement le rôle primordial de l'existence de situations cliniques favorisantes chez le patient transfusé capable d'activer les PMN.

- Cette hypothèse est étayée par des modèles expérimentaux dans lesquels l'apparition de l'œdème dépend d'une stimulation préalable par le lipopolysaccharide (LPS), endotoxine bactérienne, dans le modèle sur un explant pulmonaire (Silliman et al. 1998), dans le modèle sur cellules HMVEC (Wyman et al. 2002) ou sur le modèle murin *in vivo* (Lögberg et al. 2009) ou encore après stimulation par le formyl-Met-leu-phe (fMLP) dans le modèle sur poumon isolé (Sachs et al. 2006).

- Les données issues de nombreuses études cliniques, montrent que le TRALI ne serait pas la conséquence seule de la transfusion de PSL contenant le facteur activateur. Cet incident nécessiterait deux étapes :

- Un premier évènement inhérent aux conditions cliniques du patient conduisant à la préstimulation des PMN.

- Un second évènement inhérent à la transfusion et responsable de l'activation *in situ* des PMN accumulés dans les poumons aboutissant à la lésion de l'endothélium des capillaires pulmonaires (Silliman et al. 2003b).

#### Les facteurs de risque chez le patient transfusé

Selon cette hypothèse les deux étapes de sensibilisation puis d'activation du PMN se succèdent et sont indépendantes; le patient se trouve dans une condition clinique favorisante pouvant sensibiliser les neutrophiles et l'endothélium pulmonaire (Tableau 9). Ces situations

sont *a priori* incapables à elles seules d'aboutir à un œdème lésionnel pulmonaire puisqu'elles ne fournissent pas le stimulus activant les PMN.

**Tableau 9. Situations favorisant la survenue du TRALI.**

*D'après Muller et al. Transfusion clinique et biologique (2005) (liste non exhaustive)*

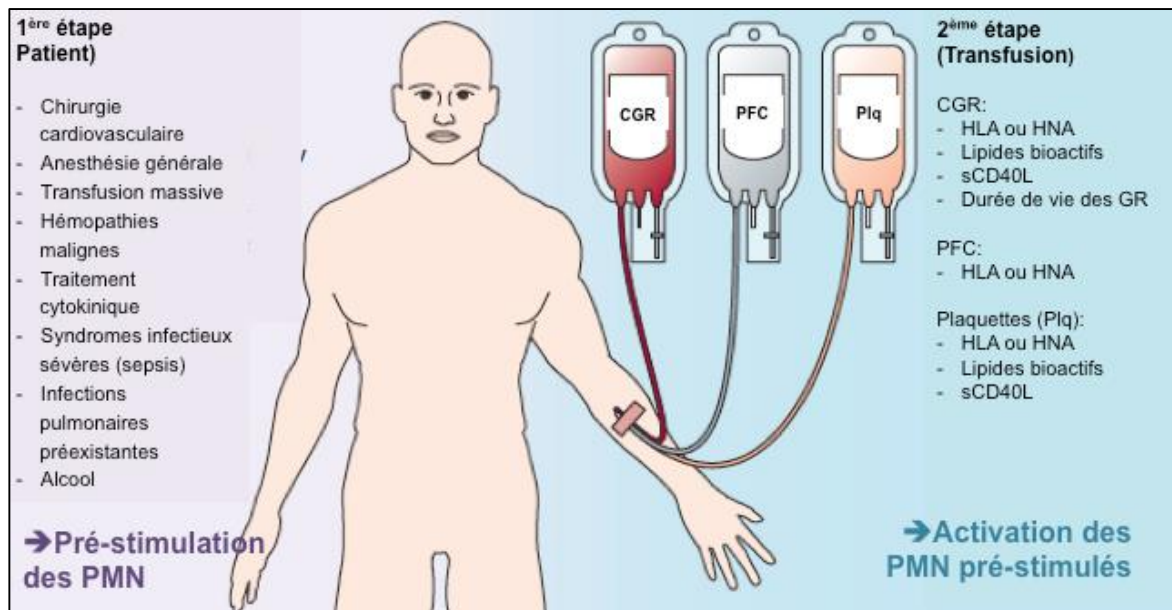
Conditions chirurgicales	Chirurgie cardiovasculaire
	Anesthésie générale
	Transfusion massive
Conditions médicales	Hémopathies malignes (en phase d'induction thérapeutique)
	Injections de cytokines
	Syndromes infectieux sévères
	Infections pulmonaires
Situations transfusionnelles particulières	Transfusion massive
Divers	Antécédents d'alcoolisme

Le TRALI survient donc en général chez des patients transfusés prédisposés et cette susceptibilité particulière correspond à des situations cliniques où les PMN seraient dans un état de pré-activation (Kleiman et al. 2004).

En résumé, les très nombreux modèles théoriques proposés dans la littérature sont encore aujourd'hui très débattus (Middelburg et al. 2015) même si une grande partie des chercheurs évoque un mécanisme étiopathogénique en faveur d'un modèle en deux étapes, appelé « *The two-event model* » (Silliman et al. 2006b) (Figure 3) :

- La première étape correspond à l'adhérence lâche des PMN stimulés et leur aggrégation au niveau de l'endothélium des capillaires pulmonaires, phase réversible en 24 heures à 72 heures (Ichinose et al. 1990).
- La seconde étape est celle de l'agression des endothéliums capillaires entraînant une augmentation de la perméabilité endothéliale pulmonaire. Elle est provoquée par un facteur déclenchant agissant sur les PMN préalablement stimulés.





**Figure 3. Facteurs entrant en jeu dans la survenue du TRALI :** la 1<sup>ère</sup> étape dépend d'une situation pré-disposante chez le patient transfusé, susceptible de pré-stimuler les PMN. La 2<sup>ème</sup> étape est conditionnée par l'apport dans le produit transfusé d'un facteur déclenchant l'activation des PMN préalablement « primés ». Adapté de la Revue de Vlaar A.P. et al, Lancet 2013

### II.3.3 Un cas particulier : le TRALI inversé

Wolf et Canal évoquèrent en 1976 l'apparition d'un œdème pulmonaire lésionnel dû à la présence d'anticorps chez le receveur (Wolf et al. 1976). Le TRALI d'évolution mortelle était survenue chez une patiente présentant des anticorps anti-HLA de classe I (anticorps anti-HLA-A11). L'antigène correspondant était présent sur les neutrophiles contenus dans le produit sanguin du donneur. Plus tard en 1985, Popovsky et Moore évaluaient la survenue d'un TRALI inversé dans 5% des cas (Popovsky et al. 1985b).

## II.4 Les modèles expérimentaux

L'étude de modèles expérimentaux a contribué à l'obtention de données précieuses concernant les facteurs impliqués dans la survenue du TRALI. Ces données montrent la multiplicité des voies physiopathologiques qui peuvent conduire au TRALI. Le Tableau 10 résume les différents modèles expérimentaux décrits.

**Tableau 10. Données expérimentales contribuant à une meilleure connaissance physiopathologique dans la survenue du TRALI.**

Matériel	Auteurs	Espèce	Résultats
<b>In Vivo</b>			
Sang avec anti-granulocytes	Brittingham, 1957	Homme	Œdème pulmonaire avec 50 mL de sang contenant des anti-granulocytes
mAb anti-H-2 <sup>d</sup> , classe I : mAb 34-1-2s	Matthay, 2006	Souris	Létalité 50% ; Dépendance des PMN et des FcR $\gamma$ (souris FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> ) ; Indépendance de C5aR <sup>-/-</sup>
	Hicks, 2011	Souris	Dépendance des macrophages Activation du complément et production de C5a
Anti-BALB.K anti BALB/c	Logdberg, 2009, Sheppard 2007	Souris	Dépendance d'un priming par LPS et d'une vitesse d'injection lente
mAb CMH Classe I : OX-18 et OX-27 mAb CMH Classe II : OX-3 et OX-6	Silliman, 1998, 2006	Rat	2 évènements nécessaires : 1- LPS 2- MAB Classe. I Anti-Classe II et anti-granulocytes : inopérants
<b>Ex Vivo sur un poumon isolé</b>			
<b>Explant pulmonaire</b>	Seeger, 1990	Lapin	Nécessité d'un anticorps, de polynucléaires et de complément
	Silliman, 1998	Rat	Nécessité de 2 évènements : LPS + plasma de sang conservé
	Sachs, 2006	Rat	Nécessité d'une quantité suffisante de l'Ag (HNA-2A) qui peut être augmenté par le fMLP, ou d'une double frappe
<b>In Vitro sur cellules</b>			
<b>Monocytes isolés</b>	Kopko, 2003	Homme	Induction de l'expression de l'IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ et du facteur tissulaire (TF) sur des monocytes par un anti-classe II
	Wyman, 2002	Homme	Induction de molécules d'adhérence par LPS et adhérence des PMN non activés sans dommage cellulaire. Cytolys après addition de Lyso-PC
<b>Cellules HMVEC</b>	Silliman 2007	Homme	Lyse par anti-HNA-3a de cellules préalablement stimulés par du LPS
	Khan, 2006	Homme	Lyse des cellules par le CD40L développé dans le surnageant de plaquettes conservées

## **II.5 Stratégies et prévention mises en place pour prévenir du risque de TRALI**

### **II.5.1 La déleucocytation**

Des activateurs lipidiques (Lyso-Pc) se développent essentiellement au cours de la conservation des plaquettes et des leucocytes (Gajic et al. 2007 ; Maslanka et al. 2012). Du fait de la présence d'un volume résiduel de leucocytes dans les PSL (Zallen et al. 1999 ; Phipps et al. 2001), la déleucocytation systématique de tous les PSL joue un rôle important dans la prévention du TRALI (ANSM 2012). En effet, elle permet de limiter la libération de ces lipides activateurs mais également de réduire les cibles potentielles d'une agression des leucocytes par les anticorps du receveur, limitant ainsi les risques de TRALI inversé.

### **II.5.2 La déplasmatisation**

La présence d'un volume résiduel de 50 mL de plasma dans tous les PSL explique l'implication de tous les types de produits sanguins dans le TRALI (ANSM 2012 ; Popovsky 2001 ; Weber et al. 2014). Le lavage pour préparer les PSL déplasmatisés est susceptible de retirer tous les médiateurs, immunologiques ou non, présents dans le plasma et qui sont en cause dans le TRALI.

### **II.5.3 Eviction des donneurs impliqués et/ou à risque dans le déclenchement du TRALI chez le receveur**

Tous les produits sanguins susceptibles de présenter des anticorps anti-HLA sont éliminés, diminuant ainsi fortement le nombre de produits sanguins disponibles à la transfusion (Insunza et al. 2004). La présence des anticorps anti-HLA est plus fréquente chez les femmes (Endres et al. 2010 ; Powers et al. 2008) que chez les hommes alors que la proportion de femmes parmi les donneurs est de 51% contre 49% des donneurs masculins (rapport hémovigilance 2014). Un dépistage systématique d'anticorps anti-HLA est réalisée chez les femmes ayant eu au moins une grossesse entraînant une diminution du risque de TRALI de 30% à 75% (Wiersum-Osselton et al. 2011 ; Muller et al. 2015). Les donneuses parturientes jouent un rôle considérable dans l'approvisionnement en sang mais les risques d'allo-immunisation lors de leur grossesse ont fait reconsidérer l'utilisation de leurs dons. Ces mesures préventives semblent assez radicales dans la mesure où le nombre de dons ne suffit pas à combler les besoins en produits sanguins.

## **TROISIEME CHAPITRE**

### **LES ACTEURS PRINCIPAUX DANS LA SURVENUE DU TRALI**

#### **I. Le système HLA**

##### **I.1 Généralités**

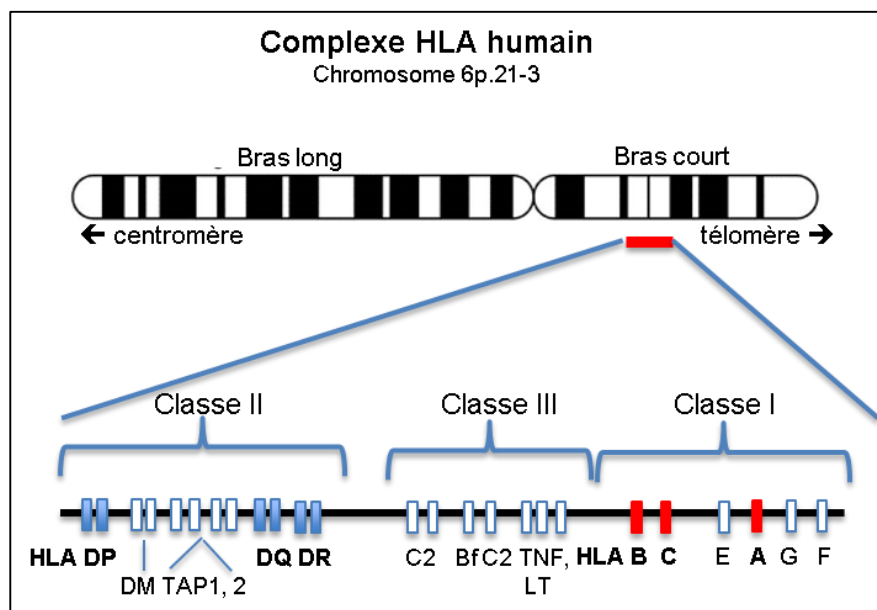
A partir des années 1930, des observations expérimentales de rejet de greffes cutanées entre des souris génétiquement non apparentées ont mené à la découverte du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (Gibson et al. 1943). Dès le début des années 50 (Dausset 1958), le rejet de greffe entre donneurs et receveurs différents humains fut à l'origine de la découverte de structures analogues chez l'homme par Jean Dausset, lauréat du prix Nobel de médecine en 1980 (Silvestri 2010). C'est lors de son activité de transfuseur-réanimateur pendant la seconde guerre mondiale que Jean Dausset établit l'existence de groupes leucocytaires, de même qu'il y en a pour les érythrocytes (groupe A, B, AB et O). Bien qu'il ait été finalement détecté sur la quasi-totalité des cellules nucléées, le CMH humain est alors dénommé HLA (*Human Leukocyte Antigen*) car la première molécule d'histocompatibilité identifiée avait été repérée comme un antigène leucocytaire (Dausset 1958).

##### **I.2 Génétique du système HLA**

Les gènes HLA codent pour des protéines membranaires HLA qui fixent et présentent les peptides antigéniques au récepteur présent à la surface du lymphocyte T (TCR) pour déclencher une réponse immunitaire adaptée. Le système HLA a un rôle fondamental dans la réponse immunitaire. Les protéines membranaires HLA, que l'on appelle communément les molécules HLA, permettent la reconnaissance par l'organisme des peptides endogènes « du soi » ou des peptides exogènes « du non-soi » (Klein et al. 2000). La région HLA est située sur le bras court du chromosome 6 sur la bande 6p.21-3, excepté pour la chaîne  $\beta$ 2-microglobuline de la molécule HLA de classe I dont le gène codant est situé sur le chromosome 15. Le système HLA s'étend sur une distance d'environ 4000kb, ce qui correspond à 1/1000 du génome humain (Revillard 2001).

Le système HLA est subdivisé en 3 régions qui contiennent chacune de nombreux gènes (Figure 4) :

- La région de classe I correspond aux protéines HLA de classe I qui sont codées par 3 gènes HLA : HLA-A, HLA-B, HLA-C.
- La région II correspond aux protéines HLA de classe II codées par 3 paires de gènes HLA : HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1).
- Située entre les régions de classe I et de classe II, la région III ne renferme pas de gènes intervenant dans la présentation antigénique. Elle contient des gènes codant pour des protéines du système du complément (C2, C4, facteur B), pour le TNF et pour les lymphotoxines (Caroll et al. 1984).



**Figure 4. Représentation schématique des gènes HLA** illustrant les principaux gènes codant pour les molécules. La taille des gènes et les distances qui les séparent ne sont pas représentées à l'échelle. Le locus de classe III concerne des gènes qui codent des molécules autres que des molécules présentatrices de peptides. LT : lymphotoxine ; TAP : transporter associated with antigen processing, TNF : tumor-necrosis factor. D'après *Immunité*, ed. de boeck, 2009.

Le système HLA représente un système polymorphe et polygénique (Kissmeyer-Nielsen et al. 1968). Le polymorphisme du complexe HLA s'explique par l'existence d'un très grand nombre d'allèles pour chaque gène HLA (IMGT/HLA database ; Marsh 2016). Chaque individu est hétérozygote pour les gènes HLA, et n'exprime qu'un ou deux des allèles de chaque gène. Le grand nombre de combinaisons alléliques pour les différents gènes explique la grande diversité du système. Il existe pour les deux chromosomes 6 de chaque individu plus de  $10^{10}$  combinaisons génotypiques possibles : il est donc très difficile de trouver deux

individus non apparentés HLA identiques dans la population générale, notamment lors de la compatibilité entre un receveur et un donneur d'organe.

La transmission des gènes HLA est codominante puisque les 2 allèles parentaux pour chaque gène sont exprimés : l'ensemble des gènes HLA ou haplotype HLA de l'un des chromosomes paternels et de l'un des chromosomes maternels est transmis en « bloc » à la descendance. Pour les deux parents, quatre haplotypes au total sont définis (deux du père et deux de la mère) : chaque enfant reçoit un haplotype venant du père et un haplotype venant de la mère.

La grande diversité des molécules HLA au niveau individuel résulte de toutes ces caractéristiques génétiques (Figure 5)

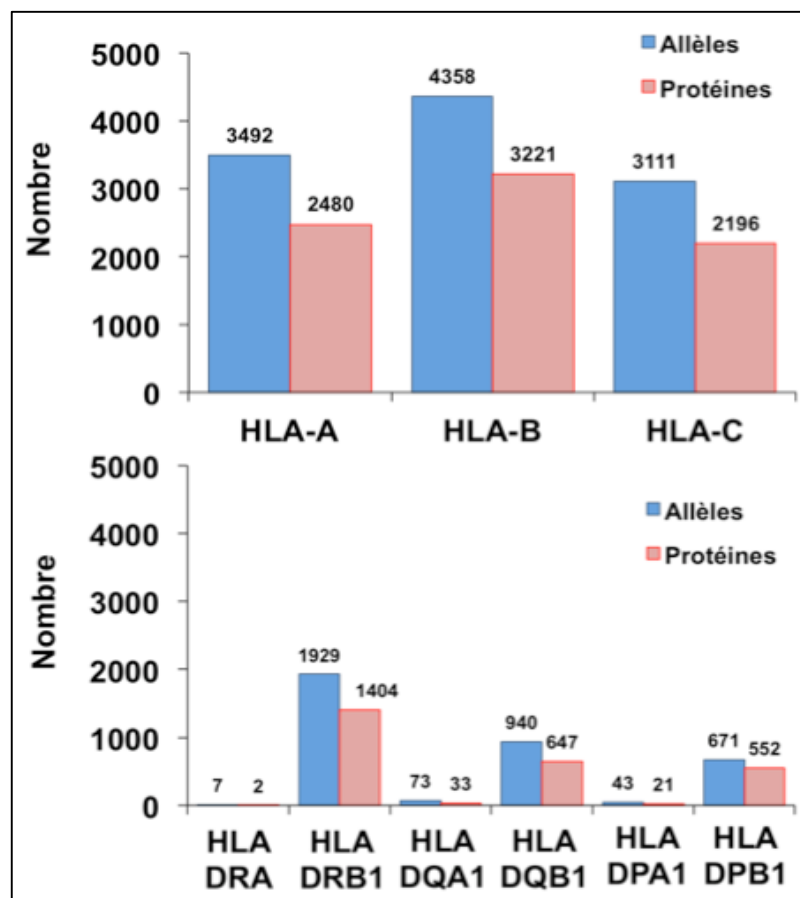


Figure 5. Nombre d'allèles et de protéines pour chaque gène HLA expliquant le polymorphisme du système HLA

### I.3 Structure générale des molécules HLA

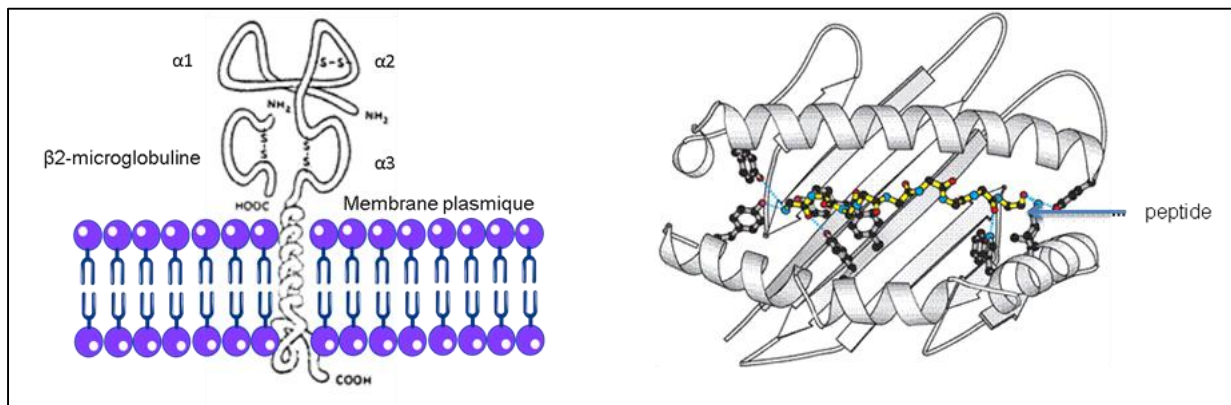
Les molécules HLA de classe I et II sont des glycoprotéines membranaires. De manière générale, elles ont la même structure : ce sont des hétérodimères formés de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  qui s'apparient de manière non covalente (Figures 6 et 7). La partie extracellulaire expose deux domaines proximaux ainsi que deux domaines distaux comportant chacun une plage de feuilletts  $\beta$  plissés surmontée d'une hélice  $\alpha$ .

L'appariement des deux domaines distaux délimite un sillon de présentation, dans lequel peut se lier un peptide. Le peptide est retenu par des liaisons non covalentes sur toute la longueur du sillon, ce qui stabilise la molécule HLA.

#### I.3.1 Molécules HLA de classe I

##### I.3.1.1 Structure

Les molécules HLA de classe I sont composées par l'association d'une chaîne lourde  $\alpha$  de 45 kDa ancrée dans la membrane et d'une chaîne légère, la  $\beta$ 2-microglobuline de 12kDa (Bjorkman et al. 1987) (Figure 6).



**Figure 6. Représentation des molécules HLA de classe I.** Elles sont constituées (à gauche) par l'association non covalente d'une chaîne  $\alpha$  avec 3 domaines extracellulaires ainsi que par une chaîne  $\beta$ 2-microglobuline. La structure en cristallographie à droite (vue par le dessus) des molécules HLA montre comment les peptides (points jaune, rouge, bleu, noir) se fixent au niveau des sillons de liaisons aux peptides et peuvent être reconnus par les lymphocytes T. D'après *Immunité*, ed. de boeck, 2009.

La chaîne  $\alpha$  est codée par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C. Elle est constituée par :

- 3 domaines extracellulaires de la superfamille des immunoglobulines en position N-terminale : chaque domaine  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 est constitué de 90 acides aminés et est codé par un exon. Ce sont les gènes qui codent pour les domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 qui présentent un polymorphisme pour les molécules HLA de classe I.



- Une partie transmembranaire hydrophobe d'environ 20 acides aminés
- Une partie intra-cytoplasmique en C-terminale de 4 acides aminés

La chaîne  $\beta$ 2-microglobuline est une protéine invariante de la superfamille des immunoglobulines qui est codée par un gène qui n'appartient pas au complexe HLA. Elle est constituée par un seul domaine extra-membranaire. Le gène qui code pour la chaîne  $\beta$ 2-microglobuline ne présente pas de polymorphisme (elle est la même pour chaque individu). Elle possède une fonction de stabilisation de l'hétérodimère et de transport de la chaîne lourde  $\alpha$  à la membrane cellulaire.

Le domaine  $\alpha$ 3 de la chaîne lourde  $\alpha$  s'apparie à la  $\beta$ 2-microglobuline. Les domaines distaux  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2, délimitent la région de liaison au peptide antigénique. Les extrémités des hélices  $\alpha$  de ces domaines sont rapprochées et ferme le sillon. Le peptide emprisonné dans ce sillon est de petite taille, en moyenne 9 acides aminés, car ses deux extrémités sont bloquées dans le sillon (Figure 6, droite) (Madden 1995).

### ***1.3.1.2 Fonctions et localisation des molécules HLA de classe I***

Les molécules HLA de classe I sont exprimées sur pratiquement toutes les cellules nucléées de l'organisme. Elles ont pour fonction de présenter aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques les antigènes issus de la dégradation de peptides d'origine endogènes (antigènes du soi).

## **1.3.2 Molécules HLA de classe II**

### ***1.3.2.1 Structure***

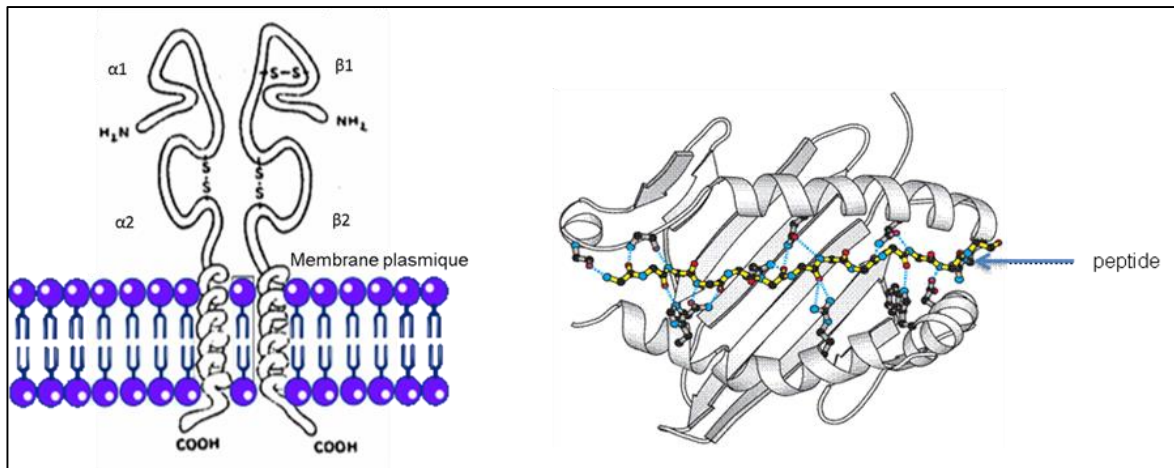
Chaque paire de gènes (HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DP) code pour deux chaînes polypeptidiques, une chaîne  $\alpha$  de 34kDa et une chaîne  $\beta$  de 29kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Figure 7). (Reinherz et al. 1999).

Elles sont liées entre elle par une liaison non covalente et sont toutes deux ancrées à la membrane.

Les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  possèdent :

- une partie extra-membranaire en N-terminale de 190 acides aminés comportant deux domaines extracellulaires : un domaine  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 pour la chaîne  $\alpha$  ; un domaine  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 pour la chaîne  $\beta$ . Le polymorphisme des molécules HLA de classe II s'explique par les variations de séquences en acides aminés des domaines  $\alpha$ 1 et  $\beta$ 1 alors que les domaines  $\alpha$ 2 et  $\beta$ 2 sont invariants.
- Une partie transmembranaire formée d'une vingtaine d'acides aminés
- Une partie intracytoplasmique en C-terminale de 4 acides aminés.





**Figure 7. Représentation des molécules HLA de classe II.** Elles sont constituées (à gauche) par l'association non covalente d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  composée chacune de deux domaines extracellulaires. La structure en cristallographie, à droite (vue de dessus) des molécules HLA montre comment les peptides (points rouge, jaune, bleu, noir) se fixent sur les planchers des sillons de liaisons aux peptides et peuvent être reconnus par les lymphocytes T. D'après *Immunité*, ed. de boeck, 2009.

L'appariement des domaines distaux  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  délimite la région de liaison au peptide antigénique. Les extrémités de leurs hélices  $\alpha$  sont moins rapprochées que dans le cas des molécules HLA de classe I. Le peptide peut déborder et donc être plus long (entre 12 et 25 acides aminés).

### 1.3.2.2 Fonctions et localisation des molécules HLA de classe II

Les molécules HLA de classe II sont exprimées par un nombre de cellules plus limitées que les molécules HLA de classe I. Elles sont présentes à la membrane plasmique des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques, des lymphocytes B qui sont considérées comme des cellules présentatrices de l'antigène et les lymphocytes T activés. Leur fonction est de présenter aux lymphocytes T CD4 helper (ou auxiliaire) les peptides d'origine exogène (agents pathogènes, corps apoptotiques = antigènes du « non soi »).

## I.4 Typage et nomenclature HLA

Le typage HLA correspond à l'identification de l'ensemble des gènes HLA d'un individu. Il permet de savoir de quel haplotype de son père et de sa mère un individu hérite. Un système international de nomenclature (IMGT/HLA database ; Marsh S.G, 2016) a été institué et mis à jour en ligne régulièrement. L'utilisation de cette nomenclature internationale constitue une exigence tant pour la pratique médicale que pour les publications scientifiques.

La nomenclature d'un typage HLA dépend de la technique de typage utilisée (Figure 8) (Klein et al. 2000). Nous avons vu précédemment qu'il existe un grand nombre d'allèles répertoriés pour tous les loci. Dans le cas d'une technique dite de sérologie (que nous développerons dans les Matériels et les Méthodes), la nomenclature identifie le locus suivi d'un numéro identifiant l'antigène (par exemple, HLA-A2, HLA-A3, HLA-B8, HLA-B27). Cette technique identifie directement le composant antigénique HLA exprimé à la membrane de la cellule. La nomenclature dite générique ou allélique utilisée en biologie moléculaire identifie la spécificité allélique HLA à partir de l'ADN. Elle est représentée par le nom du gène, suivi d'un astérisque et d'un numéro à deux chiffres (qui définit la spécificité de l'allèle) ou quatre à huit chiffres (qui précise le variant allélique d'un allèle donné). Un typage HLA avec deux chiffres (ou deux digits) correspond à une résolution générique (basse résolution) (par exemple, HLA-A\*02, HLA-A\*03, HLA-B\*08, HLA-B\*27). Un typage HLA avec quatre chiffres ou huit chiffres (ou digits) correspond à une résolution allélique (haute résolution) (par exemple, HLA-A\*02:01, HLA-A\*03:01, HLA-B\*07:02, HLA-B\*27:05).

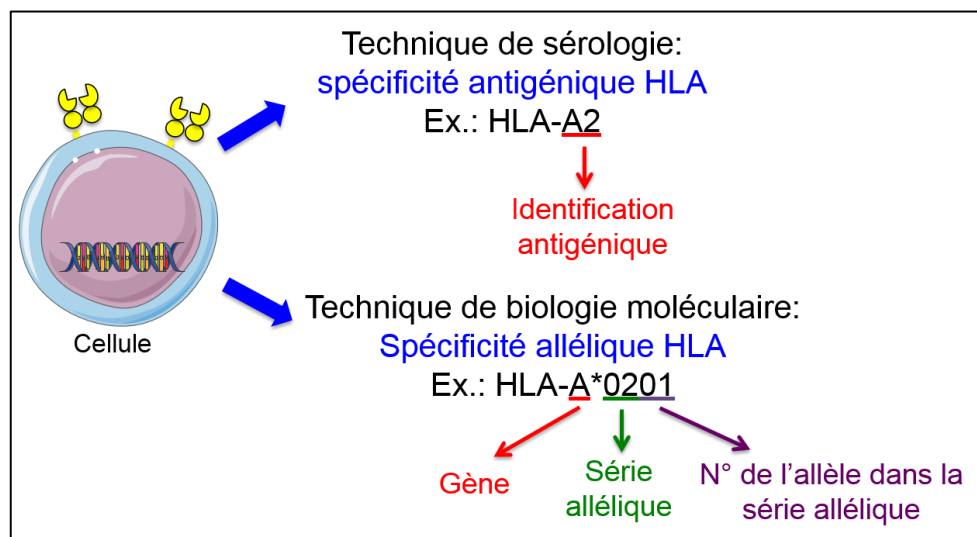


Figure 8. La nomenclature HLA.

## I.5 L'allo-immunisation HLA

L'apparition d'une allo-immunisation contre les molécules HLA résulte :

- **Des greffes d'organes allogéniques** (Halloran et al. 1992) : les antigènes HLA portés par le greffon sont susceptibles de provoquer une immunisation chez le receveur lorsqu'il y a une incompatibilité dans le système HLA. Le patient receveur développe des anticorps anti-HLA spécifiques contre le greffon du donneur ; on parle alors de DSA (« *Donor Specific Antibody* »).
- **Des transfusions** (Saw et al. 2013): l'allo-immunisation anti-HLA transfusionnelle concerne tous les composants cellulaires présentant à leur surface des molécules HLA notamment les plaquettes (à l'exception des globules rouges qui n'expriment aucune molécule HLA). Ces types de transfusion sont susceptibles d'entraîner chez le patient transfusé une immunisation et le développement d'anticorps contre les molécules HLA.
- **Des grossesses** : les femmes enceintes multipares développent des anticorps anti-HLA contre les antigènes HLA de classe I ou classe II d'origine paternelle portés par le fœtus. Ces anticorps ne jouent pas de rôle néfaste connu vis-à-vis du fœtus.

L'évaluation de l'incidence de l'allo-immunisation après un accouchement a fait l'objet de nombreux travaux. Les premiers travaux de Payne (Payne 1962) montrent que des anticorps étaient présents chez environ 18% des femmes en fin de grossesse et que le pourcentage augmentait avec le nombre de grossesses (pouvant atteindre 60% pour 5 grossesses). Ce même auteur montre que cette allo-immunisation était encore détectable trois ans après la fin de la grossesse, et dans certains cas, jusqu'à huit ans après la dernière grossesse.

Plus récemment en 2008, les travaux de Powers *et al* (Powers et al. 2008) montrent une prévalence d'anticorps anti-HLA de 25% chez les donneuses quels que soient leurs antécédents et de 12% chez les donneurs masculins ayant des antécédents transfusionnels.

Une étude LAPS (Leukocyte Antibody Prevalence Study) publiée par l'équipe de Triulzi (Triulzi et al. 2009) basée sur l'analyse de 5 834 femmes qui avaient eu de 0 à plus de quatre grossesses montrait que le taux d'immunisation aux anticorps était proportionnel au nombre de grossesses avec des chiffres de 1,7% chez les femmes nullipares, 11,2% pour 1 grossesse, 22,3% pour 2 grossesses, 27,5% pour 3 grossesses et ce taux atteignait 32,2% pour les femmes ayant au moins 4 grossesses (dépistage LabScreen, One Lambda).

Une autre étude récente publiée en 2013 (Masson et al. 2013) analysait le taux d'allo-immunisation, évalué chez 294 femmes ayant eu au moins une grossesse était de 54,4%.

## **I.5.1 Structure, propriétés et fonction des immunoglobulines**

### **I.5.1.1 Généralités**

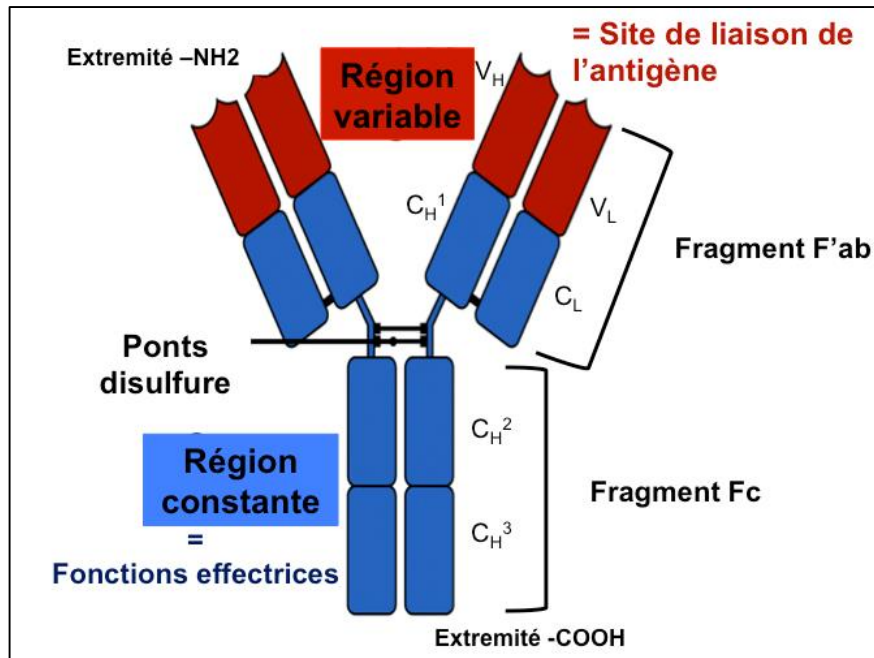
Les anticorps représentent les effecteurs solubles de l'immunité humorale spécifique. Ils sont sécrétés par les plasmocytes, après la différenciation des lymphocytes B à la suite d'une stimulation antigénique. Au départ, le nom générique d'anticorps fut donné par Paul Erlich en 1897 après avoir découvert dans le sang de sujets immunisés contre la diphtérie ou le tétanos, la présence de substance capable de neutraliser la toxine. En 1958, le terme d'immunoglobuline fut ensuite donné aux anticorps pour leur structure particulière dont l'organisation de base fut découverte grâce aux travaux de Porter et d'Edelman (prix Nobel de médecine en 1972) (Porter 1972). Les immunoglobulines ont initialement été isolées à partir de sérums de malades atteints de myélome multiple pour qui la séparation des protéines sériques par électrophorèse a révélé que les immunoglobulines migrent au niveau de la fraction des  $\gamma$ -globulines. Porter et Edelman ont montré que la digestion par 2 enzymes hydrolytiques, la pepsine et la papaïne pouvait couper l'immunoglobuline en plusieurs parties au niveau de ponts disulfures. Elles sont présentes sous trois formes : une forme circulante ou soluble dans le sérum, une forme membranaire à la surface des lymphocytes B et une forme sécrétée au niveau des muqueuses (digestives, respiratoires, bronchiques, salives...).

### **I.5.1.2 Structure des immunoglobulines**

La structure de base des immunoglobulines (Ig) est représentée par la présence de 4 quatre chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (H pour heavy) et 2 chaînes légères (L pour light) reliées entre elles par des ponts disulfures (Figure 9).

La chaîne lourde a une masse moléculaire d'environ 50 kDa. Il en existe cinq types, désignés par la lettre grecque  $\gamma$  pour IgG (gamma),  $\alpha$  pour IgA (alpha),  $\mu$  pour IgM (mu),  $\delta$  pour IgD (delta),  $\epsilon$  pour IgE (epsilon) qui définissent les cinq classes ou l'isotype des immunoglobulines. Certains isotypes d'Ig peuvent être divisés en sous-classes telles que les IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) et les IgA (IgA1, IgA2). La chaîne légère a une masse moléculaire d'environ 25kDa. Il en existe deux types: les chaînes légères  $\kappa$  (kappa) ou  $\lambda$  (lambda).

La masse moléculaire totale d'une immunoglobuline est donc de 150kDa ; l'association d'une chaîne lourde avec une chaîne légère est organisée de manière symétrique.



**Figure 9. Structure d'une immunoglobuline G.** En rouge, est représentée la région variable qui est le site de liaison à l'antigène. En bleu, est représentée la région constante qui contient les fonctions effectrices de l'immunoglobuline.

Chaque chaîne est organisée en domaine d'environ 110 acides aminés: la chaîne lourde contient quatre (IgG, IgA, IgD) ou cinq (IgM, IgE) domaines globulaires alors que la chaîne légère en contient deux. Le premier domaine des chaînes H et L au niveau N-terminal représente la région variable alors que les autres domaines en C-terminal définissent la région constante. La région variable d'une immunoglobuline est donc constituée du domaine V<sub>H</sub> de la chaîne H et du domaine V<sub>L</sub> de la chaîne L alors que la région constante comprend les domaines C<sub>H</sub><sup>1</sup> à C<sub>H</sub><sup>3</sup> (ou C<sub>H</sub><sup>3</sup>) de la chaîne H et du domaine C<sub>L</sub> de la chaîne L. Le clivage enzymatique par digestion avec la papaïne ou bien la pepsine à des endroits particuliers des chaînes permet d'identifier deux fragments : le fragment F'ab (*Fragment antigen binding*) du côté amino-terminal et 1 fragment Fc (*Fragment cristallizable*) appelé ainsi pour sa capacité à cristalliser facilement. C'est au niveau de la région variable que l'on retrouve les fragments F'ab qui permettent la reconnaissance de l'antigène alors que les fragments Fc, retrouvés au niveau de la région constante possèdent les fonctions effectrices de l'immunoglobuline.

### 1.5.1.3 Fonction des immunoglobulines

#### Fonctions effectrices des immunoglobulines :

- *Neutralisation des toxines bactériennes* : de nombreuses bactéries exercent leur pouvoir pathogène en sécrétant des toxines, par exemple. Normalement, la toxine interagit avec un récepteur spécifique à la surface de la cellule cible pour exercer son pouvoir pathogène. Dans le cas de la neutralisation de la toxine, les immunoglobulines qui reconnaissent la toxine via leur fragment F'ab empêchent l'adhésion bactérienne.
- *Oponisation du pathogène par phagocytose* : ce mécanisme conduit à la dégradation des particules opsonisées ou internalisées. De nombreuses bactéries sont ingérées puis détruites par les cellules phagocytaires. Cependant, certaines bactéries pathogènes possèdent des capsules polysaccharidiques qui empêchent leur phagocytose directe. Or, ces bactéries deviennent sensibles à la phagocytose lorsqu'elles sont recouvertes d'anticorps spécifiques. Le recouvrement du pathogène par des IgG va l'orienter vers la cellule cible en formant une liaison entre les fragments Fc des IgG et les récepteurs Fc de la cellule phagocytaire. Nous développerons les récepteurs Fc des cellules phagocytaires ainsi que leur processus de phagocytose ultérieurement.
- *Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)* : la fixation d'une immunoglobuline à un antigène peut entraîner l'activation de la voie classique du complément et l'hydrolyse en cascade des protéines du complément. Cette activation en cascade aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire et conduit à la lyse de la cellule sur laquelle se sont initialement fixés les anticorps.
- *Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)* : des cellules telles que les cellules NK peuvent interagir avec un pathogène recouvert d'IgG via leur récepteur Fc sans l'intervention du mécanisme de phagocytose. Celles-ci vont directement entraîner l'apoptose de la cellule par la voie perforine/granzyme.

#### Liaison antigène-anticorps :

Dans la région variable des chaînes lourdes et légères, il existe une très grande variabilité de séquences d'acides aminés d'une immunoglobuline à l'autre. Elles contiennent des régions hypervariables que l'on appelle «régions déterminant la complémentarité» ou CDR (pour « *Complementary Determining Region* ») ainsi que des régions charpentes FR (pour « *Framework Regions* ») qui contrairement aux régions CDR, sont invariantes. Au niveau des fragments F'ab, ce sont les régions CDR qui déterminent la spécificité à un antigène. Le

repliement de ces régions permettant la formation de boucles et le rapprochement des différents CDR constituent le site de liaison de l'antigène.

De nombreuses liaisons non covalentes participent à l'interaction entre l'antigène avec leurs sites de liaison CDR de l'immunoglobuline : il peut s'agir de liaisons hydrogène ou hydrophobes, des forces de Van der Waals et électrostatiques qui sont faibles mais dont leur grand nombre permet une énergie de liaison élevée entre le déterminant antigénique, appelé l'épitope et le site de l'anticorps, appelé le paratope. La force de liaison du complexe antigène-anticorps représente l'affinité de l'anticorps. L'avidité désigne la force avec laquelle un anticorps multivalent se fixe à un antigène plurivalent.

## **I.6 Etude épidémiologique de l'engagement des anticorps anti-HLA dans la survenue du TRALI**

### **I.6.1 Les anticorps anti-HLA de classe I**

Aujourd'hui, l'implication des anticorps anti-HLA de classe I est basée sur des études épidémiologiques à partir de cas de TRALI purement descriptifs répertoriés dans la littérature et sur des travaux expérimentaux réalisés sur des animaux et dont les données ne permettent pas la compréhension exacte des mécanismes physiopathologiques du TRALI.

Le rôle étiologique des anticorps anti-HLA a été suggéré dès 1985 à propos de 36 cas de TRALI dont 26 (72%) avaient reçu des produits sanguins contenant des anticorps anti-HLA de classe I correspondant à au moins un des antigènes HLA du receveur (Popovsky et al. 1985). Pour rappel, la cible des anticorps anti-HLA de classe I est ubiquitaire, représentée sur toutes les cellules nucléées : PMN, monocytes/macrophages, plaquettes, cellules endothéliales et pneumocytes... Ceci suggère que le schéma physio-pathogénique de leur action doit être plus complexe qu'une simple interaction avec les PMN. Il a en effet été montré que les cellules endothéliales sont susceptibles de s'activer et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires par pontage de leurs molécules de classe I par un anticorps (Blan et al. 1999). Cette activation met en jeu différents facteurs pro-inflammatoires dont C5a, le TNF $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-8 (Ward 1996) et crée ainsi une situation favorable à une activation des PMN.

Dans un modèle murin *in vivo* développé à partir de souris congéniques résistantes (isogéniques sauf pour le locus H-2, équivalent murin du CMH humain) (Wyman et al. 2002), il a été montré que l'anticorps monoclonal anti-H-2d (l'équivalent de l'anticorps anti-HLA de classe I chez l'humain) injecté par voie veineuse provoquait un œdème pulmonaire chez les souris BALB/c mâles porteuses de cet antigène. Les souris femelles de cette même lignée ne sont pas permissives à cet œdème sauf si elles ont été préalablement stimulées (par voie



endotrachéale). Mais dans la souche BALB.K qui ne porte pas cette spécificité H-2 l'œdème ne peut pas être provoqué. Dans un modèle identique, la déplétion en neutrophiles de souris de la souche BALB/c H-2d supprime cette sensibilité. Ces mêmes animaux deviennent sensibles à ce stimulus lorsqu'on leur injecte des PMN de souche H-2d différente, c'est-à-dire non H-2d. Enfin dans ce même travail, lorsque les PMN réinjectés proviennent d'animaux ayant les gènes codant pour les récepteurs Fc $\gamma$  invalidés pour les granulocytes, ces souris FcR $\gamma^{-/-}$ , sont réfractaires au déclenchement d'un ALI par ce même anticorps monoclonal (Lögberg et al. 2009; Looney. et al. 2006a et 2006b).

### I.6.2 Les anticorps anti-HLA de classe II

Le rôle déclenchant des anticorps anti-HLA de classe II dans le TRALI a été mis en évidence en 2001 et confirmé en 2002 puis en 2011 (Kopko et al. 2001 ; Varela et al. 2002 ; Sachs et al. 2011). Les monocytes, macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés ainsi que les cellules endothéliales activées expriment des molécules de classe II. En revanche les PMN n'expriment pas ces antigènes. Dans une étude portant sur les monocytes mis en contact *in vitro* avec des anticorps spécifiquement anti-classe II, une augmentation de l'expression de marqueurs de l'inflammation IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et facteur tissulaire a été observée. Celle-ci ne survenait que si la cible antigénique était présente sur les cellules (Sachs et al. 2011).

L'hypothèse proposée alors est l'implication des anticorps anti-HLA de classe II dans le déclenchement du TRALI *via* l'activation des monocytes. Ces cellules étant elles mêmes susceptibles d'activer les cellules endothéliales pulmonaires, de provoquer à leur surface l'expression de molécules d'adhésion et de stimuler puis d'activer les PMN par la libération de cytokines pro-inflammatoires.

Néanmoins, ces hypothèses se heurtent à une objection : le délai d'activation des monocytes par les anticorps anti-HLA de classe II et la quantité de cytokines produites localement sont peu compatibles avec le délai souvent très bref d'apparition du TRALI (Kopko et al. 2003 ; Sakagawa et al. 2007). Or, les monocytes activés sont capables de sécréter du TNF dans un délai compatible avec celui de l'émergence d'un œdème lésionnel pulmonaire mais l'étude anatomique d'un patient décédé d'un TRALI imputé à des anticorps anti-HLA de classe II n'a pas permis de démontrer la présence de ces médiateurs (Kao et al. 2003).

**Au regard des données de la littérature, les mécanismes impliquant les anticorps anti-HLA impliqués dans la survenue du TRALI, restent encore aujourd'hui très imprécis.**



## **II. Les cellules endothéliales et les polynucléaires neutrophiles : cellules clés dans la physiopathologie du TRALI**

### **II.1 L'endothélium**

#### **II.1.1 Origine des cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales (CE) dérivent de l'hémangioblaste qui représente un amas de cellules mésodermiques et dont les cellules situées à l'intérieur donnent naissance aux cellules souches hématopoïétiques tandis que celles situées en périphérie sont à l'origine des cellules endothéliales (Sabin 2002). Le terme hémangioblaste est maintenant utilisé pour définir une cellule ayant la capacité de donner soit une cellule précurseur de cellule endothéliale soit une cellule précurseur de cellule hématopoïétique (Dieterlen-Lievre et al. 2004).

#### **II.1.2 Propriétés des cellules endothéliales**

L'endothélium est constitué d'une couche monocellulaire de cellules épithéliales pavimenteuses qui tapissent la surface de tout le système cardiovasculaire. Les cellules endothéliales ont une forme relativement aplatie de taille moyenne : elles mesurent de 10 à 15µm de largeur et 20 à 50µm de longueur (Legrand 1987 ; Williams et al. 1995). Elles représentent une surface d'échange évaluée entre 280 et 350m<sup>2</sup> (Pries et al. 2006) voire de plus de 1000m<sup>2</sup> (West 1990) pour un poids total estimé à 1,5kg (Boneu et al. 1997). Les CE se distinguent des autres cellules par l'existence dans leur cytoplasme de structures en forme de bâtonnets appelées « corps de Weibel-Palade », lieu de stockage du facteur Willebrand. La CE est une cellule polarisée : par sa base, elle s'implante sur une membrane basale puis sur une matrice extracellulaire constituée de collagènes et de protéines d'adhésion alors qu'à sa face apicale (vasculaire), elle est en contact avec le sang. Les CE représentent la couche la plus interne des vaisseaux sanguins qu'elles tapissent et sont situées à l'interface entre le sang et le tissu. Dans ce contexte, l'endothélium vasculaire joue en même temps un rôle de barrière endothéliale et est un lieu d'échange stratégique. La cohésion entre les CE est assurée par des protéines d'adhésion localisées à la jonction inter-endothéliale.

#### **II.1.3 Fonctions des cellules endothéliales**

En plus d'être une barrière semi perméable pour réguler l'échange de substances nutritives avec le milieu intérieur, l'endothélium est un véritable tissu dynamique avec plusieurs

fonctions. Elles participent entre autre à la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse, du processus de thrombose, à la migration des PMN le long de la paroi vasculaire.

### **II.1.3.1 Barrière de perméabilité sélective**

Les CE régulent les échanges de molécules de taille variable entre le sang et le tissu. Les voies de transport au travers cette barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou au niveau des capillaires. La perméabilité sélective de cette interface cellulaire est essentielle, notamment lors de la réponse inflammatoire. Différentes voies de passage sont possibles à travers les cellules endothéliales sont possible en fonction de la taille des molécules (diffusion passive, pinocytose, transporteurs membranaires, transcytose...).

La perméabilité peut être augmentée sous l'effet de certains facteurs tels que l'histamine, la sérotonine, le facteur activateur des plaquettes (PAF), l'ATP et les leucotriènes.

### **II.1.3.2 Action anti-adhésive et adhésive**

Les CE expriment à leur surface des molécules d'adhésion pour les PMN, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes. Trois grandes familles de molécules d'adhésion vont intervenir lors de la migration des neutrophiles:

- Les sélectines (Carlos et al. 1994) : la E-sélectine (CD62E) et la P-sélectine (CD62P), responsables de l'étape du roulement des PMN sur la paroi vasculaire lors de la migration des neutrophiles.
- Les intégrines (Springer 1994) : ce sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques formées de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Les  $\beta 2$  intégrines sont principalement exprimées à la surface des PMN (LFA-1, Mac-1) et c'est lors du passage des PMN au travers l'endothélium que ces intégrines s'activent.
- La superfamille des immunoglobulines (Aplin et al. 1998) : c'est la famille des molécules d'adhésion la plus abondante sur les CE. La présence de ces molécules, en particulier ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, MadCAM-1 est nécessaire pour l'adhésion ferme des PMN à l'endothélium puisqu'elles servent de ligand pour les  $\beta 2$  intégrines des PMN.

L'action adhésive ou anti-adhésive des CE est tributaire de leur état d'activation : les CE au repos expriment peu de molécules d'adhésion mais sous l'influence de médiateurs inflammatoires, l'expression de ces molécules d'adhésion va entraîner une forte affinité avec

les intégrines des PMN (la transmigration endothéliale des PMN sera développée dans la partie II.2.3).

### **II.1.3.3 Rôle dans l'homéostasie vasculaire : action anti-thrombotique et thrombotique**

L'endothélium à l'état basal a un rôle anti-thrombotique et anti-adhésif afin d'assurer la fluidité sanguine (Vanhouette et al. 1989 ; Shimokawa et al. 1996 ; Furchgott et al. 1989) (Figure 10). De manière générale, le processus de thrombose est possible quand les plaquettes, activées par différents stimuli, libèrent l'ATP, l'ADP et la sérotonine qui vont, en association avec la thrombine, stimuler la libération de thromboxane A<sub>2</sub>. Il en résulte une agrégation plaquettaire. La CE utilise de nombreux mécanismes pour accomplir son rôle anti-thrombotique :

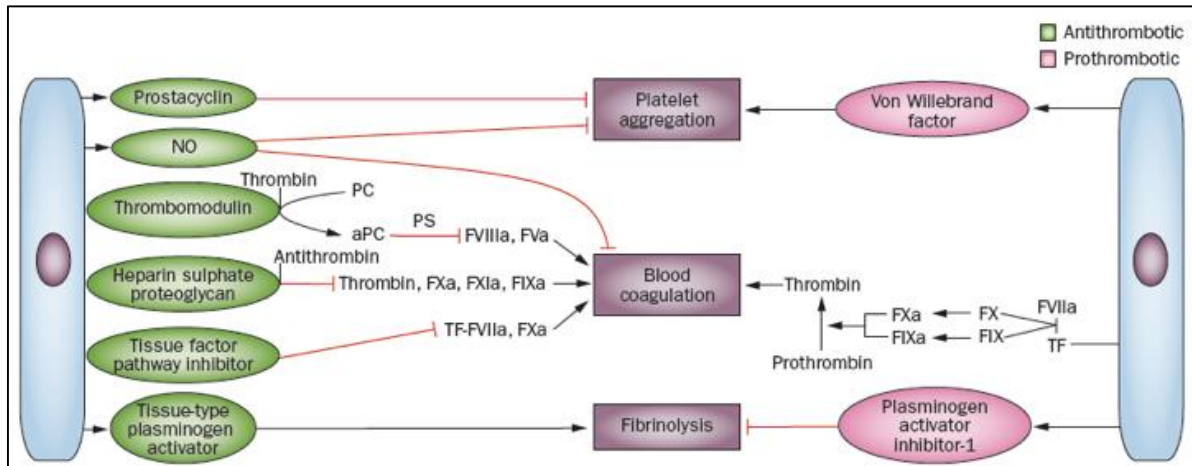
- La synthèse endothéliale de médiateurs vasodilatateurs tels que la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le nitrite d'oxyde (NO) permettent de réguler ce processus (Otsuka et al. 2012) En effet, la PGI<sub>2</sub> possède des propriétés anti-agrégantes et anti-adhérentes puisqu'elle inhibe l'agrégation plaquettaire mais aussi l'interaction entre les plaquettes et le collagène de la matrice extracellulaire. Quant au NO, celui-ci joue un rôle dans la régulation du flux sanguin en dilatant le vaisseau sanguin et en éliminant les micro-aggrégats dans la circulation sanguine.
- Les CE empêchent l'activation du système de coagulation par la production d'une glycoprotéine membranaire, la thrombomoduline, récepteur de la thrombine ou facteur IIa qui est un des facteurs initiateurs de la coagulation. La liaison de la thrombine à son récepteur restreint ainsi son apport à l'interface entre l'endothélium et la circulation sanguine. Elle conduit également à l'activation de la protéine C (PCa) qui est un inhibiteur très puissant des facteurs de la coagulation (facteur Va et VIIIa).
- L'endothélium exerce des activités anticoagulantes par d'autres voies telles que la captation et la dégradation de substances thrombogène (ADP, 5-hydrotryptophane).
- Les CE expriment à leur surface des protéoglycanes comprenant des glycosaminoglycanes tels que l'héparane sulfate et dont la charge négative repousse l'adhésion des plaquettes.

L'endothélium à l'état de repos joue un rôle clé dans la prévention de thromboses.

Au cours de l'inflammation, les propriétés de l'endothélium s'inversent, on parle alors de dysfonction endothéliale (Félétou et al. 2006) :

- La thrombomoduline est sous-réglée et n'apparaît plus à la surface endothéliale.
- Les cellules expriment le facteur tissulaire (FT), récepteur du facteur VII qui initie l'activation en cascade des facteurs de la coagulation (Facteur VIII, facteur de Willebrandt).

- Elles sécrètent un médiateur vasoconstricteur, l'endothéline-1 qui a une action d'activation plaquettaire.
- Les CE interviennent également dans la fibrinolyse en sécrétant l'activateur tissulaire endothéliale du plasminogène (t-PA) et l'inhibiteur activateur du plasminogène (PAI-1) qui forment un complexe macromoléculaire. Les CE activées sécrètent une quantité plus importante de l'inhibiteur PAI-1 ce qui entraîne le ralentissement du processus de fibrinolyse.



**Figure 10. L'action anti-thrombotique et thrombotique des cellules endothéliales.**  
D'après Otsuka F et al, 2012

#### II.1.4 La dysfonction endothéliale : impact des ROS

La dysfonction endothéliale est actuellement reconnue comme un marqueur précoce du risque athérogène, impliquée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Elliott 1998 ; Castellon et al. 2016). Le stress oxydant semble avoir un rôle déterminant dans la survenue de l'athérosclérose (Gimbrone 1995; Griendling et al. 2003a et 2003b). Dans les conditions physiologiques, les ions superoxydes, précurseurs des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) produits par les cellules endothéliales sont libérés en faible quantité et ont un rôle important dans des processus tels que la croissance, la migration, la sénescence, et l'apoptose des cellules endothéliales (Bonfont-Rousselot 2002). Le NO<sup>•</sup> est sécrété par l'endothélium par la NO synthase (eNOS) mais lors d'un état inflammatoire, l'expression de la NOS inductible (iNos) des cellules endothéliales contribue à une production massive de NO<sup>•</sup>. En cas de libération excessive d'ions superoxyde, ceux-ci interagissent avec le NO<sup>•</sup> pour former le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), composant très toxique. Cette interaction diminue alors la quantité de NO<sup>•</sup> endothélial, et diminue l'effet anti-thrombotique des cellules endothéliales (Elliott 1998). Par ailleurs, les ROS exercent des effets toxiques directs, en stimulant la formation des molécules d'adhésions cellulaires et de substances chimiotactiques, en

activant les métalloprotéases et en perturbant l'équilibre endothélial au profit de la vasoconstriction (Griendling et al. 2003a).

### **II.1.5 Perméabilité endothéliale**

De nombreuses situations physiologiques ou pathologiques, souvent liées à l'inflammation ou l'angiogénèse, perturbent l'intégrité de l'endothélium qui devient alors perméable. Il existe deux types de perméabilité endothéliale : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire, liée à la constitution et au fonctionnement des jonctions entre les cellules endothéliales.

#### **II.1.5.1 La voie transcellulaire.**

C'est le passage au travers la cellule endothéliale. Elle concerne les molécules d'une taille supérieure à 3 nm telles que l'albumine. La voie transcellulaire permet également le passage de cellules à travers l'endothélium *via* un canal transendothélial (organelles vesiculo-vacuolaires) ou *via* un mécanisme dépendant d'un récepteur (Otsuka et al. 2016).

#### **II.1.5.2 La voie paracellulaire**

La voie paracellulaire correspond au passage par les jonctions intercellulaires endothéliales et permet le passage de molécules de taille inférieure à 3 nm. En cas de réaction inflammatoire, l'ouverture et la fermeture des jonctions intercellulaires sont régulées et coordonnées. Cette régulation est primordiale pour maintenir l'intégrité de l'endothélium et prévenir, voire éviter, l'exposition possible de la matrice sous-endothéliale. (Carman et al. 2007 ; Engelhardt et al. 2004 ; Millan et al. 2006 ; Nieminen et al. 2006).

### **II.1.6 Jonctions intercellulaires endothéliales**

La localisation des CE à l'interface entre le sang et le tissu pourrait entraîner une instabilité mais c'est grâce aux jonctions cellulaires spécialisées que l'endothélium demeure résistant. Les jonctions endothéliales permettent ainsi la cohésion des cellules entre elles mais également la cohésion des cellules avec les constituants de la matrice extracellulaire. Les jonctions intercellulaires des CE peuvent être classées en 4 groupes (Figure 11) : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes. Toutes ces structures sont composées de protéines transmembranaires qui lient le cytosquelette d'actine de la matrice extracellulaire stabilisant ainsi la jonction (Broman et al. 2006, Carmeliet, 1999, Dejana, 2004, Esser, 1998, Gavard et al.2006 ; Lampugnani et al. 2003).

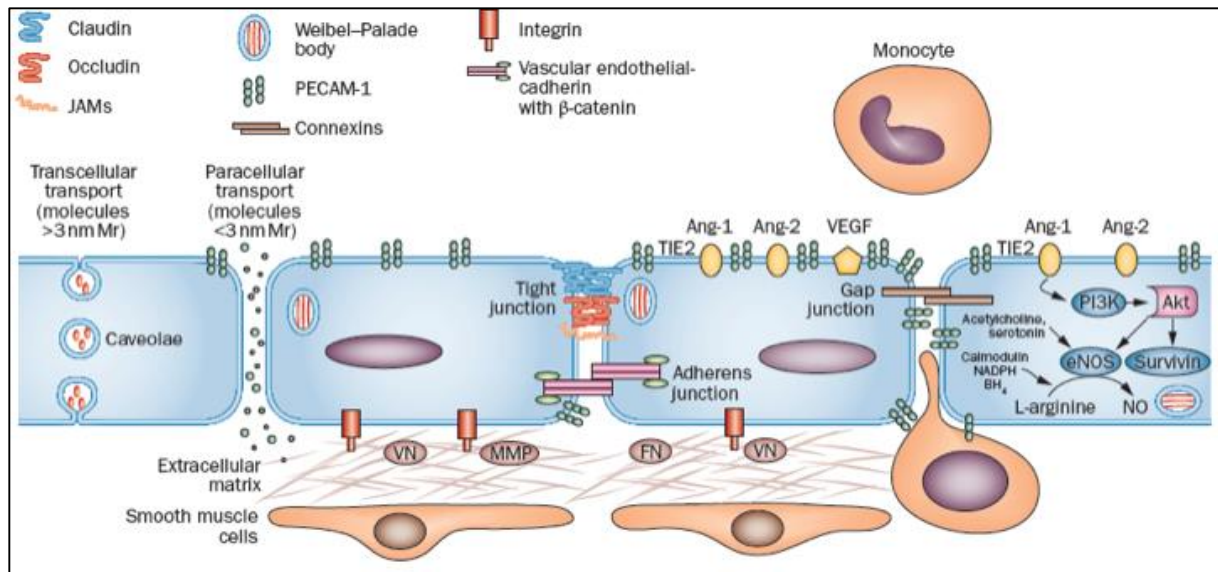


Figure 11. Illustration des jonctions intercellulaires de l'endothélium.  
D'après Otsuka F et al. 2012

### II.1.6.1 Les jonctions serrées

Ces jonctions, également appelées « jonctions étanches » ou « *zonula occludens* » sont capables de limiter la perméabilité de l'endothélium. Elles constituent un rapprochement étroit et localisé des membranes de deux cellules voisines qui limite considérablement le passage des composés lipidiques et protéiques en jouant un rôle de barrière paracellulaire. Cette barrière oblige le soluté à transiter au travers du feuillet cellulaire grâce à des transporteurs membranaires. La jonction serrée réalise des interactions homophiles qui mettent en jeu trois molécules majeures : l'occludine et la claudine, protéines transmembranaires respectivement de 64 kDa et 22 kDa et la protéine JAM (*junctional adhesion molecule*) de 33 kDa (Ebnet et al. 2008). Ces trois protéines s'assemblent pour former un réseau de fibrilles qui ceinture la membrane basale des CE. Les jonctions serrées sont aussi liées à des protéines intracellulaires comme ZO-1 et ZO-2 (*zonula occludens*) qui à leur tour sont liées au cytosquelette d'actine. Les jonctions serrées sont localisées en général au domaine apical de la CE.

### II.1.6.2 Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes ou « jonctions gap », permettent le passage de signaux chimiques ou électriques entre les cellules. Elles sont composées de plusieurs centaines de canaux bidirectionnels transmembranaires. Chaque canal représente un connexon formé par l'assemblage de six molécules de connexines. Les jonctions GAP permettent une coopérativité métabolique intercellulaire en fonction du gradient de concentration d'ions et petites molécules



ainsi que le transfert de médiateurs nécessaires à la cellule (AMP cyclique,  $Ca^{2+}$  etc.) (Sohl et al. 2004 ; Haefliger et al. 2004).

### **II.1.6.3 Les jonctions adhérentes et les desmosomes**

Les jonctions adhérentes, ou jonctions d'ancrage encore appelées «*zonula adherens*» forment une ceinture adhérente située en-dessus et en-dessous des jonctions serrées. Les desmosomes font également partie des jonctions adhérentes. Contrairement aux jonctions serrées où les membranes plasmiques fusionnent, il existe ici un espace intercellulaire d'environ 20nm. Elles jouent un rôle important dans la stabilisation des jonctions serrées de par leur localisation. Elles sont présentes dans tout le système vasculaire (Gumbiner, 2005). Les molécules principales d'adhésion de ces jonctions sont des protéines transmembranaires, les cadhérines. Elles établissent des liaisons homophiliques dépendantes du calcium avec les molécules de la cellule voisine et sont reliées au cytosquelette par des protéines associées à leur domaine cytoplasmique : les caténines (Ebnet et al. 2008). Dans les CE, les deux cadhérines impliquées dans les jonctions adhérentes sont les N- et VE-cadhérines (N- pour *Neural* et VE pour *Vascular Endothelial*) alors que les «desmosomes» possèdent d'autres cadhérines (desmogléine, desmocolline, plakoglobine, desmoplakine).

### **II.1.6.4 Lumière sur la VE-Cadherine : marqueur de la perméabilité endothéliale**

Les molécules d'adhésion, en particulier la VE-cadherine qui est la protéine d'adhésion la plus abondante dans les jonctions adhérentes, jouent un rôle majeur dans la régulation de la perméabilité endothéliale (Dejana et al. 2008). Dès la fin des années 1990, elle est décrite comme principale responsable du maintien de la communication intercellulaire (Dejana et al. 1999 ; Noda et al. 2010).

La VE-cadherine est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 125 kDa (784 acides aminés) dont le domaine extracellulaire de 90 kDa (592 acides aminés) est

formé de cinq ectodomaines (EC1 à EC5) d'environ 100 acides aminés chacun (Figure 12).

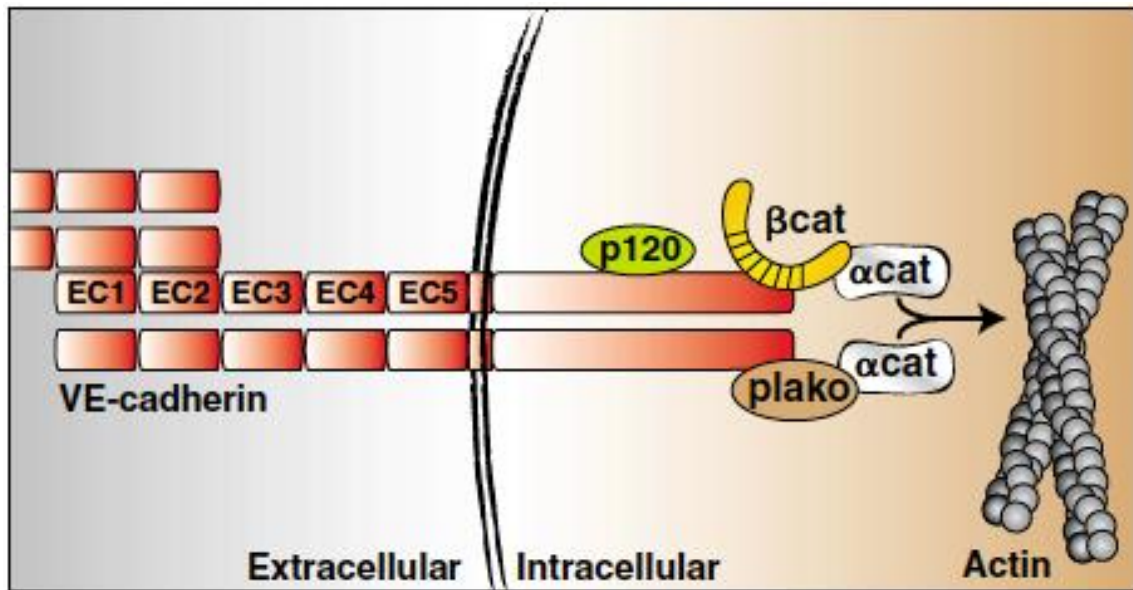


Figure 12. Illustration de la VE-cadherine des jonctions adhérences des cellules endothéliales.

Les domaines EC1 à EC4 sont composés de structures en feuillet  $\beta$  tandis que le domaine proximal EC5, comprend quatre résidus cystéine à l'origine de deux ponts disulfures. Le domaine transmembranaire de la VE-cadherine possède 21 acides aminés ; le domaine intracellulaire (162 acides aminés) possède un site de liaison avec la  $\beta$ -caténine qui permet son ancrage avec les filaments d'actine et comporte plusieurs sites de phosphorylation (Ser, Thr, Tyr) (Broman et al. 2006) (Figure 13). Bien que l'association entre la  $\beta$ -caténine et la VE-cadherine soit nécessaire pour maintenir l'intégrité de la jonction, l'arrimage de la protéine p120 est indispensable pour la stabilité de la jonction intercellulaire. Elle contrôle en plus l'état de phosphorylation et la stabilité de l'interaction d'une cadherine avec une autre (Xiao et al. 2003).

#### Phosphorylation et clivage de la VE-cadherine dans la perméabilité endothéliale:

Les jonctions adhérentes endothéliales sont le siège de phosphorylations en cascade en réponse à des stimuli pro-inflammatoires (Andrioupolou et al. 1999). Ce processus est corrélé avec la dissociation et la perméabilité des cellules endothéliales (Esser et al. 1998). Le domaine intracellulaire de la VE-cadherine, comporte de nombreux résidus tyrosine qui sont des sites de phosphorylation par les tyrosine-kinases (Figure 13).



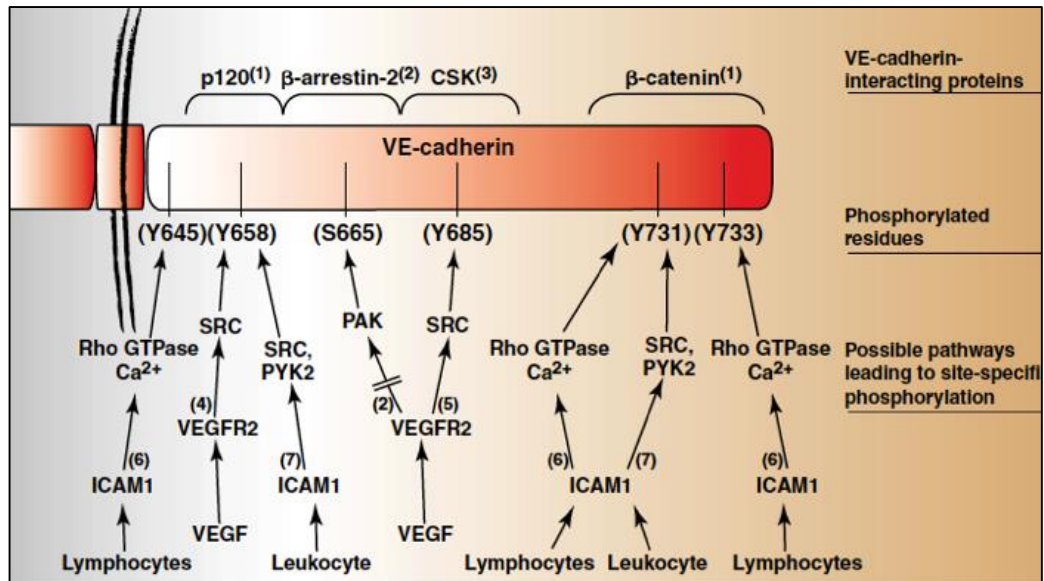


Figure 13. : Sites de phosphorylation de la VE-cadherine des jonctions adhérentes endothéliales

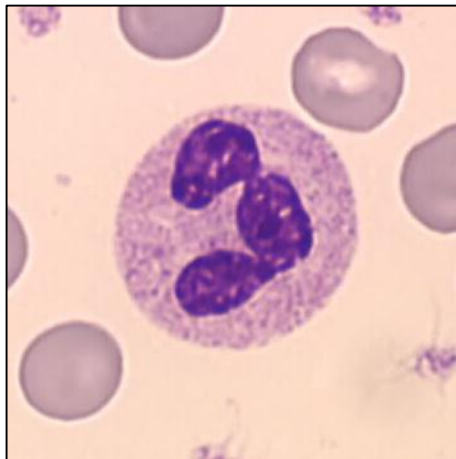
En outre, la VE-cadhérine est particulièrement sensible au clivage enzymatique pouvant être à l'origine de l'augmentation de la perméabilité endothéliale dans des pathologies cardiovasculaires (Miyazaki et al. 2011). Son exposition à des protéases telles que l'élastase, la cathepsine G ou encore la trypsine induit également la digestion du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine dans des cellules en culture. (Herren, 1998, Luplertlop, 2006, Hermant, 2003, Xiao 2003). Notons que les polynucléaires neutrophiles sont capables de sécréter des granules présentant de grandes quantités de ces protéases, ce qui pourrait induire la coupure de la VE-cadhérine. L'impact des ROS a également été mis en évidence dans la perméabilité endothéliale où des expériences d'activation des cellules endothéliales par le TNF $\alpha$  conduisaient à la phosphorylation et le clivage de la VE-cadhérine dans le milieu de culture (Nwariaku et al. 2004).

En résumé, l'endothélium vasculaire étant le premier type cellulaire à être en contact avec des éléments du sang circulant, c'est lui qui va subir en premier lieu des modifications morphologiques. Au cours de l'inflammation, le processus de phosphorylation et de déphosphorylation ainsi que le clivage enzymatique de la VE-cadhérine des jonctions adhérentes supposent l'existence de plusieurs voies de signalisation dans l'augmentation de la perméabilité endothéliale. La VE-cadhérine étant exclusivement exprimée dans l'endothélium vasculaire, ses modifications structurales peuvent être considérées comme un marqueur potentiel d'un endothélium agressé ou en remaniement (Vilgrain et al. 2013).

## II.2 Le polynucléaire neutrophile

### II.2.1 Généralités

Les neutrophiles ou PMN (“polymorphonuclear neutrophil”), font partie du groupe des leucocytes comprenant les granulocytes, les lymphocytes et les monocytes. Ils jouent un rôle majeur dans l’immunité innée. Les PMN sont décrits pour la première fois par Paul Ehrlich dans le début des années 1900 ce qui lui a valu le prix Nobel en 1908 (Androutsos, 2004). Les PMN se caractérisent sur le plan morphologique par un noyau polylobé ainsi que par de nombreux granules cytoplasmiques (Figure 14). D’un diamètre de 10 à 14  $\mu\text{m}$ , c’est le leucocyte le plus abondant de la circulation sanguine, représentant entre 50% et 70% de l’ensemble des globules blancs (4000 à 10000 leucocytes/ $\text{mm}^3$  ou 4 à 10  $\times 10^9/\text{l}$ ) soit un taux moyen chez l’adulte de 2000 à 7500 PMN par  $\text{mm}^3$  de sang (2 à 7,5  $\times 10^9/\text{l}$ ) (Summers et al. 2010). Ils appartiennent à la lignée des granulocytes et représentent plus de 95% de cette population cellulaire, les autres granulocytes étant les éosinophiles et les basophiles qui représentent respectivement 4% et 1% (Borregaard 2010). Les PMN interviennent dans l’immunité innée et la réaction inflammatoire. Cette cellule, très mobile, est la première à migrer vers le site inflammatoire. En outre, les PMN sécrètent des facteurs chimiotactiques permettant le recrutement d’effecteurs de l’immunité tels que les lymphocytes T, les cellules NK, les monocytes ou les cellules dendritiques immatures.

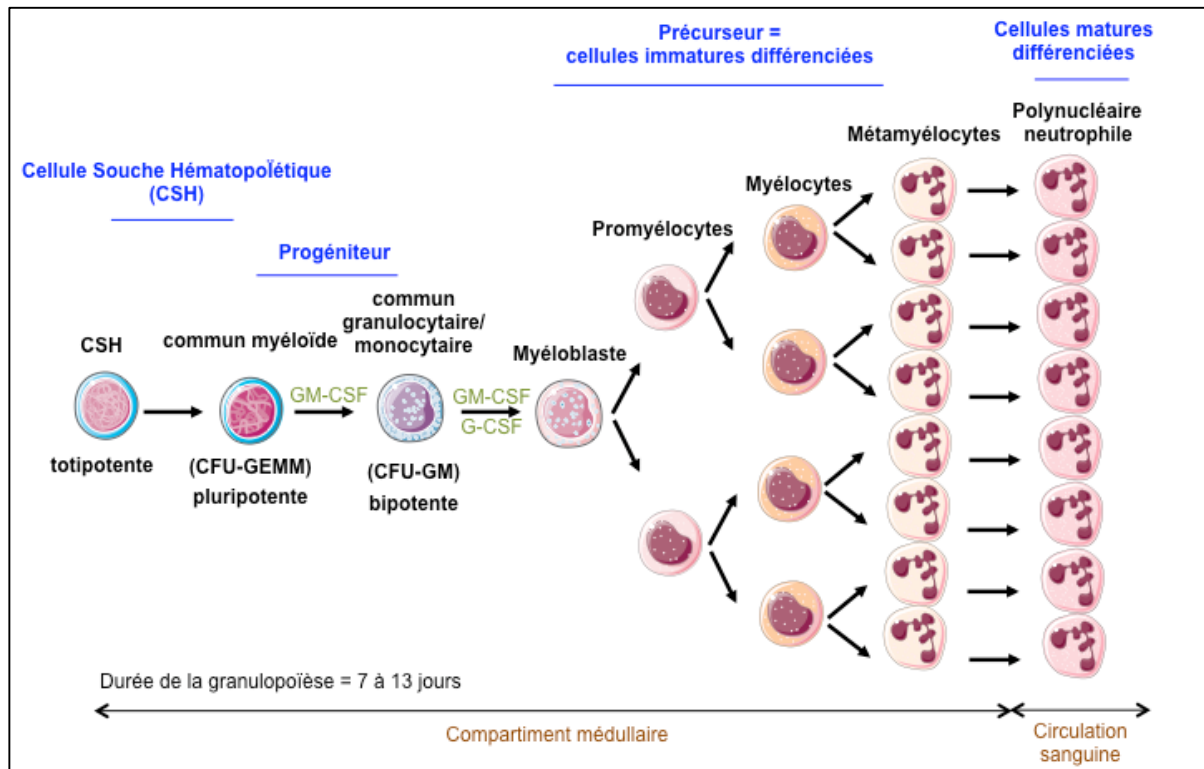


**Figure 14. Illustration d’un polynucléaire neutrophile par examen microscopique d’un frottis sanguin.** Le nom « neutrophile » provient de la neutralité du pH du cytoplasme qui se colore en rose à la coloration de May-Grünwald-Giemsa. Les polynucléaires neutrophiles sont de taille moyenne (10 à 14  $\mu\text{m}$ ) et contiennent un noyau de 2 à 5 lobes ainsi que des fines granulations cytoplasmiques.

### II.2.2 La granulopoïèse

Les PMN, comme tous les leucocytes sont produits dans la moelle osseuse et dérivent d’une cellule souche hématopoïétique (CSH) totipotente (Cowland et al. 2016). La CSH totipotente donne naissance à un progéniteur commun myéloïde qui sera différencié, en

présence de facteur de croissance GM-CSF (“*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*”), en progéniteur commun granulocytaire/monocytaire, lui-même différencié en présence de G-CSF (“*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*”) en myéloblaste, précurseur du neutrophile. Après plusieurs jours de maturation dans la moelle osseuse, le myéloblaste devient un neutrophile mature, et peut alors rejoindre le compartiment sanguin (Figure 15).



**Figure 15. La granulopoïèse du polynucléaire neutrophile.**

Les granulocytes sont produits dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) totipotente qui donne naissance à un progéniteur commun myéloïde appelé CFU-GEMM (Colony Forming Unit- Granulocytes – Erythroblast - Megakariocyte - Monocyte). Sous l'effet de GM-CSF, le progéniteur commun myéloïde se différencie en progéniteur commun granulocytaire monocytaire (CFU-GM) qui, après différenciation en présence de GM-CSF et le G-CSF, donne naissance au précurseur du neutrophile, le myéloblaste. Le myéloblaste va subir une maturation dans la moelle osseuse jusqu'à devenir un PMN mature qui rejoindra le compartiment sanguin.

Durant la granulopoïèse, plusieurs types cellulaires vont se distinguer : les myéloblastes, promyélocytes et myélocytes, capables de proliférer mais encore immatures, et les cellules matures, incapables de mitose: les métamyélocytes et les polynucléaires neutrophiles. L'étude par radio-marquage a permis d'évaluer la durée de vie des cellules dans le sang périphérique (4 à 7h pour les PMN selon certains auteurs) (Dresch et al. 1972) et la durée de la granulopoïèse (7 à 13j) au cours de laquelle vont apparaître successivement et à des stades très précis les granulations azurophiles ou primaires, spécifiques ou secondaires, riches en gélatinase et enfin les vésicules sécrétoires (Borregaard et al. 2016).

## II.2.3 La migration du neutrophile

### II.2.3.1 En condition physiologique

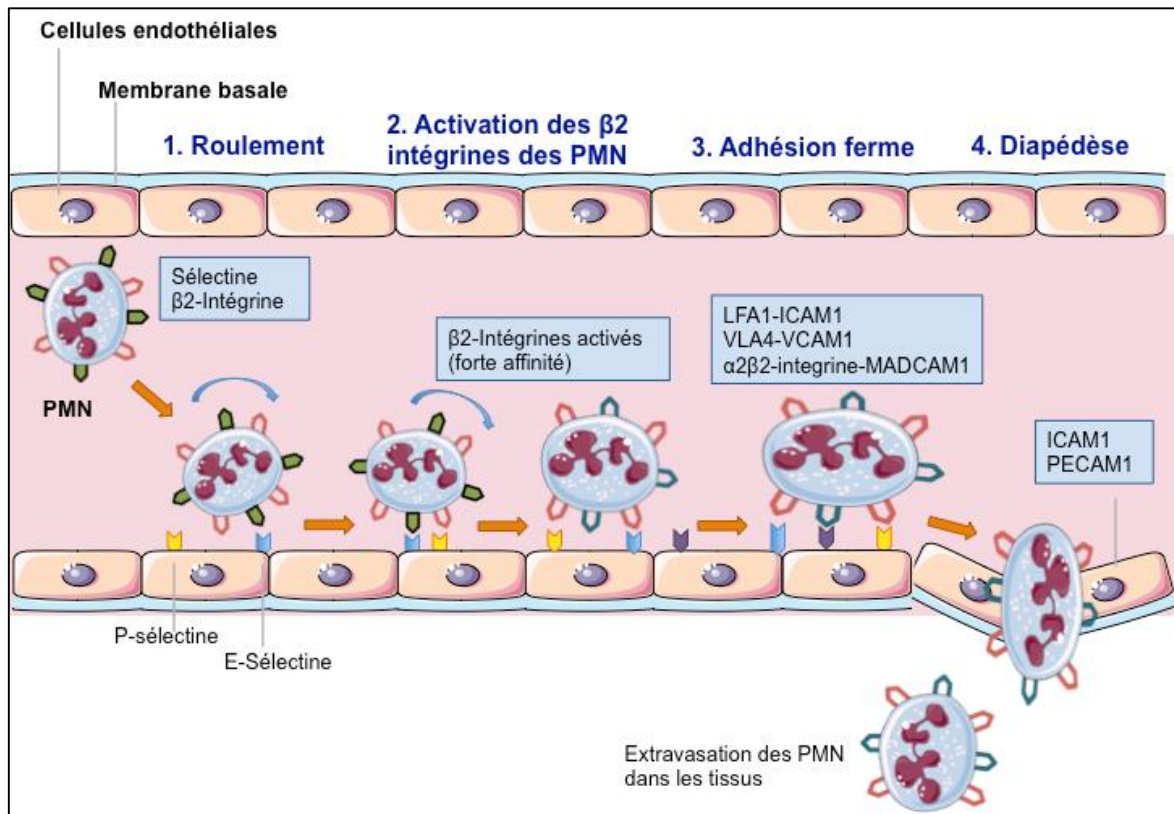
Au cours de la maturation du PMN, des PMN restent dans la moelle hématopoïétique pendant 5 jours, constituant une réserve médullaire, avant de rejoindre la circulation sanguine. En condition normale, les PMN demeurent peu de temps dans le sang périphérique (Moulding et al. 2001). Environ 50 % des PMN circulants forment une fraction marginale qui adhère faiblement à l'endothélium vasculaire (Figure 16) grâce à l'expression de molécules d'adhésion de la famille des sélectines, la L-sélectine (CD62L). Cette adhérence des PMN à la paroi vasculaire est faible et réversible.

### II.2.3.2 En condition d'inflammation

Sous l'influence de cytokines et de facteurs chimiotactiques, les neutrophiles sont recrutés au niveau des sites inflammatoires : c'est la migration transendothéliale (Figure 16) (Kolaczowska et al. 2013). La migration des PMN des vaisseaux sanguins vers les tissus dépend des molécules d'adhérence exprimées d'une part par les neutrophiles, et d'autre part, par les cellules endothéliales. Le recrutement des PMN vers les sites inflammatoires se déroule en quatre étapes successives.

Dans un premier temps, les cellules endothéliales, sous l'influence de médiateurs provenant du foyer inflammatoire, expriment des molécules de la famille des sélectines, E- et P-sélectines (CD62E et CD62P ou PSGL-1) permettant une adhésion de faible affinité avec la L-sélectine des PMN (Smith 1993). Cette adhérence réversible permet aux PMN de ralentir et de rouler sur la paroi vasculaire : c'est l'étape de roulement ou de « *rolling* ».

Dans un second temps, l'étape de roulement entraîne la libération par les PMN de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-8, du TNF $\alpha$  ou du GM-CSF.



**Figure 16. La migration trans-endothéliale du neutrophile vers les tissus.** Sous l'influence de cytokines et de facteurs chimiotactiques, les neutrophiles sont recrutés au niveau des sites inflammatoires tissulaires. Cette migration vers les tissus procède en quatre étapes. Dans le flux sanguin, les neutrophiles roulent le long de la paroi du vaisseau, c'est l'étape de roulement. Dans une deuxième étape, sous l'influence de facteurs pro-inflammatoires, les PMN sont activés et expriment de nouvelles molécules d'adhésion de forte affinité : les intégrines. Les intégrines activées engagent des liens avec les ligands correspondant de la cellule endothéliale. Cette étape est l'adhésion ferme des PMN à l'endothélium. Sous l'effet d'autres signaux pro-inflammatoires, les PMN libèrent des protéases ce qui leur permet de s'insinuer au travers des jonctions serrées des cellules endothéliales. C'est l'étape de la diapédèse qui entraîne l'extravasation des neutrophiles au sein du tissu.

Adapté de Kolaczkowska et al. Nat Rev Immunol. 2013

Les médiateurs pro-inflammatoires libérés par les PMN permettent le clivage des L-sélectines leucocytaires par des métalloprotéases, (Li et al. 2006b) et augmentent l'expression membranaire des  $\beta 2$  intégrines des PMN, en particulier, VLA-4 (Very Late Antigen-4 ; intégrine  $\alpha 4\beta 1$ ), LFA-1 (Lymphocyte Function-Associated antigen-1; intégrine  $\alpha L$  (CD11a/CD18)) et MAC-1 (Macrophage Antigen-1; intégrine  $\alpha M$  (CD11b/CD18)). Il s'agit de l'étape de l'activation des  $\beta 2$  intégrines des PMN. Une adhésion de forte affinité est alors possible grâce à l'expression endothéliale de nouvelles molécules d'adhésion : ICAM-1 et ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule), VCAM-1 (Vascular Cell-Adhesion Molecule-1) et MADCAM-1 "Mucosal vascular Cell-Adhesion Molecule-1) qui font partie de la superfamille des immunoglobulines (Diez-Fraile et al. 2002). C'est l'étape de l'adhésion ferme. Enfin, sous l'effet de signaux pro-inflammatoires, le neutrophile réorganise son cytosquelette et développe des activités protéolytiques (par la sécrétion de protéases des granules) pour s'insinuer au travers des



jonctions serrées des cellules endothéliales. Un gradient de concentration de chimio-attractant oriente le mouvement tissulaire et fait intervenir d'autres molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales : il s'ensuit alors l'étape de la diapédèse au cours de laquelle les PMN se glissent entre les cellules endothéliales (extravasation des neutrophiles) puis traverse la membrane basale.

## **II.2.4 Les fonctions anti-infectieuses des neutrophiles**

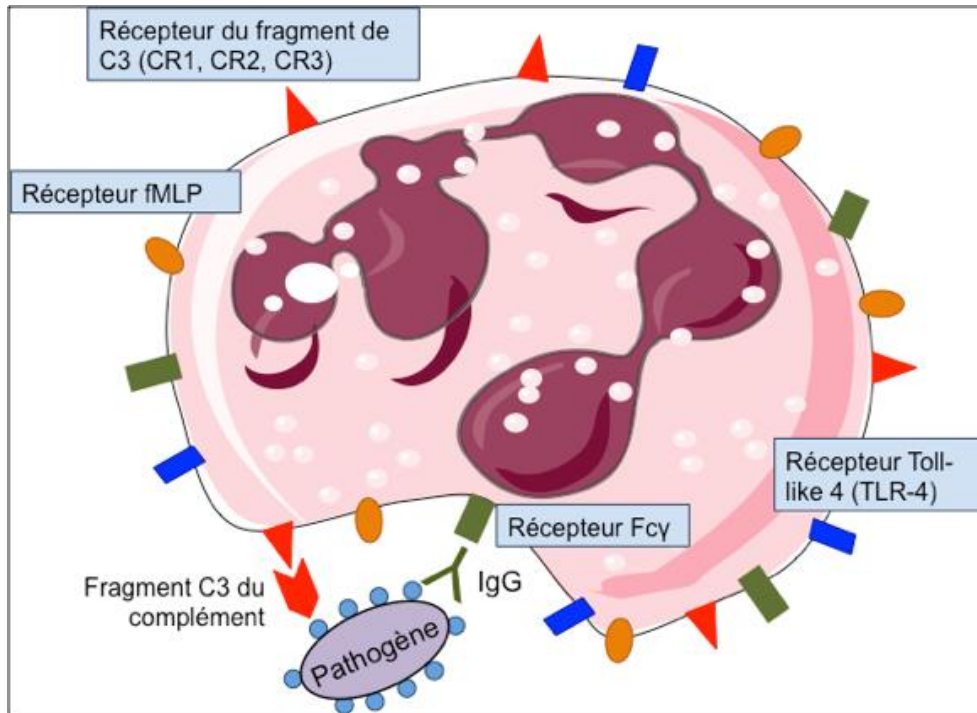
Les neutrophiles ont une durée de vie courte dans la circulation sanguine. En contexte inflammatoire, ils peuvent survivre jusqu'à plusieurs jours (Nauseef et al. 2014). Le rôle primordial du PMN est l'élimination de l'agent infectieux. Ses principales fonctions reposent donc sur sa capacité de migration transendothéliale (développé plus haut dans la partie II.2.3), de phagocytose, de dégranulation, et d'explosion respiratoire. Un nouveau mécanisme bactéricide mis en œuvre par le PMN a été identifié : il repose sur la formation de « *Neutrophils Extracellular Trap* » (NET), réseau filamentaire capable d'emprisonner des micro-organismes et faciliter leur interaction avec les molécules effectrices (Fuchs et al. 2007).

### **II.2.4.1 La phagocytose**

#### **II.2.4.1.1 Processus de phagocytose**

Au niveau du site inflammatoire, le neutrophile a pour rôle principal d'éliminer les débris et les agents pathogènes : c'est le processus de phagocytose (Figure 17).

La phagocytose a été décrite pour la première fois par Elie Metchnikoff en 1883 et représente la principale fonction de défense des macrophages et des granulocytes contre les microorganismes. Le processus de phagocytose consiste en la reconnaissance, l'ingestion et l'élimination d'un pathogène afin d'éviter sa multiplication. Ce processus comporte différentes étapes dont la reconnaissance de l'élément à phagocyter, son internalisation puis sa dégradation au niveau intracellulaire. Le neutrophile possède un ensemble de récepteurs membranaires participant à la reconnaissance du pathogène ainsi qu'au déclenchement de son internalisation. Certains récepteurs exprimés à la surface des PMN reconnaissent directement des motifs présents à la surface des pathogènes à phagocyter. C'est le cas des récepteurs « Toll-Like » (TLR). Par exemple, TLR4 reconnaît et fixe les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif, puis engage des voies de signalisation impliquées dans les fonctions effectrices des PMN (Figure 17).



**Figure 17. Récepteurs impliqués dans la phagocytose du pathogène.**

Les différents types de récepteurs participant à la phagocytose se divisent en deux catégories : certains d'entre eux reconnaissent directement le pathogène à phagocyter comme les récepteurs Toll (Toll-like receptors, TLRs) ou le récepteur au fMLP (formyl-met-leu-phe). Les récepteurs dits « d'opsonines » constituent la seconde catégorie de récepteurs phagocytaires : en enrobant la particule à phagocyter, les opsonines permettent la mise en jeu de récepteurs spécialisés dans l'internalisation du pathogène par l'invagination de la membrane plasmique et la formation d'une vacuole intracellulaire : le phagolysosome. Ce sont les fragments du complément (C3b) et les immunoglobulines reconnaissent la particule opsonisée par les récepteurs du complément (CR1 et CR3) ou les récepteurs Fc $\gamma$  respectivement.

En outre, la fixation du PMN à sa cible est facilitée par les opsonines, particulièrement les immunoglobulines d'isotype IgG1 et IgG3 et les fragments de C3. Les immunoglobulines se fixent de façon spécifique aux épitopes de l'agent pathogène par leur site anticorps, et sont ainsi reconnues par les récepteurs Fc $\gamma$  des neutrophiles.

De manière générale, les récepteurs Fc $\gamma$  sont considérés comme les clefs permettant le déclenchement du processus de phagocytose des pathogènes opsonisés avec des IgG. Une fois les récepteurs Fc $\gamma$  activés, le processus de phagocytose est initié avec une invagination de la membrane plasmique autour du pathogène formant ainsi le phagosome. Le phagosome fusionne ensuite avec les granules et les lysosomes, donnant naissance à un phagolysosome riche en peptides antimicrobiens et en protéases.

En parallèle de la phagocytose, une explosion respiratoire a lieu conduisant, à la libération massive, à l'intérieur du phagolysosome, d'ions superoxyde qui sont rapidement transformés en d'autres dérivés réactifs de l'oxygène extrêmement toxiques pour le pathogène ingéré. Cette

explosion respiratoire est liée à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire, Nox2 (partie que nous développerons un peu plus loin).

### ***II.2.4.1.2 Les récepteurs Fc des neutrophiles***

#### ***II.2.4.1.2.1 Généralités***

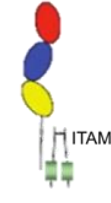




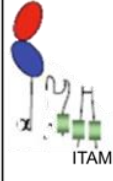
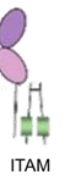

C'est à partir de 1969 que des travaux sur des macrophages (Lay et al. 1969) et des granulocytes d'animaux (Henson et al 1969 ; Phillips-Quagliata et al. 1969) ont permis d'observer l'existence de récepteurs capables de lier les immunoglobulines. Puis, en 1970, des travaux chez l'humain ont confirmé l'importance de ces protéines membranaires, en particulier sur les granulocytes, en démontrant leur rôle primordial dans la réponse immunitaire innée (Messner et al. 1970).

Sur le plan structural, les récepteurs Fc font partie de la superfamille des immunoglobulines et sont classés en fonction de leur affinité à reconnaître les différents isotypes d'immunoglobulines. Concernant leur nomenclature, chaque isoforme du récepteur Fc est nommée par une lettre en minuscule de l'alphabet grec correspondant à l'isotype de l'immunoglobuline qu'il fixe. Par exemple, les récepteurs Fc reconnaissant les IgG sont nommées les récepteurs Fc $\gamma$  (Tableau 11).

L'oligomérisation des récepteurs Fc, ou au minimum une dimérisation entre ceux-ci, représente un bon moyen d'amplifier les voies de signalisation intracellulaire d'activation tout en évitant d'activer inutilement les cellules qui rencontrent des immunoglobulines libres (Nimmerjahn F. et al. 2007). La réticulation des récepteurs Fc potentialise la fixation des immunoglobulines, qui sous la forme monomérique, ont un effet moindre. La plupart des récepteurs Fc sont formés de plusieurs sous-unités : une chaîne  $\alpha$  qui permet la reconnaissance spécifique avec la portion Fc des immunoglobulines au niveau extracellulaire ; les autres chaînes sont accessoires et permettent la transduction du signal comme la chaîne  $\gamma$ , commune entre plusieurs isoformes.



Tableau 11. Illustration des isoformes de récepteurs Fc. Adapté de Vogelpoel et al. 2015

Récepteur	FcγRI (CD64)	FcγRIIa (CD32)	FcγRIIB1 (CD32)	FcγRIIB2 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)	Fcα/μRI
Structure								
Spécificité Affinité (monomère)	IgG1=3>4 <b>Forte</b>	IgG3>1=2 <b>Faible</b>	IgG3>1>>2>4 <b>Faible</b>	X <b>Faible</b>	IgG1=3>>2=4 <b>Faible</b>	IgE <b>Très forte</b>	IgA1=IgA2 <b>Faible</b>	IgA et IgM x
Cellules	Macrophage <b>PMN activé</b> Eosinophile Cellule dendritique	Macrophage <b>PMN</b> Eosinophile Cellule de Langherans Plaquette	Macrophage <b>PMN</b> Eosinophile	Ly B Mastocyte	<b>PMN</b> NK Eosinophile Mastocyte Macrophage	Mastocyte Eosinophile Basophile	Macrophage Eosinophile <b>PMN</b>	Macrophage Ly B
Effet	Explosion oxydase et phagocytose (PMN)	Dégranulation (éosinophile)	Phagocytose Inhibition de stimulation	Inhibition de l'activation des ly B	ADCC (NK) Phagocytose (PMN)	Libération de granules	Phagocytose	x

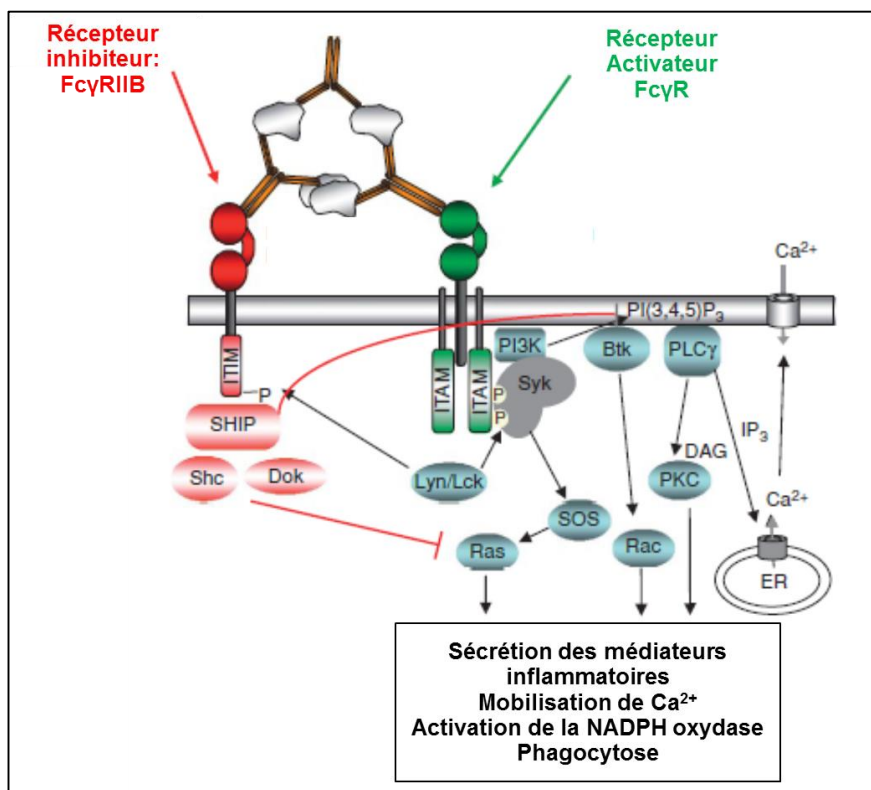
#### II.2.4.1.2.2 Récepteurs Fcγ

Les récepteurs Fcγ humains comprennent le FcγRI (CD64), le FcγRIIa (CD32a), le FcγRIIb1 (CD32B1 ou appelé FcγRIIB/CD32c), le FcγRIIb2 (CD32b2 ou appelé FcγRIIIC/CD32c), le FcγRIIIa (CD16a) et le FcγRIIIb (CD16b) (Daeron 1997). Bien que les récepteurs Fcγ se retrouvent principalement sur les cellules hématopoïétiques, ils sont également exprimés sur les cellules endothéliales (Moussavi et al. 2007), les ostéoclastes (Hentunen et al. 1999) et sur les cardiomyocytes (Staudt et al. 2007).

Les neutrophiles humains expriment constitutivement deux récepteurs Fcγ de faible affinité, FcγRIIa (CD32a) et FcγRIIIb (CD16b), tandis que l'expression du récepteur de haute affinité FcγRI (CD64) est inducible par l'interféron-γ (IFNγ) ou le GM-CSF (Buckle et al. 1989).

À l'exception du récepteur FcγRIIIb, tous les récepteurs Fcγ sont des glycoprotéines membranaires de type 1 (comportant une extrémité N-terminale extracellulaire). Leurs différences structurales génèrent la diversité d'affinité pour les différentes sous-classes d'IgG (Indik et al. 1995). La structure générale de ces récepteurs présente des domaines de ressemblance avec les immunoglobulines sur la portion extracellulaire N-terminale. Elle se poursuit par une région transmembranaire et une portion cytoplasmique en C-terminal. La structure multimérique des isoformes FcγRI et FcγRIII comprend une chaîne α permettant la reconnaissance du ligand et un homodimère de chaînes γ de transduction du signal au niveau intracellulaire. Quant aux isoformes FcγRIIa et FcγRIIb, elles présentent une chaîne unique transmembranaire tandis que le récepteur FcγRIII s'avère attaché à la membrane cellulaire par une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) sans posséder de portions transmembranaire et cytoplasmique (Selvaraj et al. 1988).

À l'exception du récepteur FcγRIIIb, les récepteurs Fcγ possèdent un motif ITAM (*Immunoreceptor-based Tyrosine Activator Motif*) ou ITIM (*Immunoreceptor-based Tyrosine Inhibitor Motif*) au niveau cytoplasmique. Ces motifs contenant des résidus tyrosine sont retrouvés dans plusieurs types de récepteurs et s'avèrent cruciaux pour la transmission du signal. Classiquement, les récepteurs présentant des motifs ITAM sont considérés comme des activateurs des fonctions cellulaires. Inversement, le récepteur FcγRIIb (CD32b), seule isoforme à posséder un motif ITIM, est décrit comme inhibiteur des fonctions cellulaires engendrées par la liaison des récepteurs Fc (Nimmerjahn et al. 2007) (Figure 18). Cette famille de récepteurs, comprenant des isoformes activatrices et inhibitrices des fonctions cellulaires illustre bien la régulation engendrée par la liaison IgG- récepteur Fcγ.



**Figure 18. Voies de signalisation des récepteurs Fc à motif ITAM et ITIM.** Adapté de Nimmerjahn et al. 2007.

Les FcγR possèdent un motif ITAM (*Immunoreceptor-based Tyrosine Activator Motif*) ou un motif ITIM (*Immunoreceptor-based Tyrosine Inhibitor Motif*) au niveau cytoplasmique. Les récepteurs présentant des motifs ITAM sont considérés comme des activateurs des fonctions cellulaires. Inversement, le FcγRIIb (CD32b), seule isoforme à posséder un motif ITIM, est décrit comme un récepteur inhibiteur. Ces domaines représentent un enchaînement de tyrosine. L'engagement des récepteurs Fcγ induit l'activation des protéines kinase Lyn/Lck qui phosphorylent les résidus Tyrosine des domaines cytoplasmiques ITIM ou ITAM. Les ITAM s'associent à une protéine à activité tyrosine kinase, la protéine Syk. Leur association va activer la protéine SOS qui elle-même va activer la protéine Ras, protéines à activité tyrosine-kinase. L'activation des domaines ITAM des récepteurs Fc conduit également à l'activation de la phospholipase PLC qui réalise l'hydrolyse de PIP<sub>2</sub> en Diacylglycérol (DAG) activateur de la protéine kinase C (PKC) et en inositol-3-phosphate (IP<sub>3</sub>). L'activation des protéines à activité tyrosine kinase et de la PKC sont des étapes indispensables au déroulement de la cascade d'activation cellulaire : sécrétion de médiateurs inflammatoires, mobilisation de calcium intracellulaire par l'IP<sub>3</sub>, activation de la NADPH oxydase ou la phagocytose. L'activation des récepteurs Fc à motifs ITIM inhibe certaines de ces voies de signalisation (lignes en rouge).

Différentes réponses des neutrophiles sont induites par l'engagement des récepteurs Fcγ notamment le déclenchement de la phagocytose, la mobilisation de calcium intracellulaire, la phosphorylation de protéines, la production d'anions superoxyde, précurseurs de formes réactives de l'oxygène, les ROS. De façon générale, les récepteurs Fcγ constituent d'importants activateurs du système immunitaire en jouant des rôles majeurs dans la résistance aux pathogènes. Ces récepteurs ont également été associés à la susceptibilité envers plusieurs maladies autoimmunes (Tsuboi et al. 2008, Kettritz 2012 ; Squatrito et al. 2014).

#### **II.2.4.2 La dégranulation**

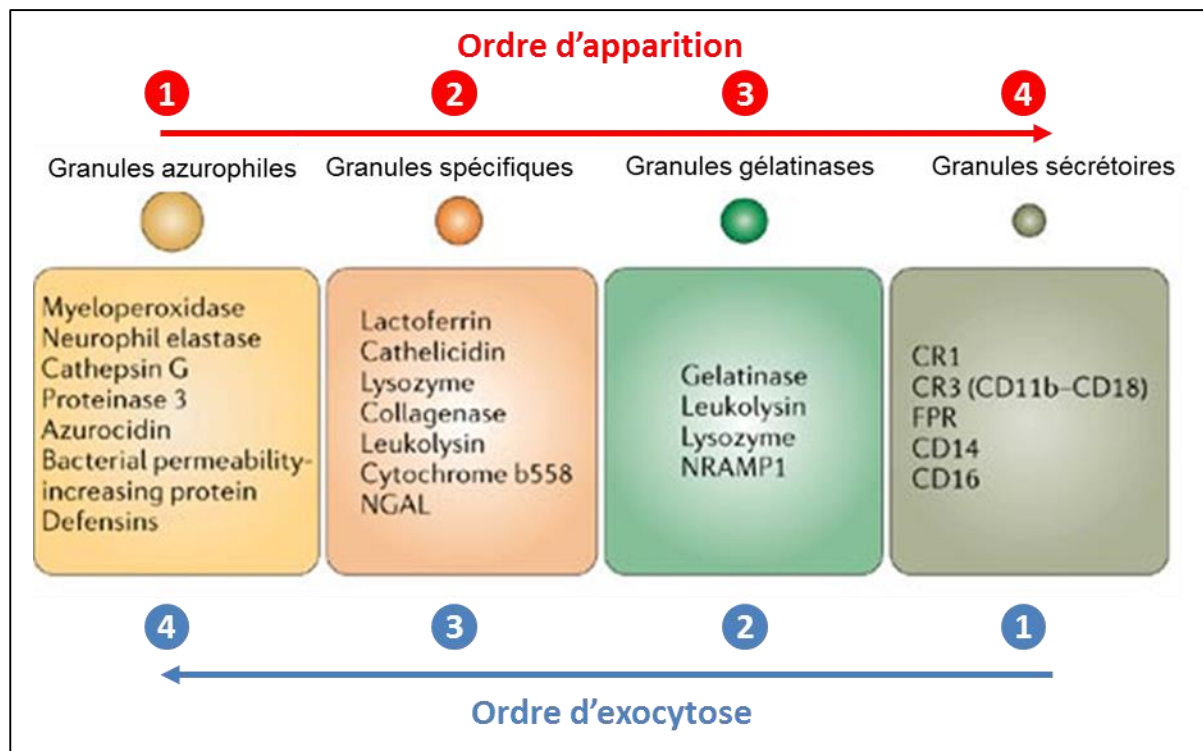
Une des principales fonctions du PMN est le processus de dégranulation. Les premières observations ont montré chez la souris la présence de nombreux granules cytoplasmiques déchargeant leur contenu dans la vacuole phagocytaire lors du phénomène de phagocytose (Cohn et al. 1960). Ces granules sont formés dès l'étape myéloblastique de la maturation du neutrophile. Dans un contexte inflammatoire, les PMN sont capables de « dégranuler » aboutissant à la destruction du pathogène. Les granules sont classés en quatre types selon leur contenu protéique et enzymatique : les granules primaires ou azurophiles, secondaires ou spécifiques, tertiaires ou à gélatinase, et les vésicules sécrétoires. Ces différents granules sont formés de manière séquentielle sous l'influence de facteurs de transcription (Chertov et al. 2000).

Les granules azurophiles (ou primaires) sont les premiers granules formés et contiennent principalement des enzymes et peptides impliqués dans la mort et la dégradation du microorganisme (Figure 19). Ils sont rarement sécrétés à l'extérieur de la cellule, fusionnant plutôt avec le phagosome pour en détruire le contenu à l'aide de la myéloperoxydase (MPO), de l'élastase, des défensines, la cathepsine G et de l'azurocidine. L'élastase est une sérine protéase, qui clive les peptides au niveau d'acides aminés neutres. La cathepsine G représente également une sérine protéase « *chymotrypsin-like* » catalysant l'hydrolyse de liaisons peptidiques au niveau d'acides aminés hydrophobes. Les défensines sont des peptides cationiques riches en cystéine, qui peuvent s'insérer dans les membranes microbiennes et former des pores.

Les granules formés peu après ceux-ci sont dits spécifiques ou secondaires. Ils sont libérés dans le milieu extracellulaire. Ces granules renferment également des protéines de dégradation telles que le lysozyme et la gélatinase (enzyme catalysant le clivage du collagène de la matrice extracellulaire) mais aussi de la lactoferrine, protéine aux propriétés bactéricides qui fixe le fer.

Les granules gélatinases (ou tertiaires) et les vésicules sécrétoires apparaissent plus tard, à la fin du processus de maturation du neutrophile. Les principaux rôles des granules à gélatinases sont de stocker les enzymes servant à la dégradation de la matrice extracellulaire tout en constituant une réserve de récepteurs membranaires utiles à la surface pour la diapédèse du neutrophile. Ces granules sont donc très importants pour une migration efficace vers le site inflammatoire.

Enfin, les vésicules sécrétoires sont les premières à être libérées en réponse à des stimuli inflammatoires. Avec les granules spécifiques, elles possèdent une variété de récepteurs membranaires nécessaires aux étapes précoces d'activation du neutrophile et à l'adhésion ferme sur l'endothélium activé, comme la  $\beta$ 2-intégrine, le récepteur du fMLP (FRP), le LPS (CD14) et le récepteur Fc $\gamma$ III (CD16), les récepteurs du complément.



**Figure 19. Les granules des neutrophiles.**  
Adaptée de Pham, Nature Reviews Immunology. 2006

Il est important de noter que les granules spécifiques, les granules tertiaires et les vésicules sécrétoires sont un important réservoir de cytochrome b<sub>558</sub>, centre catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire (plus de 80 % de la quantité totale), et responsable de la formation d'anions superoxydes (Boregaard et al. 1983).

### II.2.4.3 L'explosion respiratoire

La phagocytose des PMN s'accompagne d'une intense consommation d'oxygène communément appelée explosion respiratoire (« *respiratory burst* ») (Chanock et al. 1994). Cette consommation d'oxygène est liée à l'activation d'une enzyme, la NADPH oxydase phagocytaire qui va transférer des électrons depuis le NADPH vers l'oxygène moléculaire et produire des ions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ). L'ion superoxyde produit sera le précurseur de diverses formes de l'oxygène fortement réactives et plus toxiques pour le pathogène, appelés les ROS (*Reactive Oxygen Species*).

C'est en 1978 que l'équipe de Segal a montré qu'un défaut de la production de ROS par le complexe protéique de la NADPH oxydase phagocytaire, Nox2 était à l'origine de la granulomatose sceptique chronique (CGD, Chronic Granulomatous Disease) (Segal et al, 1978). Les patients atteints de CGD présentent des infections sévères et récurrentes par des agents pathogènes opportunistes associées à des maladies inflammatoires (Winkelstein et al. 2000). Chez ces patients, ces infections à répétition se manifestent par le défaut du mécanisme d'explosion respiratoire, preuve du rôle primordial de la NADPH oxydase phagocytaire dans l'immunité innée non spécifique.

Ainsi, « l'explosion respiratoire » est caractérisée par une production de ROS foudroyante mais transitoire, nécessaire à la destruction de la plupart des agents pathogènes. Au delà de leur fonction bactéricide, ils peuvent être à l'origine de pathologies inflammatoires (Schieber et al. 2014). Les ROS et la structure de la NADPH oxydase phagocytaire seront détaillés, respectivement dans la partie III. Les NADPH oxydases et IV. Rôle des ROS dans l'étiopathogénie du TRALI de cette introduction.

### II.2.5 Fonctions sécrétoires des PMN

En plus de ses fonctions primaires dans la réponse immunitaire innée, les PMN sont la source de nombreux médiateurs de l'inflammation (Cassatella et al. 1995). Ces médiateurs peuvent agir de manière paracrine ou autocrine. Les PMN peuvent ainsi organiser la suite de la réponse immunitaire en recrutant d'autres cellules environnantes, effectrices de la réponse immunitaire ou bien attirer d'autres PMN vers le site inflammatoire. Ces médiateurs peuvent être classés en deux grandes familles : les médiateurs peptidiques (Lapinet et al. 2000) et les médiateurs lipidiques (Ford-Hutchinson et al. 1980; Zurier 1976 ; Goldstein et al. 1978).

**Les médiateurs peptidiques** sont constitués par des cytokines :

- la famille de l'interleukine 1 (IL-1) comprenant l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1RA

- la famille du TNF
- l'interleukine 8 (IL-8)

La sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  permettent d'initier une cascade d'événements comme l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium, l'induction de la production de ROS par les neutrophiles, la production de prostaglandines inflammatoires, PGI<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub>, ou encore le recrutement et l'activation des macrophages et des cellules dendritiques (Dinarello 2000). L'intervention de ces cytokines dans les maladies auto-immunes est d'ailleurs la cible de certains traitements qui visent à bloquer leur action (Feldmann et al. 1991, Squatrito et al. 2014).

Bien que sécrétée par d'autres types cellulaires (monocytes, fibroblastes, cellules endothéliales), la chimiokine IL-8 (ou CXCL8), est l'interleukine que le neutrophile sécrète en plus grande quantité, lui-même étant la seule cible de l'IL-8. Cette communication autocrine déclenche sa dégradation, sa migration dirigée, ou encore la production d'anions superoxydes (Baggiolini et al. 1994).

**Les médiateurs lipidiques** comme le leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) sont des composés formés à partir des phospholipides membranaires issus principalement du métabolisme de l'acide arachidonique : la voie métabolique de la COX-2 (cyclo-oxygénase 2) aboutit à la formation de PGE<sub>2</sub> et de TXA<sub>2</sub> (St-Onge M et al. 2007) tandis que celle de la 5-lipoxygénase produit le LTB<sub>4</sub>, un puissant chimioattractant activateur des leucocytes (Hicks et al. 2007). Le TXA<sub>2</sub> a des effets pro-inflammatoires : il active les plaquettes et entraîne leur agrégation, ainsi que la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  par les monocytes. Quant à la PGE<sub>2</sub>, elle présente selon le contexte des fonctions pro- ou anti-inflammatoires. Elle peut provoquer des épisodes inflammatoires connus comme la fièvre, l'hyperalgésie, la vasodilatation. Mais elle peut également diminuer l'activation des PMN en bloquant leur production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  et en inhibant la plupart de leurs fonctions inflammatoires *via* une augmentation d'AMP (adénosine monophosphate) cyclique intracellulaire (Ham et al. 1983)

La sécrétion de médiateurs inflammatoires par les PMN est en grande partie influencée par des agents stimulants, les cytokines ou encore les endotoxines bactériennes (comme le LPS). Elle peut aussi être réprimée par des cytokines dites anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-13, ou l'IL-1R (Cassatella et al. 1999).



### III. Les NADPH oxydases

En 1884, Mac Munn décrit pour la première fois les propriétés spectrales de pigments, les cytochromes, et en proposa une classification en fonction de leur spectre d'absorption. C'est en 1971 que la notion de NADPH oxydase dans les neutrophiles a été décrite pour la première fois (Patriarca et al. 1971). La production d'anions superoxydes par les neutrophiles fut initialement évoquée par Curnutte et al. en 1973 (Curnutte et al. 1973). En 1978, la découverte d'un cytochrome de type b, présent dans les neutrophiles humains a permis d'améliorer la connaissance structurale de la NADPH oxydase du neutrophile. Le cytochrome de type b a été dénommé cytochrome b558 en référence à ses propriétés spectrales d'absorption à 558nm (Segal et al. 1978) et représente le coeur redox de la NADPH oxydase des phagocytes.

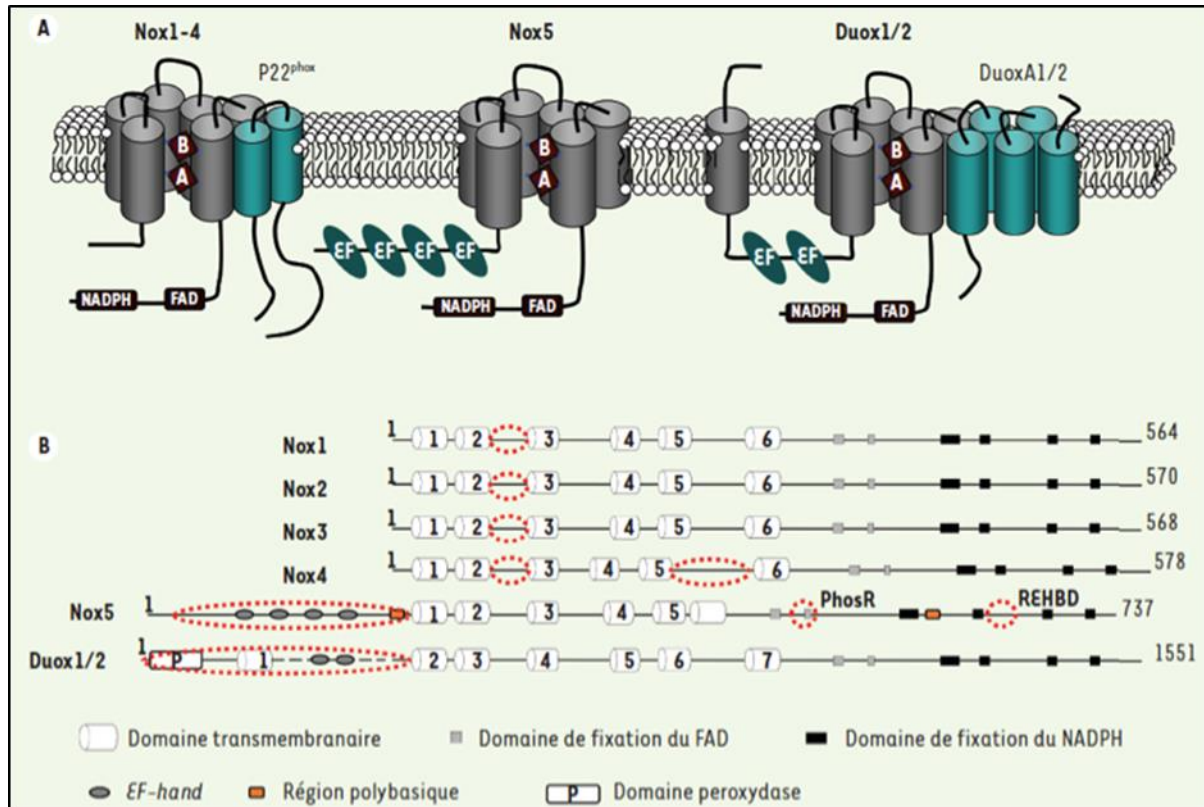
Dans les années 2000, des homologues de la NADPH oxydase phagocytaire ont été clonés dans divers types cellulaires (Banfi et al. 2000 ; De Deken et al. 2000; Cheng et al. 2001) identifiant une famille de NADPH oxydases appelée Nox. Aujourd'hui, la famille des Nox est composée de 7 membres : 5 Nox et 2 Duox (« *Dual Oxidases* »). Parmi ces isoformes, la NADPH oxydase phagocytaire, renommée Nox2, est la mieux caractérisée.

#### III.1 Structure de la NADPH Oxydase

##### III.1.1 Les isoformes de la NADPH oxydase

La première isoforme de la NADPH oxydase phagocytaire, nommée également Nox2, est appelée, Nox1 et a été décrite à partir de 1999 par deux équipes différentes (Suh et al. 1999; Banfi et al. 2000). Par la suite, les isoformes Nox3, Nox4 et Nox5 ainsi que les Duox 1 et 2 ont été clonées (De Deken et al. 2000; Cheng et al. 2001).

Au total, 7 isoformes de la NADPH oxydase, deux sous unités organisatrices (p47<sup>phox</sup> et NoxO1), deux sous unités activatrices (p67<sup>phox</sup> et NoxA1), deux facteurs de maturation nécessaires à l'activité des Duox (DuoxA1 et DuoxA2) sont aujourd'hui connus (Bedard et al. 2007). Cette famille se divise en deux groupes selon la capacité des Nox à constituer un hétérodimère avec p22<sup>phox</sup> (Nox1, Nox2, Nox3, et Nox 4) ou selon la présence dans la séquence de motifs de type EF-hand qui fixe le calcium (Nox5, Duox1 et Duox 2) (Figure 20).



D'après l'analyse de leur séquence et de leur profil d'hydrophobicité, les Nox possèderaient toutes 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires ainsi que 4 résidus histidines qui coordonnent les 2 hèmes, une région C-terminale cytosolique présentant les sites de fixation pour le FAD et du NADPH. Nox1, Nox3 et Nox4 ont une taille similaire à celle de Nox2 alors que Nox5 possède une extension supplémentaire en position N-terminale. Nox1 et Nox 3 présentent environ 60% d'homologie de séquence avec Nox2, Nox4 en possède 40% tandis que Nox5 n'en possède que 27%.



La famille des Duox (Duox1 et Duox2) présente une extension N-terminale ainsi qu'une hélice  $\alpha$  transmembranaire supplémentaire.

Concernant leur rôle dans les cellules non phagocytaires, c'est un domaine d'étude en plein essor mais il semble qu'elles soient impliquées dans la défense de l'hôte et l'inflammation, la croissance cellulaire et la régulation de l'expression génique, la transduction du signal cellulaire (Bedard et al. 2007).

### **III.2 Distribution tissulaire des Nox**

Nox1 est majoritairement exprimée dans les cellules épithéliales du côlon et dans les cellules musculaires lisses (Suh et al. 1999). Elle est également retrouvée à un moindre niveau d'expression dans les macrophages ou les mastocytes (Katsuyama 2010).

Nox2, initialement découverte dans les cellules phagocytaires, est également retrouvée dans les cellules non phagocytaires telles que dans les lymphocytes B, neurones, les cardiomyocytes, les hépatocytes, les cellules endothéliales ou encore les cellules souches embryonnaires (Bedard et al. Krause 2007). Nox2 est la seule NADPH oxydase retrouvée dans les neutrophiles.

Nox3, elle, a été mise en évidence exclusivement dans l'oreille interne (Paffenholz et al. 2004). L'activité de Nox3 entraîne des dommages au sein des otoconies en réponse au cisplatine et a été associée à l'apoptose des cellules de la cochlée (Mukherjea et al. 2010).

Nox4 est exprimée dans de nombreux types cellulaires (Chen et al. 2012; Lassegue et al. 2012). Initialement baptisée Renox (oxydase rénale) suite à son identification dans le rein (Geiszt et al. 2000), elle a été identifiée dans les cellules souches hématopoïétiques (Piccoli et al. 2005) et embryonnaires (Bartsch et al. 2011), dans les kératinocytes (Chamulitrat et al. 2004), les neurones (Vallet et al. 2005; Kleinschnitz et al. 2010), les chondrocytes (Grange et al. 2006; Kim et al. 2010). Nox4 a été également associée à la prolifération des mélanocytes (Yamaura et al. 2009) ou encore, elle a été mise en évidence dans les cellules endothéliales (McKallip et al. 2006; Basuroy et al. 2009; Sancho et al. 2009).

Nox5 a été décrite en premier lieu dans les organes lymphoïdes et dans les testicules (Banfi et al. 2001).

Enfin, les Duox sont exprimées dans la thyroïde mais également dans les cellules épithéliales, la prostate, les testicules ou encore le pancréas (Katsuyama 2010).

### III.2.1 La NADPH oxydase phagocytaire Nox 2

La NADPH oxydase phagocytaire, Nox2, est la mieux connue des Nox. Son défaut d'activité au sein des phagocytes se traduit par une maladie, la granulomatose septique chronique (CGD, « *Chronic granulomatous Disease* »).

#### III.2.1.1 La granulomatose septique chronique (CGD)

La granulomatose septique chronique est une immunodéficience primaire d'origine génétique, affectant 1/250000 personnes (Segal et al. 2000). Les patients atteints de CGD présentent dès leur plus jeune âge, des infections fongiques et bactériennes récurrentes graves associées à des manifestations inflammatoires (Winkelstein et al ; 2000). Le tableau clinique est très hétérogène d'un patient à l'autre tant dans l'expression que dans la gravité. La forme la plus fréquente concerne la CGD à transmission liée à l'X (CDGX) (environ 65%) dont la gravité est plus sévère que les formes de transmission autosomique récessive (CGDAR) (Segal et al. 2000).

La CGD est causée par des mutations dans l'un des 5 gènes codant pour les différentes sous-unités du complexe NADPH oxydase Nox2 (ou gp91<sup>phox</sup>), p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> ou p40<sup>phox</sup> (phox= phagocyte oxidase) (Tableau 12)

**Tableau 12. Les formes génétiques de la granulomatose chronique septique et leur fréquence**

Dénomination	Gène impliqué	Sous-unité	Mode de transmission	Fréquence
CGD91X	CYBB	gp91phox (Nox2)	Récessive liée à l'X	65% (Segal et al. 2000)
CGD22AR	CYBA	p22phox	Récessive autosomale	<5% (Cross et al. 2000)
CGD47AR	NCF1	p47phox		25% (Cross et al. 2000)
CGD67AR	NCF2	p67phox		<5% (Cross et al. 2000)
CGD40AR	NCF4	p40phox		1 cas (Matute et al. 2009)

La CDG91X résulte d'une mutation au niveau du gène CYBB qui code pour la sous-unité Nox2 (gp91<sup>phox</sup>) du cytochrome *b*<sub>558</sub> (Segal 1987). Les formes autosomales récessives touchant le gène codant pour p47<sup>phox</sup> représentent près de 25% des CGD alors que celles affectant l'expression de p22<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> comptent chacune pour moins de 5% de la population atteinte (Cross et al. 2000). Un seul cas de CGD liée à une mutation du gène codant pour p40<sup>phox</sup> a été rapporté (Matute et al. 2009).

Les CGDAR avec des mutations du gène codant pour p22<sup>phox</sup> entraînent l'absence de synthèse du cytochrome *b*<sub>558</sub>. Ses formes cliniques sont sévères avec un taux de mortalité de 3-5 % par an (Kang et al, 2009). Les patients présentant une déficience de p67<sup>phox</sup> semblent avoir une mortalité plus élevée que les formes mutées pour p47<sup>phox</sup> (Van den Berg et al. 2009) qui, elles, ont un taux de mortalité de 1-2 % par an (Roos D. 1994).

Le niveau de sévérité de la maladie résulte de la fonction protéique codée pour le gène muté: la protéine p67<sup>phox</sup> (activateur) est connue comme étant essentielle au fonctionnement du complexe NADPH oxydase avec une interaction spécifique avec Nox2, alors que p47<sup>phox</sup> joue le rôle d'organisateur de l'assemblage de ce complexe (Kuhns et al. 2010).

### **III.2.1.2 La NADPH oxydase phagocytaire**

La NADPH oxydase phagocytaire ou Nox2 est un complexe enzymatique qui se compose d'un centre catalytique membranaire, le cytochrome *b*<sub>558</sub>, formé des deux sous-unités, Nox2 (ou gp91<sup>phox</sup>) p22<sup>phox</sup>, de trois facteurs cytosoliques p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> et de deux protéines G monomériques Rac et Rap1A.

Dans les neutrophiles au repos, une grande partie du cytochrome *b*<sub>558</sub> est concentrée dans les granules spécifiques, et seulement 5 à 20 % sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique (Ginsel et al. 1990). Lors de l'activation du neutrophile, la membrane des granules fusionnent avec la membrane plasmique ce qui enrichit la surface du PMN en cytochrome *b*<sub>558</sub> la membrane plasmique (Morel et al. 1985).

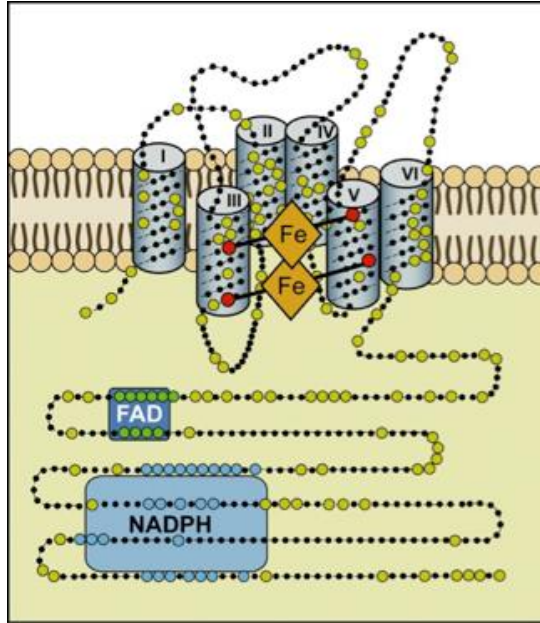
#### **III.2.1.2.1 Le complexe membranaire : le flavocytochrome *b*<sub>558</sub>**

Le cytochrome *b*<sub>558</sub> est une flavohémoprotéine transmembranaire, constituée de 2 sous-unités : p22<sup>phox</sup> et Nox2 (ou gp91<sup>phox</sup>). Les deux sous-unités sont assemblées selon une stoechiométrie 1:1. La synthèse de ses deux sous-unités est nécessaire pour leur stabilisation mutuelle au niveau de la membrane : l'absence de l'une ou l'autre des sous-unités conduit à l'absence du cytochrome *b*<sub>558</sub> (Dinauer et al. 1990 ; Yu et al. 1997).

##### **III.2.1.2.1.1 Nox2 ou gp91<sup>phox</sup>**

Nox2 (ou gp91<sup>phox</sup>) est une protéine fortement glycosylée de 570 acides aminés (65,3 kDa) (Figure 21). La masse apparente de 91 kDa, déterminée après migration électrophorétique, a donné son nom à la protéine glycosylée mature. La protéine Nox2 est le centre redox du complexe. Nox2 est composée de 6 hélices transmembranaires du côté N-terminal comportant 3 sites extracellulaires de glycosylation et 2 boucles intra-cytoplasmiques. Elle possède toute la chaîne de transfert d'électrons : un site de fixation du NADPH (Taylor et al. 1993), le donneur d'électron, un site de liaison du FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et deux hèmes de potentiel rédox différent (un hème à -225mV (interne) et un à -265mV (externe)), coordonnés

par quatre histidines localisées dans le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> passage transmembranaire (Biberstine-Kinkade et al. 2001). Lorsque l'enzyme est activée, les électrons du NADPH sont transférés via le FAD et les hèmes à l'oxygène moléculaire O<sub>2</sub>, ce qui permet la formation d'ions superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>.



**Figure 21. Domaines structuraux de Nox2.**

*NOX2 est une protéine transmembranaire comprenant des parties C-terminale et N-terminale cytosoliques séparées par 6 hélices  $\alpha$ . Les domaines de liaison au NADPH et au FAD sont figurés ainsi que les 4 Histidines des 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> passages transmembranaires permettant la coordination des noyaux hèmes contenant un atome de fer. D'après Bedard et al. 2007.*

### III.2.1.2.1.2 La sous-unité p22<sup>phox</sup>

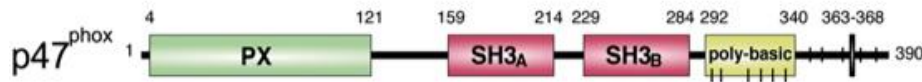
La sous-unité de p22<sup>phox</sup> est une protéine de 195 acides aminés (21 kDa). Son profil d'hydrophobicité indique la présence de 3 passages transmembranaires du côté N-terminal alors que son domaine cytosolique C-terminal contient une région riche en résidus proline (PRR, *Proline Rich Region*) au niveau de laquelle se fixe la région SH3 (*Src homolgy domain 3*) de p47<sup>phox</sup>. p22<sup>phox</sup> est essentielle à la maturation et à la stabilité de Nox2 (DeLeo et al, 2000).

### III.2.1.2.2 Les facteurs cytosoliques

#### III.2.1.2.2.1 Sous-unités p47<sup>phox</sup>

La sous-unité p47<sup>phox</sup> est une protéine très basique de 390 acides aminés (44,7 kDa) (Volpp et al. 1989). Elle possède un domaine C-terminal riche en résidus arginine et sérine avec 11 sites potentiels de phosphorylation. A l'état de repos, p47<sup>phox</sup> a une conformation repliée masquant les domaines SH3. Cette conformation fermée est due à la présence d'un domaine auto-inhibiteur (AIR) qui interagit avec les domaines SH3 en intramoléculaire. Au moment de

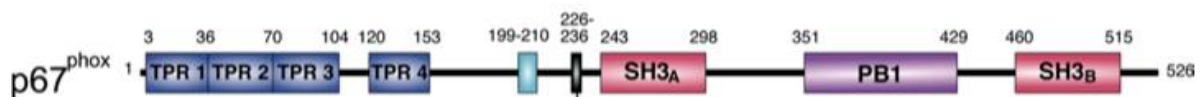
l'activation des cellules, des phosphorylations dans la région C-terminale de p47<sup>phox</sup> induisent le dépliement de la protéine et son interaction avec les autres constituants de la NADPH oxydase. Son domaine SH3 permet sa liaison avec p67<sup>phox</sup> (Yuzawa et al, 2004) et p22<sup>phox</sup> (sumimoto al. 1994) alors que le domaine PX (« *Phox homology* ») permet son ancrage à la membrane plasmique par l'interaction de phospholipides membranaires (Kanai et al, 2001) (Figure 22). Lors de l'activation de la NADPH oxydase, elle orchestre la migration des trois facteurs cytosoliques jusqu'au cytochrome b<sub>558</sub> (El-Benna et al. 2009).



**Figure 22. Domaines structuraux du facteur cytosolique p47phox de la NADPH oxydase.** PX=« *Phox homology* », PB1=« *Phox and Bem1* », PRR=« *Proline Rich Region* », SH3=« *Src Homology domain 3* ». D'après Groemping et al. 2005.

#### III.2.1.2.2.2 Sous-unités p67phox

La sous-unité p67<sup>phox</sup> est une protéine de 526 acides aminés (59,8 kDa) (Segal et al. 2000). p67<sup>phox</sup> possède des domaines d'interaction protéine-protéine: du côté N-terminal, elle possède un domaine répété en motif TPR (« *Tetratricopeptide Repeat* ») (Koga et al. 1999) qui interagit avec la protéine Rac selon une stoechiométrie 1:1 (Ahmed et al, 1998, Lapouge et al. 2000). Le motif riche en proline de p67<sup>phox</sup> permet la liaison avec la sous-unité p47<sup>phox</sup>. Enfin, c'est par l'intermédiaire du domaine PB1 (« *Phox and Bem1* ») que p67<sup>phox</sup> engage des liaisons avec p40<sup>phox</sup> (Ito et al. 2001 ; Nakamura et al. 1998) (Figure 23). La protéine p67<sup>phox</sup> possède également un domaine activateur, comprenant les acides aminés 199 à 210, et interagissant directement avec le cytochrome b<sub>558</sub> (Nisimoto Y et al. 1999 ; Nisimoto Y et al. 2004). Ce domaine est indispensable à l'activation de Nox2 et à la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

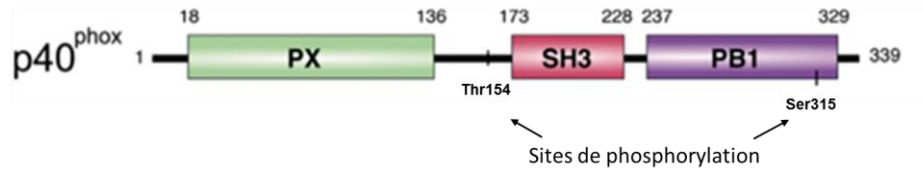


**Figure 23. Domaines structuraux du facteur cytosolique p67phox de la NADPH oxydase.** PB1=« *Phox and Bem1* », TPR=« *Tetratricopeptide Repeat* », SH3=« *Src Homology domain 3* », région 226-236 = région riche en proline, domaine activateur (199-210). D'après Groemping et al. 2005.

#### III.2.1.2.2.3 Sous unité p40phox

La sous-unité p40<sup>phox</sup> est une protéine de 339 acides aminés (39 kDa). Elle possède un domaine PB1 qui interagit avec le domaine PB1 de p67<sup>phox</sup> (Nakamura et al. 1998) ainsi qu'un domaine SH3 susceptible de lier le domaine PRR de p22<sup>phox</sup> (Tamura et al. 2007) (Figure 24). Le rôle de p40<sup>phox</sup> a longtemps été source de débat : la découverte d'un cas de granulomatose

septique par mutation d'un acide aminé du domaine PX (Matute et al. 2009) ainsi que la mise au point de modèles murins invalidés pour p40<sup>phox</sup> (Chessa et al. 2010) ont permis de souligner le rôle activateur de cette molécule dans l'assemblage du complexe NADPH oxydase.



**Figure 24. Domaines structuraux du facteur cytosolique p40phox de la NADPH oxydase.** PX=" Phox homology", PB1=" Phox and Bem1", PRR=" Proline Rich Region", SH3=" Src Homology domain 3". Les sites de phosphorylation Thr154 et de la Ser315 sont figurés. D'après Groemping et al. 2005

### III.2.1.3 Protéine Rac

C'est une protéine G monomérique à activité GTPase qui se lie à p67<sup>phox</sup> du complexe actif de la NADPH oxydase (Abo et al. 1991). Il existe 3 isoenzymes Rac1, Rac2 et Rac3 qui appartiennent à la sous-famille Rho de la superfamille Ras. Rac1 est très ubiquitaire alors que rac est retrouvé uniquement dans les cellules de la lignée myéloïde. Au repos, Rac lié au GDP est cytoplasmique et associée à une protéine RhoGDI (GDP Dissociation Inhibitor). L'activation du complexe de la NADPH oxydase s'accompagne de la dissociation de rhoGDI, de l'échange GDP/GTP et de la translocation de Rac à la membrane (Geiszt et al. 2001). Ce changement conformationnel permet à la protéine Rac de se lier à p67<sup>phox</sup> et au cytochrome *b<sub>558</sub>* et de participer à l'activation de la NADPH oxydase (Nisimoto et al, 1997). Dans le neutrophile humain, c'est l'isoenzyme Rac 2 qui est prédominante (Knaus et al. 1991).

### III.2.1.4 La protéine Rap1A

Rap1A est une petite protéine G à activité GTPase de 22 kDa qui appartient à la famille Ras et qui très abondante dans les neutrophiles. Sous sa forme active, elle se lie au cytochrome *b<sub>558</sub>* (Bokoch et al. 1991).

Le rôle de cette protéine G n'est pas clairement élucidé. Elle pourrait être *in vivo* un régulateur de la NADPH oxydase. Des travaux montrent que Rap1A augmente l'efficacité de la voie de transduction du signal PKC-dépendante, et d'autres, réalisés sur une lignée cellulaire promyélocytaire (les cellules HL-60) suggèrent un rôle d'activateur final de l'activité oxydase (Labadia et al 1993 ; Maly et al. 1994; Gabig et al. 1995).



### III.2.2 L'activation de Nox2 dans les neutrophiles

#### III.2.2.1 « Priming » des PMN : la préactivation de la NADPH oxydase

La préactivation des PMN peut avoir lieu en réponse à de faibles concentrations d'agents pro-inflammatoires. Dans cet état de « *priming* », l'activité bactéricide des PMN, en particulier l'activité NADPH oxydase, va être accrue en réponse à un deuxième stimulus, et va ainsi favoriser la destruction du pathogène. Lorsque le système est dérégulé, on peut voir un « *priming* » excessif des PMN qui va se traduire par une libération exagérée de ROS dans le milieu extracellulaire, contribuant ainsi à des lésions tissulaires. Ce « *priming* » excessif des PMN semble impliquer dans de nombreuses pathologies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, atherosclérose, sepsis...) (El-Benna et al. 2008).

Le « *priming* » des PMN est observé en réponse à de faibles concentrations de cytokines, telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-8, de facteur de croissance tels que le GM-CSF, G-CSF (Elbim et al. 1994 ; Khwaja et al. 1992) ou en présence de molécules d'origine bactérienne comme le LPS (Ward et al. 2000) et le fMLP (Marasco et al. 1984).

#### Effet du « priming » sur la NADPH oxydase :

La phosphorylation partielle de p47<sup>phox</sup> semble un évènement important dans ce mécanisme (Dang et al. 1999b). En réponse à une stimulation par le TNF $\alpha$ , la Ser345 de p47<sup>phox</sup> est phosphorylée par les p38- ou ERK1/2 MAP-kinases et peut interagir avec la proline isomérase activée (Pin-1) qui catalyse un changement de conformation de p47<sup>phox</sup>, ce qui va faciliter les phosphorylations ultérieures par la PKC (Boussetta et al. 2010).

Lors d'une stimulation par des fortes doses de TNF $\alpha$ , l'expression des récepteurs au fMLP est augmentée (McColl et al. 1990) et la concentration de cytochrome *b<sub>558</sub>* est accrue à la membrane plasmique par le recrutement des granules (Ward et al. 2000). Par exemple, dans la lignée cellulaire HL-60 différenciée en pseudo-neutrophiles, la pré-stimulation par l'IL-8 entraîne un afflux de calcium responsable de l'augmentation de production de ROS par Nox2 en réponse au fMLP (Brechard et al. 2005). En général, la réponse à une deuxième stimulation des neutrophiles à l'état de priming est ensuite potentialisée.

#### III.2.2.2 Mécanismes d'activation de la NADPH oxydase

A l'état de repos, le complexe enzymatique de la NADPH oxydase est dissocié et son activation conduit à la translocation des facteurs cytosoliques phosphorylés à la membrane plasmique ou à celle du phagosome avec la formation d'un complexe actif. Ce mécanisme se déroule en plusieurs étapes (Figure 25) :

Suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur couplé à une protéine G trimérique ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), celle-ci fixe une molécule de GTP puis se dissocie (1). La sous-unité  $\alpha$  liée au GTP active la phospholipase C (PLC) qui produit de l'inositol-3-phosphate (IP<sub>3</sub>) et du diacylglycérol (DAG) à partir du phosphatidylinositol 4-5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) (2). Cela conduit à l'activation de la phospholipase D qui hydrolyse les phosphatidylcholines (PC) en acides phosphatidiques (PA) qui sont ensuite convertis en DAG (3). IP<sub>3</sub> entraîne le relargage du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) des stocks intracellulaires pour induire la translocation de la protéine kinase C (PKC) vers la membrane plasmique (4). La PKC est activée par le DAG, phosphoryle les facteurs cytosoliques (5) et provoquent leur translocation à la membrane (6). La PKC phosphoryle aussi la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (7) qui conduit à la formation de l'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides membranaires (8). La protéine Rac migre de manière indépendante vers le complexe de membrane plasmique (9). L'assemblage du complexe à la membrane conduit à l'activation de la NADPH oxydase et à la formation d'ions superoxyde (10).

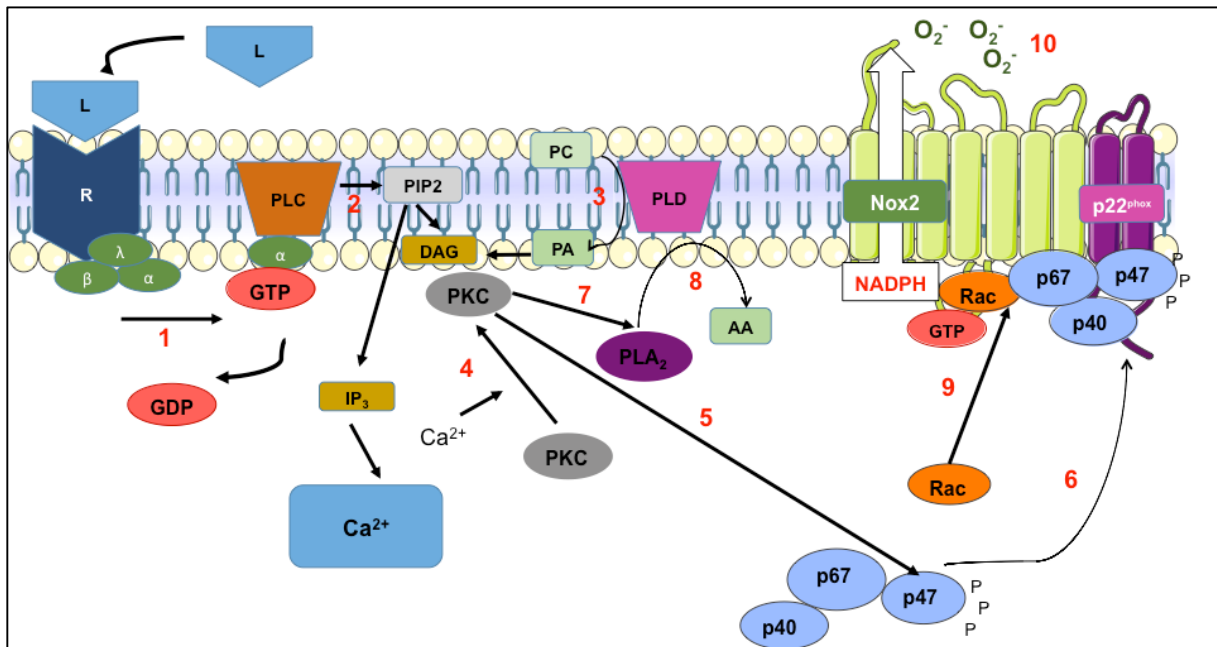


Figure 25. Activation de la NADPH oxydase phagocytaire. Voir texte pour mécanisme

### III.2.2.2.1 Voies d'activation par le PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

Le PMA est connu comme étant un activateur non physiologique de la NADPH oxydase. Il induit une stimulation directe de la PKC en biaisant toute la signalisation située en amont dans les conditions normales de stimulation du neutrophile. L'activité oxydase qui en résulte est maximale. Le PMA est devenu le contrôle positif le plus communément employé pour l'étude de l'activation du complexe NADPH oxydase.

Parmi les 11 isoenzymes existantes des PKC, ce sont les PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  qui participent à



l'activation de l'oxydase induite par le PMA, et en particulier l'isoforme  $\beta$  qui joue un rôle majeur (Dekker et al. 2000). Elles participent à la transduction du signal d'activation et à la phosphorylation des facteurs cytosoliques (Figure 26) :

- En tant qu'effecteur direct, les PKC phosphorylent les sous-unités du complexe oxydase et les différents facteurs cytosoliques en particulier  $p47^{\text{phox}}$ , mais également  $p22^{\text{phox}}$  et Nox2 (El-Benna et al. 2009 ; Raad et al. 2009).
- En tant qu'effecteur indirect, les PKC activées par le PMA stimulent les MAPK (« *mitogen-activated protein kinases* ») ERK1/2 (« *extracellular signal-regulated kinase 1/2* ») et p38. Les MAPK ERK1/2 et p38 sont activées par des voies distinctes menant à la phosphorylation de  $p67^{\text{phox}}$  (Dang et al. 2003). Les MAPK ERK1/2 et p38 sont également impliquées dans l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) permettant la libération d'acide arachidonique (AA) lui-même activateur de la NADPH oxydase (Maridonneau-Pariniet al. 1986 ; McPhail et al. 1984 ; Lin et al. 1993 ; Hazan-Halevy et al. 2000 ; Hii et al. 2007 ; Syrbu et al. 1999).

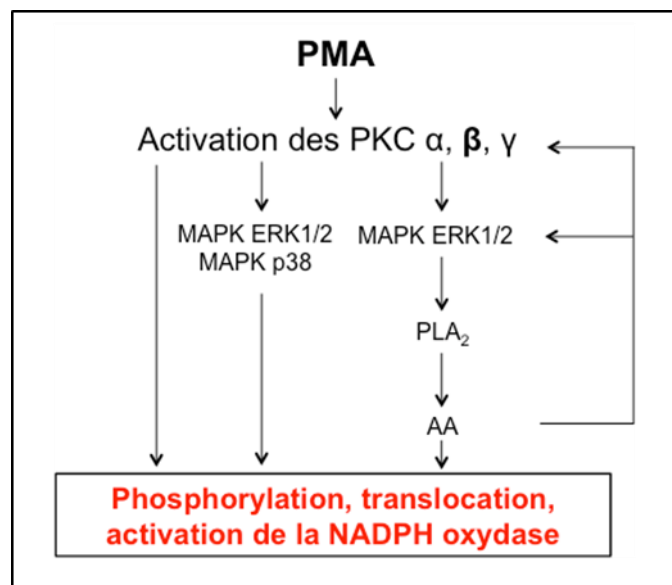
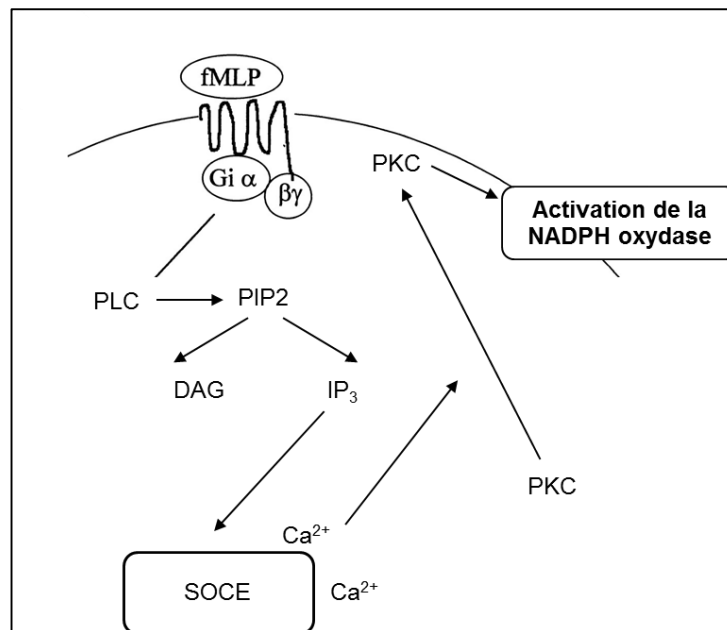


Figure 26. Voies d'activation de la NADPH oxydase par le PMA

### III.2.2.2 Voies d'activation par le formyl Méthyl-Leucyl-Phénylalanine (fMLP)

Le fMLP est un tripeptide formylé qui est un puissant facteur chemoattractant pour les neutrophiles produit lors de la dégradation d'*Escherichia coli* (Marasco et al. 1984). Le fMLP se lie à des récepteurs de surface spécifiques aux formyl-peptides bactériens, appelés FPR (« *formyl peptides receptors* »). Ces récepteurs régulent en aval les phénomènes de chimiotactisme, de la dégranulation et de l'activité oxydase. Les FPR sont couplés à une

protéine G hétérotrimérique. Après association avec son ligand fMLP, le récepteur subit un changement conformationnel ce qui permet son interaction avec la protéine G. Il se produit alors un échange du GDP en GTP au niveau de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G qui s'accompagne de la dissociation des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur qui sont les effecteurs de transduction du signal (Boulay et al. 1990; Suzuki et al. 1996). A l'instar de l'effet du PMA, le fMLP induit une production d'anions superoxyde de courte durée, avec très peu de phase de latence car les récepteurs FPR subissent une inactivation rapide. Le GTP entraîne l'activation de différentes cascades de signalisation dans les neutrophiles humains (Figure 27). L'association ligand/récepteur engendre notamment l'activation de la phospholipase C (PLC) qui réalise l'hydrolyse de PIP2 en DAG et IP3 (Takenawa et al, 1985 ; Li et al, 2000). L'IP3 entraîne une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre  $\text{Ca}^{2+}$  via le système SOCE (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry) (Brécharde et al. 2008). La libération du  $\text{Ca}^{2+}$  conduit à la translocation membranaire de la PKC qui phosphoryle les sous-unités du complexe NADPH oxydase et les différents facteurs cytosoliques.



**Figure 27. Voies d'activation de la NADPH oxydase par le fMLP.**

Le fMLP se lie à des récepteurs de surface spécifiques aux formyl-peptides bactériens, appelés FPR (« formyl peptides receptors »), couplés à une protéine G. Après association avec son ligand fMLP, le récepteur subit un changement conformationnel permettant son interaction avec la protéine G. Il se produit alors une conversion en GTP de la molécule de GDP fixée au niveau de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G. Cette conversion s'accompagne de la dissociation des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur qui sont les effecteurs de transduction du signal. La formation de GTP entraîne l'activation de différentes cascades de signalisation dans les neutrophiles humains. L'association ligand/récepteur engendre notamment l'activation de la phospholipase PLC qui réalise l'hydrolyse de PIP2 en DAG et IP3. L'IP3 entraîne une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre  $\text{Ca}^{2+}$  via le système SOCE (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry). La libération du  $\text{Ca}^{2+}$  conduit à la translocation membranaire de la PKC qui phosphoryle les sous-unités du complexe oxydase et induit l'activation de la NADPH oxydase.

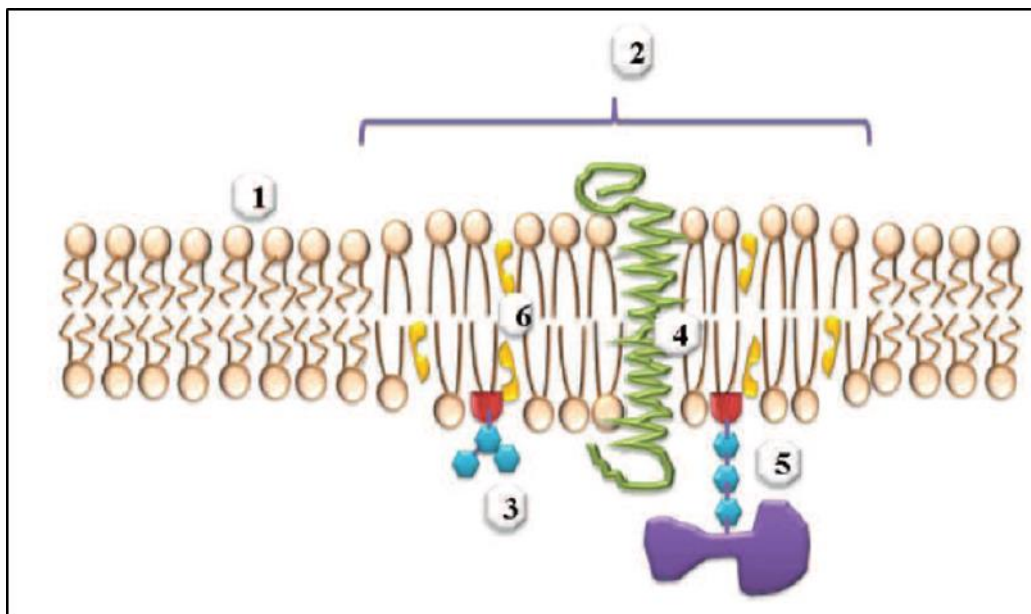
### III.2.2.2.3 Voies d'activation par le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est un constituant des fragments de la paroi externe des bactéries Gram négatives (*e.g. Salmonella, E. Coli* etc) qui sont fortement immunogènes. Dans un premier temps, le LPS se fixe au LPB (« LPS-binding protein »), protéine sérique dont le principal rôle est de présenter le LPS sous sa forme monomérique au récepteur CD14 des cellules phagocytaires. Présent dans l'organisme sous forme membranaire (mCD14) et soluble (sCD14), il possède un site d'ancrage à la membrane cellulaire grâce au groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol) du côté C-terminal. La fixation du LPS au CD14 ne provoque pas d'activation cellulaire immédiate. Le laps de temps nécessaire à l'activation (15 à 30 minutes) s'explique par la nécessité d'internaliser le complexe LPS/CD14 (Triantafilou et al. 2002). Dans un deuxième temps, ces composants bactériens sont reconnus par le neutrophile grâce la présence de motifs moléculaires dénommés PAMP (« *pathogen-associated molecular pattern* »). Il existe des récepteurs, les « *pattern recognition receptors* » (PPR) qui reconnaissent spécifiquement ces PAMP et activent la réponse immunitaire. Ces récepteurs portent également le nom de récepteurs « *Toll-like* », les TLR. C'est en 1996, qu'Hoffmann et son équipe mettaient en évidence chez la drosophile le rôle de ces récepteurs Toll dans la reconnaissance d'agents fongiques (Lemaitre et al. 1996). Ces travaux lui ont valu le prix Nobel de médecine en 2011 (Wagner 2012). Ce sont des protéines transmembranaires contenant, dans leur domaine extracellulaire, une région riche en leucine, et un segment intracytoplasmique avec une région conservée appelée domaine TIR (« *Toll/IL-1 receptor* »), commun aux récepteurs pour l'IL-1 et l'IL-18. C'est le récepteur TLR4 qui est activé par le LPS bactérien.

La reconnaissance du complexe PAMP/LBP au complexe TLR4/CD14, en coopération avec une protéine périmembranaire, MD2 est un prérequis pour induire la signalisation intracellulaire (Takeda et al, 2003). Cette dimérisation est à l'origine d'une cascade d'activation moléculaire intracellulaire incluant des molécules comme MyD88 (« *myeloid differentiation factor 88* ») et le groupe des « *IL1-R associated serine kinase* » (IRAK) (Medzhitov R, 1997) et de MAPK p38. Cette cascade conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, responsable de la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-1 et IL-12) et directement effectrices comme le TNF $\alpha$  aboutissant à la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Cette cascade est également à l'origine de l'activation des PKC et des MAPK. Classiquement, ces protéines sont responsables de la phosphorylation des facteurs cytosoliques du complexe oxydase et de leur translocation à la membrane conduisant à l'activation de la NADPH oxydase (Lee et al. 2012, Belcher et al. 2014). Une autre étude démontre également que la voie de signalisation d'activation de la NADPH oxydase par le LPS entraîne la migration de la protéine Rac au complexe membranaire (Zhang et al. 2011).

### III.2.3 Régulation de la NADPH oxydase par compartimentation membranaire

Les lipides membranaires du neutrophile sont répartis de manière hétérogène, faisant émerger des microdomaines plus ou moins flexibles au sein de la membrane plasmique (Nebl et al. 2002). Les radeaux lipidiques et les cavéoles sont des régions membranaires de 50 à 300nm, riches en cholestérol et en sphingolipides (Figure 28). Ils constituent des plateformes membranaires rigides permettant des interactions privilégiées pour l'activité de certaines protéines, notamment des enzymes du métabolisme du glucose qui sont transférées à la membrane plasmique lors de leur activation (Lloyd et al. 2001). Lors de l'explosion respiratoire du PMN, les facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase colocalisent dans ces radeaux lipidiques (Shao et al. 2003; Vilhardt et al. 2004). Ces microdomaines semblent impliqués dans l'initiation de l'activité NADPH oxydase en favorisant les interactions entre les facteurs cytosoliques et le cytochrome *b<sub>558</sub>* (Shao et al. 2003). Une étude montre que des PMN de souris invalidées pour le gène de la cavéoline, ont une production de ROS nettement diminuée (Hu et al. 2008) en réponse au fMLP.



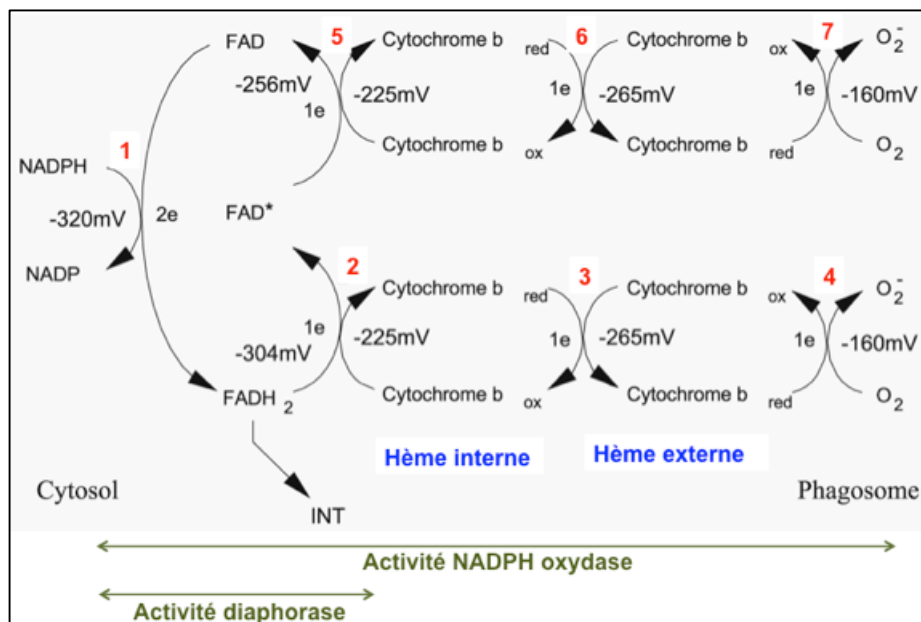
**Figure 28. Schéma d'un radeau lipidique.**

1. Membrane cellulaire sans radeau lipidique 2. Radeau lipidique 3. Glycolipide 4. Protéines transmembranaires 5. Bras GPI (glycosylphosphatidylinositol).

### III.2.4 Le processus de transfert d'électrons par le cytochrome *b*<sub>558</sub>

Plusieurs étapes d'oxydoréduction sont nécessaires au transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène pour former les anions  $O_2^{\cdot -}$ . (Figure 29).

La première étape consiste en un transfert de deux électrons du NADPH vers le FAD (1). Un électron est délivré par le FADH<sub>2</sub> réduit jusqu'à l'hème interne de Nox2 (2) qui ne peut accepter qu'un électron à la fois conduisant à la formation d'un élément radicalaire le FAD<sup>•</sup>. L'hème interne réduit l'hème externe (3) qui transfère ensuite un électron à une molécule d'oxygène, conduisant à la génération d'un anion superoxyde (4). Le deuxième électron du FAD<sup>•</sup> est délivré à nouveau à l'hème interne (5) qui le transfère à son tour vers l'hème externe (6) et enfin vers une autre molécule d'oxygène (7).



**Figure 29 : Processus de de transfert d'électrons par le cytochrome *b*<sub>558</sub>.** Le transfert de deux électrons du NADPH s'effectue en 7 étapes d'oxydoréduction avec passage des deux électrons vers le FAD (1), puis transmission d'un premier électron via les hèmes (2, 3, 4) et enfin transfert du second électron à partir du FAD<sup>•</sup> via les hèmes (5, 6, 7). L'activité diaphorase correspond aux étapes 1 et 2. INT : iodonitrotétrazolium. D'après Cross et al. 2004.

On appelle «activité diaphorase », le transfert d'électrons jusqu'au centre redox du FAD. Cette activité peut être distinguée de l'activité NADPH oxydase en employant un accepteur final d'électron de potentiel redox compatible avec le transfert direct des électrons depuis le FAD : l'INT (iodonitrotétrazolium). L'activité diaphorase est intrinsèque et ne nécessite pas la présence de tous les facteurs cytosoliques : les facteurs p67<sup>phox</sup> et Rac permettent de la stimuler (Han et al. 2001 ; Nisimoto et al. 2004).

#### IV. Rôle des ROS dans l'éthiopathogénie du TRALI

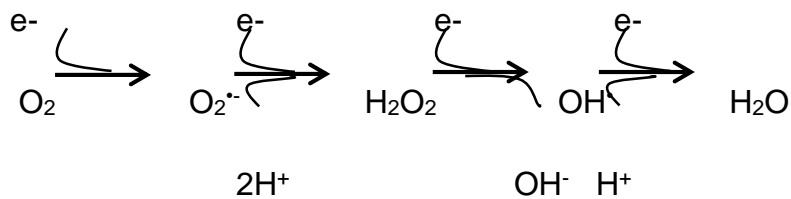
Le rôle principal des NADPH oxydase consiste en la production de dérivés réactifs de l'oxygène, les ROS. Néanmoins, ils peuvent provenir d'autres sources. La faible demi-vie des ROS (de l'ordre de la milliseconde) rend difficile la démonstration directe de leur implication dans la physiopathologie du TRALI mais de nombreux arguments suggèrent un rôle central des ROS dans l'initiation et l'évolution de cette complication transfusionnelle.

##### IV.1 Les ROS : formes réactives de l'oxygène

Les ROS (Reactive Oxygen Species) représentent des espèces chimiques dérivées dont l'anion superoxyde est le précurseur. Ils peuvent être séparés en deux groupes :

- Les composés radicalaires oxygénés tels que l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), peroxyde ( $ROO^{\cdot}$ ), hydroperoxyde ( $ROO^{\cdot}$ ), ou encore le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ).
- Les composés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , l'acide hypochlorique ( $HOCl$ ), l'ozone ( $O_3$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxydinitrite  $ONOO^-$ .

Tout commence par la réduction de l'oxygène en passant successivement par l'anion  $O_2^{\cdot-}$ , le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle et produit une molécule d'eau (Figure 30) :



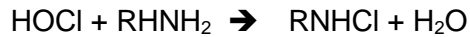
**Figure 30. Réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde.**

L'oxygène moléculaire est réduit en anion superoxyde par un électron, puis en peroxyde d'hydrogène par un autre électron en présence de  $2 H^+$ . Le radical hydroxyle est le produit issu de la réduction par un troisième électron s'accompagnant de la libération de  $2 OH^-$ . Enfin, la réduction par un autre électron en présence de l'ion  $H^+$  va donner de l'eau.

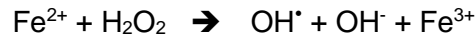
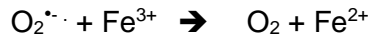
Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est relativement stable et peut diffuser à travers les membranes. Il a un pouvoir bactéricide et il peut être converti en ion hypochlorite  $OCl^-$ , oxydant très puissant également bactéricide.



L'acide hypochloreux  $HOCl$  peut réagir avec des amines et former des chloramines dont la durée de vie est plus longue et la toxicité très importante pour certaines d'entre elles :



Le peroxyde d'hydrogène peut être réduit en radical hydroxyl  $\text{OH}^\cdot$  selon la réaction suivante :



Enfin, l'association de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OCl}^-$  produit un oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  qui réagit notamment avec les lipides membranaires, initiant ainsi leur peroxydation.

## IV.2 Principales sources de génération des ROS

Les principaux protagonistes de la production de ROS dans la cellule sont la mitochondrie, la réaction catalysée par le système acellulaire xanthine/xanthine oxydase, certaines enzymes comme la NO synthase et tout particulièrement les NADPH oxydases.

### IV.2.1 La mitochondrie

La chaîne respiratoire des mitochondries est composée de 4 complexes enzymatiques (nommé complexe I, II, III et IV) au travers desquels circule un flux d'électrons fournis par le NADH et le FAD. Ce flux conduit à la réduction d'une molécule d'oxygène en molécule d'eau par 4 électrons et à un transfert de protons à travers la membrane interne, permettant la production d'ATP à partir d'ADP et de phosphate par l'ATP synthase. Le mécanisme de la production de ROS par la mitochondrie n'est pas clairement décrit mais il a été estimé qu'environ 1 à 2% des électrons sont détournés entraînant la formation d'anion superoxyde (Cadenas et al. 2000).

### IV.2.2 Le système acellulaire Xanthine/Xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est un homodimère qui contient une molécule de FAD (Flavine adénine dinucléotide) et du molybdène comme cofacteur (Harrison 2002). La XO intervient dans le catabolisme des purines après une cascade d'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis de la xanthine en acide urique et génère la production de ROS (Sanders et al. 1997). La XO est présente sous deux formes distinctes : sa forme initiale, la xanthine deshydrogénase (XD) qui utilise préférentiellement le  $\text{NAD}^+$  comme substrat mais elle est aussi capable d'utiliser l'oxygène moléculaire conduisant à la formation d'ions superoxyde. L'oxydation réversible (Nishino et al. 1997) ou irréversible (Amaya et al, 1990) de la XD conduit à sa deuxième forme, la xanthine oxydase. Sous cette forme, l'activité de la XO génère principalement des ROS.



### IV.2.3 La monoxyde d'azote synthase

La NO synthase (NOS) est une hémoprotéine homodimérique qui catalyse la transformation de l'arginine en citrulline entraînant la formation du composé radicalaire : l'oxyde nitrique, NO<sup>•</sup>. Il existe deux isoformes constitutives de la NOS : une forme neuronale (nNOS) et une forme exprimée dans l'endothélium (eNOS) dont l'activité est régulée par le Ca<sup>2+</sup>. Une NOS inducible (iNOS) peut aussi être exprimée en réponse à certaines cytokines ou endotoxines. En présence d'anion superoxyde, le NO<sup>•</sup> peut former très rapidement le peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>. Ce dernier possède un très fort pouvoir oxydant, capable notamment d'induire des dommages à l'ADN et la lipoperoxydation des lipides membranaires (Carr et al. 2001). La présence d'un cofacteur, la tétrahydrobioptérine (BH4) est nécessaire pour le fonctionnement de la NOS : en son absence ou après son oxydation par les ROS, la NOS fonctionne de manière découplée et produit des anions superoxyde. Son addition avec la NOS stimule donc la production de NO<sup>•</sup> au détriment de la synthèse de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

### IV.2.4 Les NADPH Oxydases

Contrairement aux autres systèmes produisant des ROS de manière fortuite, les NADPH oxydases ont comme unique fonction la production de ROS. Elles catalysent la réaction suivante :

NADPH oxydase



Aujourd'hui, nous savons que les NADPH oxydases sont la source principale de la génération cellulaire de ROS.





**ARGUMENTAIRE  
DE L'ETUDE  
ET  
OBJECTIFS**



L'œdème aigu lésionnel pulmonaire, TRALI est une complication transfusionnelle qui demeure méconnue sous bien des aspects, faute d'une définition précise tant au plan clinique qu'au plan étiologique. Le TRALI est sous estimé du fait de la connaissance imparfaite de son mécanisme et de son diagnostic controversé. Cette difficulté de diagnostic peut engager le pronostic vital du patient du fait d'une prise en charge inadaptée. Ce n'est que depuis une dizaine d'années que le TRALI est considéré comme une cause majeure de morbidité et de mortalité post-transfusionnelle par le système français d'hémovigilance et par les réseaux européens et nord-américains. De nombreux travaux furent consacrés au TRALI et les hypothèses étiopathogéniques qui en découlent sont fondées sur les observations suivantes : sur le plan anatomique, l'évidence du caractère lésionnel de cet œdème et sur la physiopathologie, le rôle pathogène de l'activation des neutrophiles au contact de l'endothélium lésé des capillaires pulmonaires.

Nous nous proposons dans ce travail d'approfondir les modalités de survenue du TRALI sur le plan immunologique au travers des questions suivantes :

- Quel est l'impact des anticorps anti-HLA dans le déclenchement du TRALI ?
- Quel lien existe-t-il entre le neutrophile et la cellule endothéliale?
- Quels sont les mécanismes impliqués dans l'activation des neutrophiles par les anticorps anti-HLA ?

Pour répondre à ces interrogations, ce travail est divisé en deux grandes parties:

- Dans un premier temps, nous avons évalué l'activation des neutrophiles par les anticorps anti-HLA et la conséquence sur l'endothélium
- Dans un second temps, nous avons analysé les mécanismes d'activation des neutrophiles par ces anticorps

Nous développerons dans ce travail, en appui avec les résultats expérimentaux, les points importants permettant d'une part de mieux comprendre la survenue du TRALI, afin d'en réduire l'incidence, et d'autre part d'améliorer les mesures de préventions stratégiques déjà mises en place.



# **MATERIELS ET METHODES**



**Le « Matériels et méthodes » de cette partie complète celui déjà rédigé et intégrée dans l'article soumis.**

## **I. Typage HLA**

Le sang provient de donneurs volontaires qui ont signé un consentement de don pour la recherche. Ils ont été prélevés au site de collecte de l'Etablissement Français du Sang de Grenoble. Le typage HLA des donneurs, est réalisé soit par une technique sérologique, soit par une technique de biologie moléculaire. Il est réalisé au laboratoire HLA de Grenoble.

La nomenclature HLA dépend de la technique de typage utilisée (Klein et al. 2000). Dans le cas d'une technique dite de sérologie, la nomenclature identifie le locus suivi d'un numéro identifiant l'antigène. Cette technique identifie directement le déterminant antigénique HLA exprimé à la membrane de la cellule. La nomenclature dite générique ou allélique utilisée en biologie moléculaire identifie la spécificité allélique HLA à partir de l'ADN. Elle est représentée par le nom du gène, suivi d'un astérisque et d'un numéro à deux chiffres (qui définit la spécificité de l'allèle) ou quatre à huit chiffres (qui précise le variant allélique d'un allèle donné).

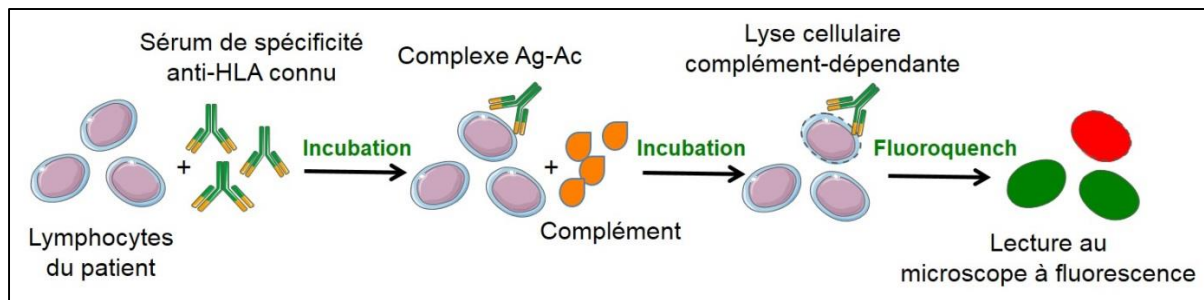
### **I.1 Technique de Sérologie : la lymphocytotoxicité complément-dépendante (LCT)**

#### **I.1.1 Principe de la lymphocytotoxicité-complément dépendante**

Depuis les années 1960, la lymphocytotoxicité complément-dépendante est considérée comme la technique de référence pour le cross-match (étude de compatibilité entre le sérum du receveur et les cellules du donneur pour prévenir d'un rejet post-greffe) et la recherche d'anticorps anti-HLA de classe I (Terasaki et al. 1964). Les antigènes HLA de classe I sont présents sur les cellules nucléées dont les lymphocytes. Les lymphocytes vivants sont incubés avec un mélange d'anticorps présentant différentes spécificités anti-HLA et de complément. Si les lymphocytes expriment l'antigène reconnu par l'anticorps HLA spécifique, la partie F'ab de l'anticorps se lie à l'antigène pour former un complexe antigène-anticorps. Après formation de ce complexe, la fraction C1q du complément se lie au fragment Fc de l'anticorps. Cette liaison entraîne l'activation en cascade des protéines plasmatiques formant le complément puis la lyse de la cellule.

Le typage HLA est réalisé à partir de cellules du sang périphérique prélevé sur tube ACD (Acide acétique, Citrate de sodium, Dextrose) par la technique décrite par Van Rood et al (Van Leeuwen et al. 1975) (Figure 31).






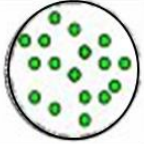
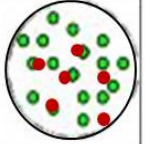
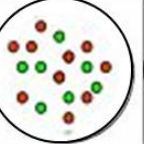
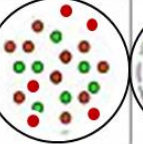
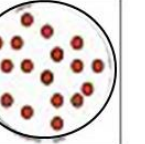
**Figure 31. La technique de lymphocytotoxicité complément dépendante (LCT).** Elle consiste à mettre en contact des lymphocytes de typage HLA inconnue avec des anticorps anti-HLA de spécificité connue. Si les lymphocytes expriment l'antigène reconnu par l'anticorps HLA spécifique, l'anticorps se lie à l'antigène pour former un complexe antigène-anticorps. En présence de complément, cette liaison entraîne l'activation du complément en cascade et conduit à la lyse cellulaire, mise en évidence par un colorant, le Fluoroquenck™. Dans une réaction négative, les lymphocytes restent vivants et sont colorés en vert; dans une réaction positive, les lymphocytes sont lysés et sont colorés en rouge.

### I.1.2 Protocole de la LCT

Le typage HLA de classe I (loci HLA-A et HLA-B) est réalisé sur les lymphocytes après leur isolement du sang périphérique. Les cellules mononucléées sont purifiées sur gradient de densité Ficoll-Hypaque selon la méthodologie adaptée de celle préalablement décrite par Böyum (Böyum 1968). Le sang total est dilué au tiers dans une solution de PBS. Cette dilution est déposée délicatement sur un gradient de Ficoll-Hypaque à raison d'un volume de Ficoll pour trois volumes de la dilution précédente. Une centrifugation de 20 minutes à 800 x g à 20°C permet de recueillir un anneau de cellules mononucléées à l'interface plasma-Ficoll ( $d < 1,077$ ). Cette couche contient environ 80% de lymphocytes T, 10% de lymphocytes B et 10% de monocytes. Les cellules recueillies sont ensuite lavées deux fois en tampon PBS. La suspension cellulaire finale est reprise dans du milieu RPMI1640 à une concentration comprise entre  $2 \times 10^6$  et  $4 \times 10^6$  cellules/ml.

Les lymphocytes totaux à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL sont distribués à température ambiante dans chaque micropuits d'une plaque de typage commerciale (plaque de Terasaki, One Lambda). Chaque plaque de Terasaki contient une batterie d'anticorps monoclonaux de spécificité anti-HLA connue et du complément de lapin. Après 1 heure d'incubation, la réaction est stoppée par ajout de 2 µl d'un colorant vital, le Fluoroquenck™, mélange d'acridine orange et de bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium s'intercale dans l'ADN des cellules mortes pour émettre une fluorescence rouge. Les cellules vivantes sont marquées d'une fluorescence verte par l'acridine orange. Le nombre de cellules lysées (rouges) et vivantes (vertes) est évalué au microscope inversé à fluorescence (Zeiss, Lambda Scan™). S'il n'existe pas de reconnaissance entre l'antigène des lymphocytes et l'anticorps, le complément n'est pas activé, les lymphocytes ne sont pas lysés.

La proportion des cellules vivantes et mortes est évaluée en SCORE (0, 1, 2, 4, 6, 8). La grille ci-dessous permet d'estimer cette classification par rapport au pourcentage de lymphocytotoxicité observée (standard ASHI, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2001) (Figure 32).

GRILLE D'ÉVALUATION DE LA MICROLYMPHOCYTOTOXICITE						
	illisible	0-10%	11-20%	21-50%	51-80%	81-100%
<b>LYSE CELLULAIRE</b> 						
<b>SCORES</b>	0	1	2	4	6	8
<b>INTERPRETATION</b>	Invalide	Négatif	Douteux	Faiblement positif	Positif	Fortement positif

**Figure 32. Grille d'évaluation de la lymphocytotoxicité, selon les recommandations de l'ASHI.** La proportion des cellules vivantes (colorées en vert) et mortes (colorées en rouge) est évaluée selon un SCORE (0, 1, 2, 4, 6, 8).

## I.2 Technique de biologie moléculaire : Sequence-Based-Typing (SBT)

Ces techniques sont basées sur l'amplification et la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin matrice (PCR). Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques, encadrant le brin à amplifier. La polymérisation se déroule de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' par une ADN polymérase qui ajoute successivement des désoxyribonucléotides présents dans le mélange réactionnel en large excès. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Il existe différentes méthodes permettant la réalisation des typages HLA en biologie moléculaire. Parmi elles, la technique de PCR-Sequence Specific Primers (SSP) utilise une ou deux amorces judicieusement choisies pour n'être capables de s'hybrider qu'avec une séquence déterminée spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèle (Olerup et al.1992). Une autre technique d'amplification, appelée Sequence Specific Oligonucleotides (SSO) utilise des amorces choisies dans des séquences conservées et, encadrant les régions polymorphes. Les produits amplifiés sont ensuite déposés sur une membrane avant d'être hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées par un marqueur radioactif ou une enzyme (Scharf et al. 1991). La dernière technique utilisée est le séquençage direct d'un fragment d'ADN amplifié par PCR.

### I.2.1 Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique est purifié à partir de 500µL de sang total à l'aide de l'extracteur MagNA Pure Compact (Roche) qui utilise des billes magnétiques recouvertes d'une couche de silice (kit Nucleic Acid Isolation Kit 1, Roche). Cette méthode d'extraction est basée sur la propriété des particules de silice à adsorber sélectivement les acides nucléiques. Après lyse des globules rouges, les billes magnétiques ainsi que de l'isothiocyanate de guanidium sont ajoutés. Ce sel modifie les conditions de stringence du mélange réactionnel et provoque l'adhésion des acides nucléiques aux billes de silice. Après lavage des billes magnétiques, les acides nucléiques sont élués à haute température en jouant sur la concentration en sels du milieu. Les solutions de lavages préconisées permettent de se débarrasser des contaminants tels que l'hémoglobine, les protéines plasmatiques ou les ions  $Fe^{2+}$ . L'ADN est conservé à +4°C ou -20°C dans de l'eau stérile. La mesure de la concentration en ADN se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible, le Nanodrop 2000™ (ThermoScientific) par mesure de l'absorbance (A) à 260 nm, le résultat est rendu en ng/µL. Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  permet d'évaluer la contamination de l'ADN par des protéines absorbant à 280 nm, et doit être compris entre 1,8 et 2.

### I.2.2 Principe de la Sequencing Based Typing (SBT)

Cette technique qui porte le nom de Sequencing based Typing (SBT) nécessite l'utilisation d'un logiciel permettant de comparer la séquence d'ADN du patient aux séquences HLA consensus des banques de données (Erich 2001). Le principe de cette méthode repose sur deux technologies clés : 1) l'amplification par PCR de la séquence des deux allèles d'un locus contenant les exons 2, 3, 4 pour les allèles HLA de classe I et II et 2) le séquençage automatisé direct de l'ADN amplifié par fluorescence, basé sur le principe de la méthode de Sanger.

La réaction de séquence consiste en une synthèse *in vitro* d'ADN avec une incorporation aléatoire de dideoxynucléotides à partir du fragment d'ADN amplifié qui sert de matrice. Une seule amorce de séquençage est hybridée sur l'ADN dans un milieu réactionnel qui contient un mélange de déoxynucléotides et de didéoxynucléotides. Un brin unique d'ADN va être synthétisée grâce à l'utilisation de l'AmpliTaq FS (AmpliTaq Gold®), enzyme qui possède une activité polymérasique 5'-3' et qui, comparée aux enzymes classiquement utilisées dans la réaction PCR, augmente le taux d'incorporation des dideoxynucléotides par rapport aux deoxynucléotides. La synthèse des brins monocaténaire est interrompue par l'incorporation aléatoire d'un ddNTP (2' et 3'dideoxynucléotide triphosphate) fluorescent empêchant la formation d'une liaison phosphodiester entre le 3'OH du premier nucléotide et le 5'phosphate du second. Un choix judicieux du rapport ddNTP/ dNTP permet statistiquement l'arrêt de l'élongation à chaque position du type de nucléotides (A, T, C, G). On obtient alors une

multitude de fragments de tailles différentes, tous terminés par un ddNTP. La synthèse d'ADN étant complémentaire de la matrice initiale : en face d'une base va être incorporé un dNTP ou un ddNTP fluorescent. Ces fragments néosynthétisés sont ensuite précipités et séparés par électrophorèse capillaire, et détectés via un laser qui vient exciter le fluorochrome, ce qui permet d'identifier la base correspondante. Un tracé nommé électrophorégramme est obtenu après lecture des fragments générés. La technique de séquençage pour les gènes HLA de classe I (locus A) est détaillée ci-après.

### ***1.2.2.1 Amplification des gènes HLA par PCR pour la méthode SBT***

Les amorces d'amplification sont choisies pour obtenir une amplification locus spécifique et encadrent les exons 2, 3, 4 de la classe I. Les exons 2, 3 et 4 codent respectivement pour le domaine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  de la chaîne  $\alpha$  de la molécule HLA de classe I.

La Taq polymérase ainsi que les mélanges d'amorce et de DNTP font partie d'un kit AlleleSEQR® pour lesquels les concentrations ne sont pas indiquées par le fournisseur (Tableau 13).

***Tableau 13. Mélange réactionnel pour l'amplification des gènes HLA par PCR.***

Réactifs		Mélange initial	Volume final	Nombre de réactions
<b>AmpliTaq Gold®</b>	Taq polymérase	0,3 $\mu$ L	16 $\mu$ L	1 PCR
<b>Pré-mélange PCR®</b>	Mélange de séquences d'amorces spécifiques du gène HLA + dNTP	16 $\mu$ L		
<b>ADN génomique</b>		20ng/ $\mu$ L	4 $\mu$ L	

La distribution des réactifs se réalise sur une plaque de 96 puits où chaque puits correspond à 1 PCR.

L'ADN est amplifié à l'aide d'un thermocycleur (Verity, LifeTechnologies™) et le programme d'amplification est lancé selon les indications du tableau 14.

**Tableau 14 Programme d'amplification de l'ADN génomique par PCR** (thermocycleur Veriti, LifeTechnologies)

Nombre de cycles	Température	Durée	Durée totale
1	95°C	10 minutes	2 heures 30
36	96°C	20 secondes	
	60°C	30 secondes	
	72°C	3 minutes	
1	4°C	Sans limite	

Après une première dénaturation à 95°C durant 10 min, le programme PCR est constitué de 36 cycles identiques se décomposant en : 20 sec à 96°C (dénaturation des doubles brins d'ADN), 30 sec à température d'hybridation des amorces de 60°C, 3 minutes à 72°C (température d'activation de la Taq polymérase, polymérisation de l'ADN). La réaction est stoppée puis la plaque est conservée à 4°C jusqu'à l'étape de purification des produits de PCR.

La taille et la spécificité des produits PCR sont contrôlées par migration électrophorétique de l'amplification sur gel d'agarose.

#### ***1.2.2.2 Contrôle d'amplification par migration sur gel d'agarose***

Le gel d'agarose 1 % (p/v) est obtenu par dissolution complète de 0,5 g d'agarose ultrapure (Invitrogen) dans 50 mL de tampon TAE 1X, puis ajout de bromure d'éthidium 0,1% (v/v) sous la hotte. 10 µL du produit de PCR mélangé à du tampon 1X, ou 5 µL dans le cas du marqueur de poids moléculaire (Euromedex®), est déposé dans un puits du gel. La migration électrophorétique dure 30 min sous une tension de 100V. La vérification de la migration et de l'amplification des produits de PCR se fait sous UV à l'aide la caméra Quantum ST4 et à l'aide du logiciel Image Camtup-Capt (Vilber Lourmat).

#### ***1.2.2.3 Purification des produits d'amplifications***

Cette étape s'effectue à l'aide du réactif « PCR cleanup Reagent » qui est un mélange d'exonucléase I et de phosphatase alcaline de crevette : l'exonucléase I dégrade les acides nucléiques pour permettre l'élimination des amorces PCR résiduelles et la phosphatase alcaline dégrade les groupements phosphate pour éliminer les dNTP non incorporés. Un volume de 3 µl de ce mélange est ajouté dans chaque puits avant centrifugation de la plaque pendant 2 min à 200 × g. La plaque est ensuite insérée dans le thermocycleur et le programme de purification est lancé selon les indications du tableau 15.

**Tableau 15. Programme de purification des produits de PCR (thermocycleur Veriti, LifeTechnologies)**

Nombre de cycles	Température	Durée	Durée totale
1	37°C	15 min	30 min
1	80°C	15 min	
	4°C	Sans limite	

Après une première étape d'incubation des produits de PCR avec l'exonucléase I et la phosphatase alcaline à 37°C pendant 15 minutes, les enzymes sont inactivés par une étape de chauffage à 80°C.

#### 1.2.2.4 Réaction de séquençage

Elle est réalisée à l'aide de séquences d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de l'exon ainsi que de l'apport de ddNTP fluorescents (BigDye® terminator) qui sont mis en contact avec le produit de PCR purifié qui sert de matrice. Les réactifs à mélanger ainsi que leur volume respectif sont indiqués dans le tableau 16.

**Tableau 16 Mélange réactionnel pour le séquençage des gènes HLA par PCR.**

Réactifs		Mélange initial	Nombre réaction
Mélanges de séquençage (spécifique de l'exon)	Amorces spécifiques de l'exon	7 µL	1 PCR
	Mélange ddNTP fluorescents (BigDye® Terminator)		
Mélanges de séquençages (réactifs HARPS®)*	Amorces spécifiques du motif de la séquence	7 µL	
	Mélange ddNTP fluorescents (BigDye® Terminator)		
Produit de PCR (dilution au 1:2)		4µL	

La distribution des réactifs se réalise sur une plaque de 96 puits où chaque puits correspond à 1 PCR (1 amorce de séquençage par puits).

Le tableau ci-dessous indique les noms des amorces utilisées pour l'amplification des gènes HLA du locus A et leur séquençage. Ils sont intégrés dans un kit commercialisé par AlleleSEQR® HLA-A ; les séquences précises de ces amorces ne sont pas données par le fournisseur.

**Tableau 17. Amorces de séquences AlleleSEQR® HLA-A pour l'amplification et le séquençage du locus HLA-A**

<b>Amorces de séquences AlleleSEQR® HLA-A</b>	
<b>Amplification (mélange de séquences d'amorces)</b>	
<b>HLA-A PCR Pre-Mix (pré-mélange HLA-A PCR)</b>	A PCR
<b>Séquençage (mélange de séquences d'amorces)</b>	
A Exon 2 Forward Sequencing Mix	A2F
A Exon 2 Reverse Sequencing Mix	A2R
A Exon 3 Forward Sequencing Mix	A3F
A Exon 3 Reverse Sequencing Mix	A3R
A Exon 4 Forward Sequencing Mix	A4F
A Exon 4 Reverse Sequencing Mix	A4R
<b>Mélanges de séquences d'amorces pour la résolution d'ambiguïtés)</b>	
A Exon 2 Forward 98T Sequencing Mix	A2F98T
A Exon 2 Forward 144a Sequencing Mix	A2F144A
A Exon 2 Forward 363G Sequencing Mix	A3F363G
A Exon 2 Forward 414C Sequencing Mix	A3F414C
A Exon 3 Reverse 539T Sequencing Mix	A3R539T

Les mélanges de séquençage de résolution incorporent des amorces pour la résolution d'ambiguïtés de typage (réactifs HARP®).

Le programme de séquençage du thermocycleur est lancé selon les indications du tableau 18.

**Tableau 18. Programme d'amplification pour le séquençage (thermocycleur Veriti, LifeTechnologies)**

<b>Nombre de cycles</b>	<b>Température</b>	<b>Durée</b>	<b>Durée totale</b>
<b>25</b>	98°C	20 sec	1h30
	50°C	30 sec	
	60°C	2 min	
<b>1</b>	4°C	Sans limite	

#### **1.2.2.5 Purification des produits des réactions de séquence obtenues**

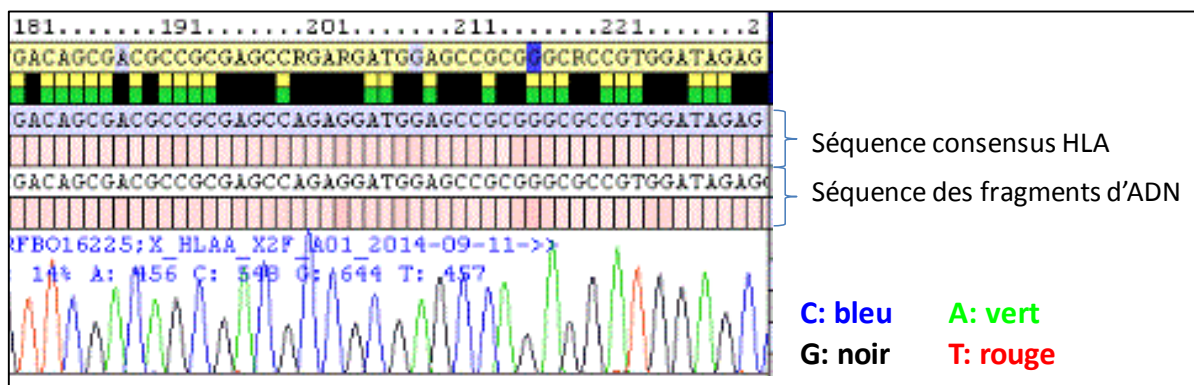
La purification des séquences d'ADN obtenues se fait par précipitation à l'éthanol. L'ajout de sels améliore cette précipitation alors que l'EDTA agit comme agent chélateur d'ions divalents pour inactiver les nucléases (les ions divalents jouant un rôle dans l'activité DNase). Un volume de 2 µL d'acétate de sodium (NaOAc) à 1,5M et d'EDTA à 250 mM est ajouté à chaque puits.



Après une brève centrifugation, 25 µl d'éthanol pur est distribué dans chaque puits puis la plaque est agitée vigoureusement. La plaque est ensuite centrifugée à 2000 x g pendant 30 min puis le surnageant est retiré en retournant la plaque sur du papier absorbant. 50 µl d'éthanol à 80% est ajouté et la plaque est à nouveau centrifugée à 2000 x g pendant 5 min.

#### 1.2.2.6 Séparation des séquences par électrophorèse capillaire

A la fin de l'étape de purification, les réactions de séquences d'ADN peuvent être conservées en culot sec à -20°C. Après ajout de 15 µl de formamide HiDi (Highly Deionized) permettant de bien remettre les échantillons en suspension, les produits de séquençage sont séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. Ils sont ensuite identifiés par lecture laser sur le séquenceur (Applied Biosystem Prism 3730 DNA analyser), détectable via un laser qui vient exciter le fluorochrome, ce qui permet d'identifier la base correspondante. Le résultat est présenté sous forme d'électrophorégramme, avec la fluorescence des pics et interprétée en terme de nucléotides (Figure 33).



**Figure 33.** Exemple du résultat de la séquence obtenue par le séquenceur 3730 ABI Prism (Applied Biosystem). Chaque pic correspond à une espèce moléculaire différant de la précédente par un nucléotide. Chaque nucléotide est identifié par une couleur par base.



## II. Dépistage et Recherche d'anticorps anti-HLA

### Choix des échantillons de sérum

Deux type de sérums ont été préparés : un pool de sérums ne présentant aucun anticorps anti-HLA et des sérums contenant exclusivement des anticorps anti-HLA-A2. L'inclusion des sérums dans un groupe ou dans un autre fait suite à un double dosage :

- Le dépistage d'anticorps anti-HLA par technique Luminex™
- La recherche et l'identification des anticorps anti-HLA par technique de lymphocytotoxicité-complément dépendante

### II.1 Dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™

#### II.1.1 Principe de la technique Luminex™

Le dépistage ou l'identification des anticorps anti-HLA au Luminex™ est la technique la plus sensible (Raess et al, 2013). Elle est fondée sur le principe de la cytométrie de flux permettant une analyse multiparamétrique dans un seul micro-puits grâce à l'utilisation de microsphères fluorescentes et une double lecture après excitation par deux lasers. Ces microsphères ou « billes » sont recouvertes par des antigènes HLA. Les deux lasers du cytomètre permettent d'identifier spécifiquement chaque bille en suspension pour l'un et de détecter l'anticorps secondaire fixé sur les billes pour l'autre après incubation avec le sérum (Figure 34). Ce système est également constitué d'un lecteur de plaque 96 puits piloté par un ordinateur permettant l'acquisition des données et leur analyse. Pour le dépistage ou l'identification des anticorps anti-HLA, le protocole ne diffère que par le kit de billes commercialisées (Lifecodes part of Immucor) : pour le dépistage, chaque type de microsphères est recouvert d'antigènes HLA différents. Pour l'identification, chaque type de microsphère est recouvert que par un seul antigène HLA.

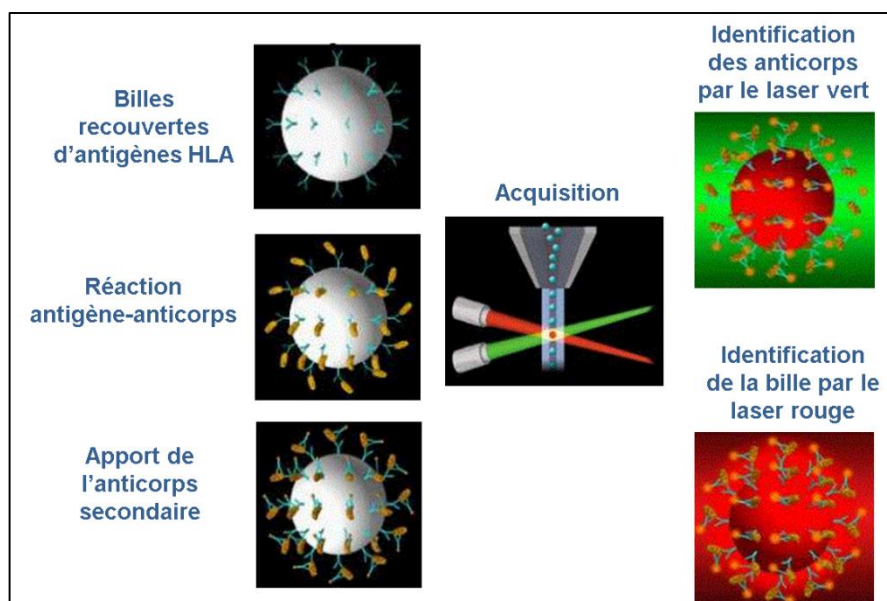


Figure 34. Le dépistage ou la recherche d'anticorps anti-HLA par la technologie Luminex™.

### II.1.2 Protocole de la technique Luminex™

Le dépistage est réalisé sur une plaque de 96 puits où chaque puits correspond à un sérum à tester. Un volume de 12,5 µL du sérum à tester est incubé avec 5µL d'un mélange des billes recouvertes d'antigènes HLA et 40 µL d'un tampon de lavage pendant 30 minutes sous agitation à température ambiante (à l'abri de la lumière). Les billes sont lavées avec du tampon de lavage et un anticorps secondaire dirigé contre les IgG humaines et conjugué à la phycoérythrine est ajouté. Après 30 minutes d'incubation et plusieurs lavages, la plaque est analysée par le cytomètre en flux à deux lasers : le laser rouge (633 nm) excite les fluorochromes incorporés dans les billes induisant l'émission de fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (712 nm) pour identifier la bille. Le laser vert excite la phycoérythrine (532 nm) pour la détection d'anticorps anti-HLA fixés sur la bille spécifique. Les valeurs mesurées sont rapportées en intensité moyenne de fluorescence (MFI). Les résultats sont interprétés avec le logiciel « Match-it » (Lifecodes part of Immucor).

La Figure 35 illustre les résultats d'un dépistage négatif (Figure 35.A) et d'un dépistage positif (Figure 35.B). L'interprétation de ces résultats nécessite d'analyser plusieurs facteurs : d'une part, 7 et 5 types de billes différentes recouvertes respectivement d'antigènes HLA de classe I et de classe II sont utilisées. Il y a présence d'anticorps si les valeurs de fluorescence (Raw) sur la figure sont supérieures à 500. Pour chaque bille donnée, 3 valeurs (Adj val1, Adj val2, Adj val3) sont calculées par le logiciel Match-It avec des résultats chiffrés. Le nombre de valeurs supérieures à 0 pour chaque bille est ensuite compté en score (exemple : 0 si les valeurs Adj Val sont négatives ou 3 si les 3 valeurs Adj Val sont positives). Pour qu'un

échantillon soit positif, il faut au minimum que l'une des trois Adj Val 1,2 ou 3 soit supérieure à 0.

**A**

Dépistage Classe I: **Negatif**                      Dépistage Classe I: **Negatif**

	CI-01	CI-02	CI-03	CI-04	CI-05	CI-06	CI-07	CII-01	CII-02	CII-03	CII-04	CII-05	Pos Ctrl / CONs
Raw	135	99	95	72	96	91	106	133	198	95	111	85	21913
Adj Val1	-3.53	-3.4	-2.99	-3.2	-3.18	-3.27	-3.02	-3.76	-4.6	-3.71	-3.45	-3.46	137
Adj Val2	-2.24	-2.37	-2.29	-2.31	-2.19	-2.57	-2.25	-2.84	-3.13	-2.69	-2.53	-2.64	117
Adj Val3	-3.18	-2.88	-2.69	-2.65	-2.61	-2.99	-2.65	-3.25	-4.17	-3.17	-3.06	-3.06	241
Score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

**B**

Dépistage Classe II: **Positif (++)**                      Dépistage Classe II: **Positif (++)**

	CI-01	CI-02	CI-03	CI-04	CI-05	CI-06	CI-07	CII-01	CII-02	CII-03	CII-04	CII-05	Pos Ctrl / CONs
Raw	8327	15285	9206	12357	13436	11377	11814	13022	19901	5613	14191	4946	19748
Adj Val1	52.99	101.4	59.25	80.95	88.58	73.84	77.83	85.23	130.2	33.57	93.74	28.53	145
Adj Val2	39.11	74.89	43.68	59.57	65.32	53.93	57.38	62.48	95.64	24.33	68.75	20.4	196
Adj Val3	25.8	50.74	29.28	40.3	44.16	36.19	38.59	42.31	64.77	15.82	46.87	13.11	283
Score	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

**Figure 35. Exemple d'un résultat de dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™.** Le sérum est incubé avec des billes recouvertes par des cellules de spécificité HLA connue. Après ajout d'un anticorps anti-IgG marqué, le cytomètre en flux assure la lecture de 2 fluorescences: l'une détecte spécifiquement la bille et l'autre l'anticorps secondaire lié à l'anticorps anti-HLA à examiner. Un signal au-dessus du seuil de détection (Intensité de fluorescence ou Raw > 500, score > 1) indique la présence des anticorps anti-HLA spécifiques de la bille. La Figure 35 reflète le résultat d'un dépistage négatif (A) et d'un dépistage positif (B) en classe I et II.

## II.2 Recherche d'anticorps anti-HLA par la Lymphocytotoxicité-complément dépendante : technique de référence

A l'inverse du typage HLA en LCT, la recherche d'anticorps anti-HLA consiste à mettre en contact des cellules mononucléées de typage HLA connu avec des anticorps anti-HLA de spécificité inconnue que l'on souhaite identifier (Hopkins 2001). Au préalable, des lymphocytes T phénotypés HLA sont isolés à partir de sang périphérique et congelés en azote liquide. Un panel regroupant différents lymphocytes T de typage HLA connu est ensuite constitué. Ce panel doit permettre de cibler tous les phénotypes HLA de la population.

Pour chaque sérum à tester, un mélange de sérum et de bleu Evans dilué au 1/50 est préparé puis 1µL de cette préparation est distribuée sur une plaque de Terasaki. 1 µL des lymphocytes T du panel à une concentration de  $3 \times 10^6$  cellules/ml y est ensuite déposé : chaque puits de la plaque correspond à l'incubation du sérum avec un type du lymphocyte T du panel. Le dépôt sur microplaque des sérums à tester et de chaque lymphocyte T du panel est distribué automatiquement à l'aide du distributeur « Lambda dot » pour le sérum et

« Lambda jet » pour les cellules (*One Lambda*). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 5 µL de complément « Pel Freez » est ajouté dans chaque puits. La réaction s'arrête au bout d'une heure avec l'ajout de 2µL de Fluoroquenck. Si le sérum à tester possède un anticorps spécifique de la cellule, le complément se fixe à la fraction Fc de l'anticorps et par la réaction antigène-anticorps, la cellule est lysée. Le nombre de cellules lysées (rouges) et vivantes (vertes) est évalué au microscope inversé à fluorescence (Zeiss, Lambda Scan™).

Cette technique, peu sensible, met en évidence des immunoglobulines avec un fort pouvoir de cytotoxicité et fixant le complément des isotypes : IgG1, IgG3, et IgM. Progressivement, il est devenu nécessaire de sensibiliser la technique face à son incapacité à détecter tous les anticorps cliniquement importants. Les techniques dites sensibles sont apparues dès le début des années 1990, notamment par une technique de cytométrie en flux Luminex™ détaillée plus haut.

## **II.3 Sélection des sérums dans l'étude**

### **II.3.1 Sélection des sérums ne présentant pas d'anticorps anti-HLA**

Les donneurs sélectionnés sont des hommes de groupe sanguin AB, pour s'assurer de l'absence d'anticorps circulants, sans antécédent transfusionnel. Le prélèvement effectué pour chacun d'entre eux constitue un volume de 80 ml en absence d'anticoagulant, ainsi que deux tubes qui suivent le cursus classique du don de sang (vérification du groupe sanguin, bilan sérologique etc.). Pour chaque don, un test de dépistage d'anticorps anti-HLA est réalisé par la technique Luminex™ et la technique de LCT. Les sérums ne sont intégrés dans le pool que si le dépistage est négatif dans les deux techniques (Figure 36).

### **II.3.2 Sélection des sérums présentant des anticorps anti-HLA-A2**

L'anticorps anti-HLA-A2 dans le sérum a été choisi pour l'investigation du fait de la fréquence d'expression de l'haplotype HLA-A2 dans la population caucasienne ([www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net)) (> 50 %). De ce fait, l'immunisation vis-à-vis des antigènes HLA-A2 est la plus probable. Les sérums proviennent de patients du service de néphrologie du CHU de Grenoble ayant subi une ou plusieurs greffes rénales ou de donneuses, volontaires sains ayant eu plusieurs grossesses. Les sérums sont sélectionnés après dépistage positif d'anticorps anti-HLA de classe I (et négatif en classe II), puis après identification des anticorps anti-HLA-A2 en LCT : seuls ceux présentant exclusivement des anticorps anti-HLA-A2 sont retenus.

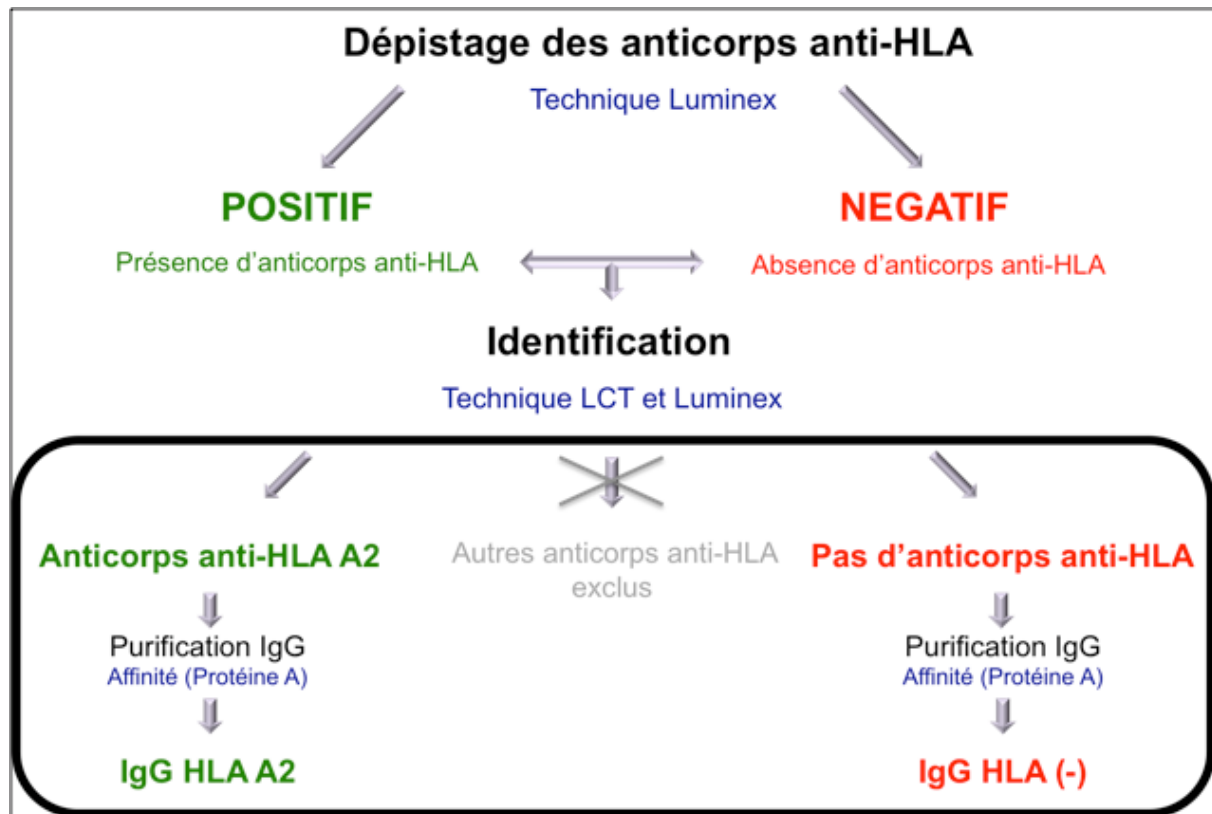


Figure 36. Logigramme de sélection des sérums de l'étude

### III. Traitement préalable des PMN

Dans certaines conditions, les PMN fraîchement isolés par gradient de Ficoll (cf Article) peuvent être « primés » par le fMLP ou le LPS, stimulés par l'IFN $\gamma$  ou bien subir une déplétion du cholestérol membranaire par le méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

#### « Priming » des neutrophiles

$4 \times 10^6$  neutrophiles fraîchement isolés resolubilisés dans 1 mL de PBS sont soumis à l'incubation pendant 15 minutes à 37°C avec 50 nM de fMLP ou bien pendant 60 minutes à 37°C avec 100 ng/ml de LPS. La réaction est stoppée après lavage des neutrophiles par centrifugation rapide au PBS.

#### Stimulation des neutrophiles

$4 \times 10^6$  neutrophiles fraîchement isolés dans 1 mL de PBS sont stimulés par 500 U/mL d'IFN $\gamma$  pendant 18 h à 37°C (étuve). La réaction est stoppée après lavage des neutrophiles par centrifugation rapide au PBS.

#### Déplétion du cholestérol membranaire des neutrophiles

Les radeaux lipidiques communément appelés « *Lipid raft* » en anglais forment des microdomaines localisés au niveau de la membrane plasmique, riches en cholestérol et en sphingolipides. Ce sont des zones privilégiées pour l'activité de certaines protéines qui y sont intégrées et notamment pour l'activité NADPH oxydase des PMN (Shao et al. 2003).

Les radeaux lipidiques sont détruits grâce à la déplétion du cholestérol membranaire par le méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (m $\beta$ CD) (Sigma). Les neutrophiles fraîchement isolés puis primés par le fMLP (comme décrit dans le matériel et la méthode de l'article).

$4 \times 10^6$  cellules/mL de PMN sont incubés 15 min à 37°C avec des solutions de m $\beta$ CD à 5 mM, 10 mM ou 20 mM puis la réaction est stoppée après lavage des neutrophiles pas centrifugation rapide.

## IV. Analyse protéique

### IV.1 Western-Blot

#### IV.1.1 Préparation des fractions membranaires

La lignée endothéliale EA.hy926 est mise en culture selon le protocole rédigé dans l'article. Les cellules endothéliales remises en suspension, après le traitement par la trypsine et lavages au PBS, sont ajustées à une concentration de  $5 \times 10^7$  cellules/mL dans une solution de PBS contenant des inhibiteurs de protéases (TLCK 10 $\mu$ M, leupeptine 1,8 $\mu$ M, pepstatine 1,5 $\mu$ M). Les cellules sont cassées par un traitement aux ultrasons avec 3 cycles de 10s à 40W et 1min d'intervalle dans la glace entre chaque cycle. Une centrifugation à basse vitesse à 3000g pendant 15min à 4°C permet d'éliminer les cellules non lysées.

Le surnageant basse vitesse obtenu après sonication est soumis à une ultracentrifugation à 150 000g pendant 1h à 4°C. Le culot membranaire est lavé et solubilisé dans 250  $\mu$ l de tampon de dépôt 2X dénaturant (SDS 4% (p/v), Tris-HCl 126mM, bleu de bromophénol 0,008 (p/v), saccharose 2% (p/v), EDTA 0,2mM) en vortexant très fortement. 2,5% de  $\beta$ -mercaptoethanol est ajouté pour permettre la réduction des ponts disulfures des protéines.

#### IV.1.2 Transfert des protéines

Les échantillons sont dénaturés à 4°C toute une nuit. Un volume de 10, 20 et 50  $\mu$ l de la suspension cellulaire précédente (soit un équivalent cellules de  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  et  $5 \times 10^6$  respectivement) est déposé sur un gel de polyacrylamide 11% (SDS-PAGE). A la fin de la migration, le dispositif de transfert est préparé de la manière suivante : on découpe 6 feuilles de papiers Whatman (n°3) et une feuille de membrane de nitrocellulose aux mêmes

dimensions que le gel. Ces feuilles sont trempées dans le tampon de transfert (Tris 25mM pH 8,3, glycine 129mM, SDS 0,01% (p/v), méthanol 20% (v/v)). Le transfert s'effectue dans une cuve constituée de deux électrodes de graphite (une cathode et une anode) reliées au générateur. Le « sandwich » permettant le transfert des protéines est constitué de la façon suivante : l'anode, 3 feuilles de papier Whatman, la feuille de nitrocellulose, 3 feuilles de papier Whatman, et enfin la cathode. Les protéines chargées négativement en présence de SDS migrent vers l'anode sous un champ électrique (Towbin et al, 1992).

#### **IV.1.3 Immunodétection des protéines par des anticorps**

A la fin du transfert, les sites libres de la membrane de nitrocellulose sont saturés pendant une heure à température ambiante dans une solution de blocage PBS-Tween 0,05%-lait 2% (PBS 1X, Tween 20 0,05% (p/v), lait déshydraté « Régilait » 2% (p/v)). La membrane est ensuite incubée pendant 1h avec une solution PBS-Tween 0,05% contenant l'anticorps primaire monoclonal anti-Nox2 (clone 7A2) à la dilution de 1/2000 ou anti-Nox4 (clone 8E9) (Zhang et al. 2011) à la dilution de 1/500 et l'anticorps monoclonal anti-p22 (clone 16G7) (Campion et al. 2009) à la dilution de 1/10000. La membrane est ensuite lavée 3 fois dans un tampon PBS-Tween 0,05% (p/v) puis incubée pendant 1h avec une solution PBS-Tween 0,05% contenant l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Finalement, la membrane est lavée 3 fois pendant 1h avec une solution PBS-Tween 0,05% (p/v) avant d'être révélée par chimioluminescence en utilisant le réactif ECL (Amersham).

Les expériences supplémentaires de Western-Blot réalisées sont rédigées dans l'article.

### **IV.2 Cytométrie en flux (FACS)**

#### **IV.2.1 La cytométrie en flux : principe**

La cytométrie en flux ou FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) permet le dénombrement d'événements et l'analyse multiparamétrique de déterminants d'une suspension de particules (cellules, bactérie, parasites, billes...) (Ronot et al. 2010). L'analyse des cellules fournit des résultats sur la distribution d'une population cellulaire sur des paramètres étudiés tels que la taille, la granularité, la fluorescence produite par des anticorps conjugués à un fluorochrome ou celle directement produite par des composés fluorescents.



## IV.2.2 Marquage des neutrophiles et de la lignée endothéliale EA.hy926

### IV.2.2.1 Expression de Nox2, de l'antigène HLA-A2 et des récepteurs Fc $\gamma$ des neutrophiles

Les neutrophiles fraîchement isolés par gradient de ficoll sont ajustés à  $5 \times 10^6$  cellules/ml dans du tampon PBS supplémenté avec 0,2 % (p/v) de BSA (PBS/BSA 0,2 %) pour effectuer le marquage.

Pour le marquage des PMN, différents anticorps primaires ont été utilisés :

- L'anticorps monoclonal de souris anti-Nox2 (clone 7B12) qui reconnaît spécifiquement un épitope externe de Nox2 (Campion et al. 2007)
- L'anticorps monoclonal de souris anti-HLA-A2 (clone BB7.2, sous-classe IgG2b, Santa Cruz) spécifique d'un épitope du domaine  $\alpha 2$  de la molécule HLA classe I
- L'anticorps monoclonal anti-HLA de classe I (clone W6/32, sous-classe IgG2a, Santa Cruz) qui reconnaît spécifiquement un épitope commun de toutes les molécules HLA de classe I (locus A, B et C)
- L'anticorps monoclonal de souris anti-Fc $\gamma$ RIII (anti-CD16, clone 3G8, sous-classe IgG1, Santa Cruz),
- L'anticorps monoclonal de souris anti-Fc $\gamma$ RII (anti-CD32, clone AT10, sous-classe IgG1, Santa Cruz)
- L'anticorps monoclonal de souris anti-Fc $\gamma$ RI (anti-CD64, clone 10.1, sous-classe IgG1, Santa Cruz)

$5 \times 10^5$  PMN mis en suspension dans dans 100 $\mu$ l de tampon PBS/BSA 0,2%, à l'état de repos, primés ou stimulés sont incubés pendant 30 min dans la glace avec 0,5  $\mu$ g d'anticorps primaire. Les cellules sont lavées deux fois avec le tampon PBS/BSA 0,2% par rapide centrifugation puis le culot de cellules est remis en suspension dans 150 $\mu$ l de la solution d'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa fluor 488 (Alexa Fluor® 488, Invitrogen) diluée au 1/1000<sup>ème</sup> dans le tampon PBS/BSA 0,2 % et incubé 30 min dans la glace à l'obscurité. Les cellules sont lavées deux fois avec le tampon PBS/BSA 0,2 % et remises en suspension dans 500  $\mu$ l de tampon PBS/BSA 0,2 %.

### IV.2.2.2 Marquage des cellules endothéliales EA.Hy926

#### IV.2.2.2.1 Perméabilisation des cellules

Les cellules de la lignée EA.Hy926 ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubées 10 min dans la glace avec le tampon PBS/BSA 0,2% supplémenté avec 0,01% (p/v) de saponine. La perméabilisation avec la saponine étant un processus réversible, toutes les étapes de



marquage des cellules perméabilisées sont réalisées dans le tampon PBS/BSA 0,2% supplémenté avec 0,01% de saponine.

#### *IV.2.2.2 Immunomarquage de Nox2 et Nox4*

Les cellules sont perméabilisées ou non en suivant le protocole ci-dessus.

Les cellules EA.Hy926 sont ajustées à  $5 \times 10^6$  cellules/ml dans le tampon PBS/BSA 0,2 % contenant (cellules perméabilisées) ou pas (cellules intactes) 0,01 % (p/v) de saponine (PBS/BSA 0,2 %  $\pm$  0,01 % saponine) pour effectuer le marquage. Les cellules EA.Hy926 ( $5 \times 10^5$  cellules dans 100  $\mu$ L) sont incubées 30 min dans la glace avec 5  $\mu$ g d'anticorps monoclonal de souris anti-Nox2 (clone 7B12) (Campion et al. 2007) ou anti-Nox4 (clone 5F9) (Zhang et al. 2010). Le culot de cellules est remis en suspension dans 150  $\mu$ l de la solution d'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa fluor 488 (Alexa Fluor® 488, Invitrogen) diluée au 1/1000<sup>ème</sup> dans le tampon PBS/BSA 0,2 %  $\pm$  0,01 % saponine et incubé 30 min dans la glace à l'obscurité. Les cellules sont lavées deux fois avec le tampon PBS/BSA 0,2 %  $\pm$  0,01 % saponine et remises en suspension dans 500  $\mu$ l de tampon PBS/BSA 0,2 %.

#### **IV.2.3 Analyse du marquage par cytométrie en flux**

Après marquage, les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes dédiés au cytomètre (FACSCanto II, BD Sciences). L'analyse est réalisée avec une acquisition de 10000 évènements pour chaque marquage. Les données sont traitées et analysées avec les logiciels Diva® et FlowJo®.

## **V. Analyse de l'ARNm des NADPH oxydases par RT-PCR**

La RT-PCR (Transcription Inverse suivi d'une réaction de polymérisation en chaîne) permet de mettre en évidence un ARNm spécifique. L'ARNm est tout d'abord retranscrit en ADNc (ADN complémentaire) par la réaction de RT par une transcriptase reverse, puis l'ADNc est amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène d'intérêt.

### **V.1 Extraction des ARN totaux des cellules endothéliales**

L'extraction doit se faire de manière à éviter toute contamination qui dégraderaient l'ARN : manipulation sous hotte chimique, ports de gant, matériel stérile « RNase free ». Le culot cellulaire est resuspendu après lavage par du PBS dans 1mL de Trizol® (pour  $1 \times 10^8$  à  $2 \times 10^8$  cellules), solution contenant un agent de dissociation, le thiocyanate de guanidium, nécessaire pour la destruction des différents composants cellulaires et pour l'inactivation des RNAses. Après une agitation vigoureuse pour entraîner une lyse homogène, 0,2 ml de

chloroforme est ajouté afin de dégrader les lipides et augmenter la pureté des ARN. La préparation est ensuite agitée au vortex puis centrifugée à 10 000 g pendant 15 min à 4°C. Les ARN totaux sont isolés dans la phase aqueuse supérieure (alors que l'ADN et les protéines sont récupérés au niveau de l'anneau intermédiaire séparant la phase aqueuse de celle du phénol). Après récupération des ARN totaux, ils sont précipités avec 0,5 ml d'isopropanol pendant 10 min à température ambiante. Le culot est récupéré après centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Il est ensuite lavé par 1ml d'éthanol à 70% (v/v) sous forte agitation, puis centrifugé à nouveau pendant 10 min à 4°C. Il est alors séché à l'air libre puis remis en suspension dans environ 30 µl d'eau distillée. Les ARN totaux sont enfin dosés par spectrométrie. La concentration en ARN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible, le Nanodrop 2000™ (ThermoScientific) par mesure de l'absorbance (A) à 260 nm, le résultat est rendu en ng/µL. Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  permet d'évaluer la contamination de l'ADN par des protéines absorbant à 280 nm, et doit être compris entre 1,8 et 2.

## V.2 Transcription inverse (RT) : production d'ADNc

Les ARN sont transcrits en ADN complémentaires grâce à la transcriptase inverse extraite du rétrovirus de la myéloblastose aviaire (AMV-RT) (Roche). Le milieu réactionnel est préparé de la manière suivante, dans un volume final de 20 µL :

- Tampon de réaction 10 X (Tris-HCL 50mM pH8,3, MgCl <sub>2</sub> 6mM, KCl 40mM)	2 µL
- MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2 µL
- Mix dNTP	2 µL
- Inhibiteur des RNases	1 µL
- AMV-RT	0,8 µL
- ARN	2µg
- H <sub>2</sub> O	qsp 20 µL

Le milieu réactionnel est incubé 10 min à 25°C pour l'hybridation des dNTPs avec l'enchaînement poly A des ARNm, puis 1 h à 42°C pour la transcription des ARN en ADN complémentaire simple brin. La réaction est arrêtée en dénaturant l'enzyme (5 min à 99°C).

## V.3 Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La méthode PCR permet l'amplification en quantité importante d'ADN à partir d'une séquence nucléotidique donnée à partir d'une très faible quantité d'ADN. Elle est détaillée dans la partie du typage HLA par SBT, plus haut. Le mélange réactionnel contient : 4 µL de désoxynucléosides triphosphates (mélange de dATP, dTTP, dCTP, dGTP à 10 mM), soit 0,8 mM, en présence des amorces spécifiques de la séquence d'ADNc à amplifier (Tableau 19), de l'ADN polymérase thermorésistante (0,5 µL de Taq) et de 1 µL d'ADNc complété à un



et sont déposés ainsi qu'un marqueur de taille dans les puits du gel d'agarose préalablement mis dans l'appareil d'électrophorèse. La migration s'effectue dans le tampon TAE 0,5X sous un courant de 100V. La révélation est faite sous lumière U.V et une image est enregistrée.

## VI. Mesure des activités NADPH oxydase

### VI.1 Mesure de l'activité NADPH oxydase par fluorimétrie (Amplex® Red)

#### VI.1.1 Principe de l'Amplex® Red

La technique par Amplex® Red (10-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine) permet la mesure du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) grâce à la production d'un composé fluorescent par une réaction d'oxydation (Figure 37) (Zhou et al. 1997). La technique par Amplex® Red ne mesure que le peroxyde d'hydrogène libéré à l'extérieur des cellules. En présence de peroxydase, le réactif Amplex® Red réagit avec le peroxyde d'hydrogène en formant un composé rouge hautement fluorescent, la résorufine, proportionnellement à la quantité d' $H_2O_2$  libéré dans le milieu (rapport stœchiométrique 1:1). La résorufine présente une excitation et une émission maximales d'environ 571 nm et 585 nm respectivement.

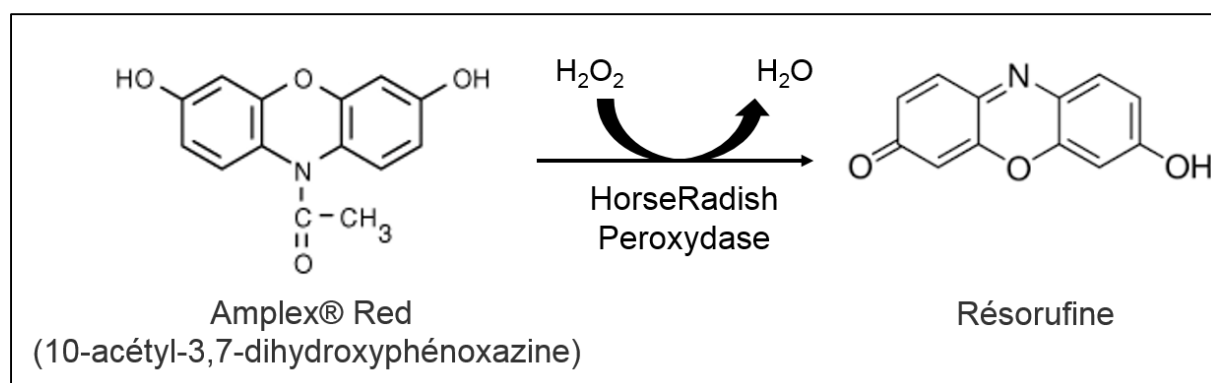


Figure 37. Mesure de l' $H_2O_2$  extracellulaire par Amplex® Red.

#### VI.1.2 Mesure de l'activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale

##### EA.hy926

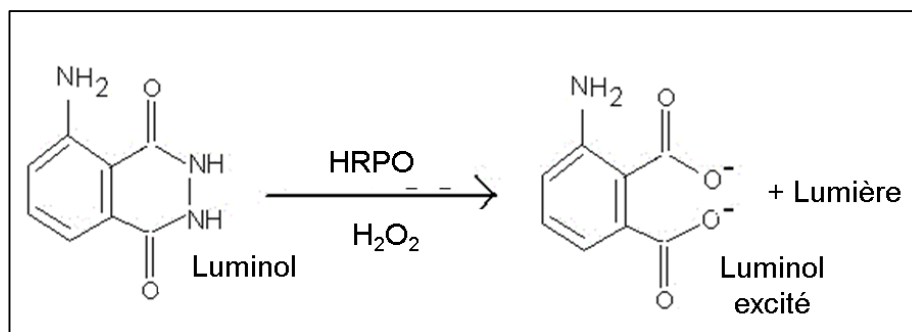
Les cellules endothéliales EA.hy926 sont placées dans une plaque 96 puits, compatible pour la mesure par fluorimétrie, à raison de  $5 \times 10^5$  cellules par puits dans un incubateur à  $37^\circ C$  sous une atmosphère contenant 5%  $CO_2$ . Après 2h d'incubation permettant l'adhésion de la totalité des cellules à la plaque, les cellules sont stimulées pendant 2 heures en présence de 10 ou 20 ng /mL de  $TNF\alpha$ , ou 130nM de PMA. Dans certaines conditions, la spécificité de la

production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par la NADPH oxydase est vérifiée en ajoutant  $10 \mu\text{M}$  de diphénylèneiodonium (DPI) lors cette incubation. La production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est mesurée en suivant les instructions du fabricant. La réaction commence en rajoutant  $100 \mu\text{L}$  de milieu réactionnel composé de  $50 \mu\text{M}$  de réactif Amplex® Red et de  $0,1 \text{ U/mL}$  HRP. Les résultats sont exprimés par la somme des unités de fluorescence relatives (RFU) enregistrés toutes les 30 secondes pendant 2h à l'aide d'un fluorimètre (Twinkle LB 970 microplate, Berthold). Les résultats sont ensuite quantifiés par comparaison avec les valeurs de fluorescence obtenues pour une gamme de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de concentrations connues ( $0$  à  $5 \mu\text{M}$ ).

## VI.2 Mesure de l'activité NADPH oxydase par chimioluminescence

### VI.2.1 Principe de la chimioluminescence

La technique de chimioluminescence permet la mesure de la production d'ions superoxyde grâce à la lumière émise par une réaction de chimioluminescence. Elle est particulièrement sensible et permet de mesurer l'activité NADPH oxydase des cellules entières (Campion et al. 2007). Cette technique repose sur le principe de dissipation de l'énergie par émission de lumière par un composé allant d'un état excité vers son état initial. La réaction de chimioluminescence repose sur une réaction d'oxydation du luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) dépendante de la peroxydase HRPO (horseradish peroxidase) et du peroxyde d'hydrogène (Figure 38).



**Figure 38. Principe de la réaction par chimioluminescence.**

*Cette technique repose sur le principe de dissipation de l'énergie par émission de lumière par un composé allant d'un état excité vers son état initial. La réaction de chimioluminescence repose sur une réaction d'oxydation du luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) dépendante de la peroxydase HRPO (horseradish peroxidase) et du peroxyde d'hydrogène.*

### VI.2.2 Mesure de l'activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale

#### EA.hy926

Les cellules endothéliales EA.hy926 sont placées dans une plaque 96 puits, compatible pour la mesure par chimioluminescence, à raison de  $5 \times 10^5$  cellules par puits dans  $200 \mu\text{l}$  de milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, avec du supplémenté avec  $2 \text{ mM}$  de L-

Glutamine, 100U/mL de pénicilline G et 100µg/mL de streptomycine, 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (30 min à 60°C) dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère contenant 5% CO<sub>2</sub>. Après 2h d'incubation permettant l'adhésion de la totalité des cellules à la plaque, les cellules sont stimulées pendant 2 heures en présence de 10 ou 20 ng /mL de TNFα, ou 130nM de PMA. Dans certaines conditions, la spécificité de la production de dérivés oxygénés par la NADPH oxydase est vérifiée en ajoutant 10 µM de diphénylèneiodonium (DPI) lors cette incubation. A la fin de l'incubation, le milieu de culture est enlevé et le milieu réactionnel est ajouté (200 µl/puits). Le milieu réactionnel est composé de PBS contenant 0,9 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de glucose, 20 µM de luminol et 10 U/ml de HRPO. La plaque est ensuite placée dans le luminomètre à 37°C. Après 1min, l'émission de lumière est enregistrée à 37°C pendant 3 heures avec une mesure toutes les 30 secondes. Les mesures sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU= Relative Luminescence Unit).

### VI.2.3 Mesure de l'activité NADPH oxydase des neutrophiles

5 × 10<sup>5</sup> PMN mis en suspension dans 50µl de PBS sont incubés dans 200µL de PBS contenant 20µM de luminol, 10U/mL de Horseradish peroxydase (HRP), 20mM de glucose, 0,5mM de MgCl<sub>2</sub> et 0,9mM de CaCl<sub>2</sub>. La stimulation ou l'inhibition de l'activité oxydase est obtenue avec l'addition de composés au début de l'enregistrement de :

- 130nM de PMA
- 50 ou 200µg/ml d'IgG HLA-A2
- 50 ou 200µg/ml d'IgG HLA (-)
- 5, 10, 50, 100 ou 200µg/ml d'anticorps monoclonaux HLA-A2 (clone BB7.2 , Santa Cruz, sous-classe IgG2b) qui reconnaît spécifiquement un épitope du domaine α2 de la chaîne lourde α de la molécule HLA-A2
- 5 ou 10µg/ml anticorps monoclonal anti-HLA de classe I (clone W6/32, sous-classe IgG2a, Santa Cruz) qui reconnaît spécifiquement un épitope commun de toutes les molécules HLA de classe I (locus A, B et C)

Les mesures sont réalisées en plaque 96 puits pendant 90min avec une mesure toutes les 30 secondes.

## VII. Couplage covalent des récepteurs Fcγ des PMN aux immunoglobulines G

Nous ne présentons pas ici le travail d'optimisation effectué et montrons directement les protocoles définitifs.

## VII.1 Couplage des IgG avec la Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC)

Les IgG HLA (-) purifiées (3mg/ml) remises en suspension dans du PBS sont incubées en présence de FITC (3mg/ml) (Sigma) pendant 2 h à température ambiante sur une roue. Les échantillons sont ensuite déposés sur une colonne de dessalage qui permet d'éliminer le FITC libre. L'éluion des IgG couplées au FITC (IgG-FITC) est suivie par la mesure de l'absorbance des protéines à 280 nm et l'éluion du FITC (libre et couplé aux IgG) à 495nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DU® 640). La concentration protéique des IgG-FITC est déterminée par un dosage par la méthode de Bradford (la méthodologie est rédigée dans l'article). La concentration en FITC des fractions d'IgG-FITC est déterminée par la loi de Beer Lambert :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times \ell \times C$$

A = Absorbance du produit P à une longueur d'onde  $\lambda$ .

$\varepsilon$  = Coefficient d'extinction molaire du produit P à la longueur d'onde  $\lambda$  (en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ).

$\ell$  = Longueur du trajet optique (largeur de la cuvette utilisée, en cm).

C = concentration molaire du produit P (en  $mol \cdot L^{-1}$ )

Le taux de couplage est calculé : [FITC] / [protéine]

Les échantillons pour lesquels le taux de couplage est compris entre 2 et 4 sont conservés.

## VII.2 Evaluation de la concentration d'IgG saturant tous les récepteurs $Fc\gamma$ des PMN.

Pour déterminer la concentration d'IgG nécessaire pour saturer tous les récepteurs  $Fc\gamma$ , les expériences ont été réalisées en optimisant le nombre de neutrophiles, la concentration d'IgG-FITC, le temps d'incubation : les PMN ( $2 \times 10^5$  cellules/ml ou  $4 \times 10^5$  cellules/ml dans 250  $\mu$ l) sont incubés avec de concentrations croissantes (0 à 10 $\mu$ M) d'IgG-FITC pendant 1 heure. Les PMN sont ensuite lavés et placés dans des plaques noires 96 puits, compatibles pour la mesure de fluorescence. La fixation des IgG est suivie par fluorimétrie (Figure 39).



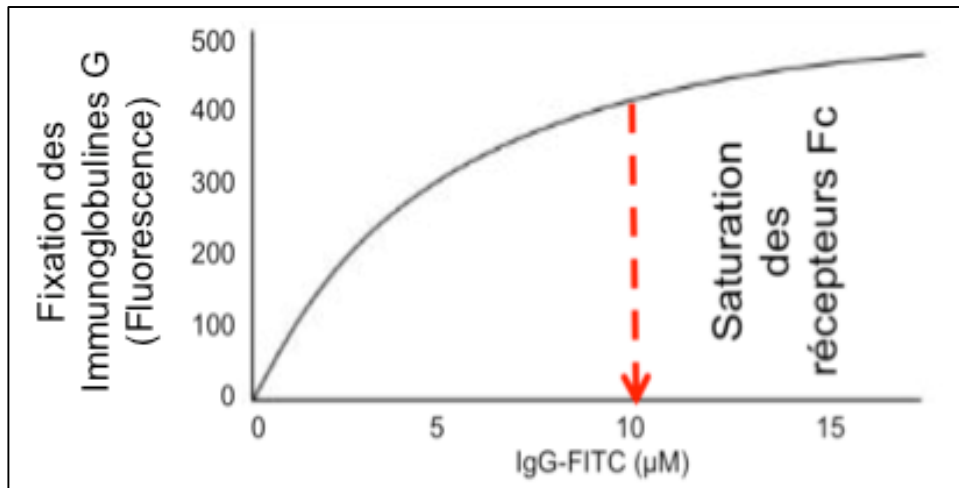


Figure 39. Expérience de fixation par fluorimétrie

### VII.3 Couplage covalent des IgG aux PMN par le Bis-sulfosuccinimidyl suberate (BS<sup>3</sup>)

#### VII.3.1 Rôle du BS<sup>3</sup>

Le BS<sup>3</sup> est un agent de couplage homo-bifonctionnelle, hydrosoluble, non clivable et imperméable aux membranes. BS<sup>3</sup> contient un ester *N*-hydroxysulfosuccinimide (NHS) réactif aux amines à chaque extrémité (Figure 40). Les esters NHS réagissent avec les amines primaires pour former des liaisons amides stables tout en libérant le groupe NHS. En règle générale, les protéines, dont les anticorps, possèdent plusieurs amines primaires dans la chaîne latérale des résidus de lysine et au niveau de leurs extrémités N-terminales, qui servent de cibles aux réactifs de réticulation de l'ester NHS.

Dans ce travail, le BS<sup>3</sup> est utilisé pour former des liaisons covalentes entre les anticorps, dirigés spécifiquement contre les récepteurs Fcγ et ainsi bloquer ces récepteurs.

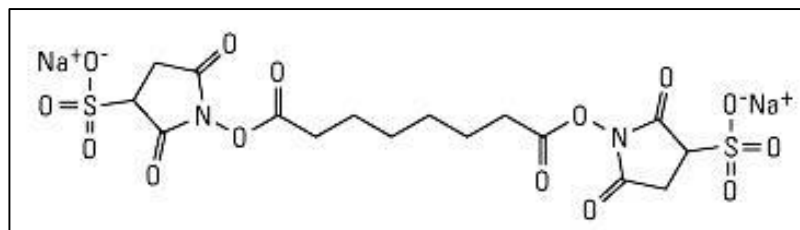


Figure 40. Structure chimique du Bis-sulfosuccinimidyl suberate (BS<sup>3</sup>) comme agent de réticulation. Le BS<sup>3</sup> contient un ester *N*-hydroxysulfosuccinimide (NHS) réactif aux amines à chaque extrémité d'un bras espaceur 8 carbones. Les esters NHS réagissent aux amines primaires à un pH de 7 à 9 pour former des liaisons amides stables tout en libérant le groupe NHS.



### VII.3.2 Analyse du blocage des récepteurs Fc $\gamma$ des PMN par cytométrie en flux

Les PMN fraîchement isolés ( $5 \times 10^6$  cellules/ml) sont initialement incubés 30 min dans la glace avec 0,5  $\mu$ g d'anticorps primaire monoclonal anti-Fc $\gamma$ RIII (anti-CD16, clone 3G8, Santa Cruz, sous-classe IgG1), anti-Fc $\gamma$ RII (anti-CD32, clone AT10, Santa Cruz, sous-classe IgG1) ou anti-Fc $\gamma$ RI (anti-CD64, clone 10.1, Santa Cruz, sous-classe IgG1). Après lavage en PBS/BSA 0,2%, les cellules sont traitées pendant 30 minutes dans la glace avec 1mM de BS<sup>3</sup>. Une fois le couplage covalent réalisé, la réaction est stoppée après lavage des neutrophiles par centrifugation rapide. Les PMN sont ensuite incubés en présence d'IgG humaine puis ce marquage est révélé grâce à un anticorps secondaire anti-IgG humain couplé à l'Alexa fluor 488 (Alexa Fluor® 488, Invitrogen). Après lavage, les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes dédiés au cytomètre (FACSCanto II, BD Sciences). L'analyse est réalisée avec une acquisition de 10000 évènements pour chaque marquage. Les données sont traitées et analysées avec les logiciels Diva® et FlowJo®.

# **RESULTATS**



# RESULTATS

Les résultats de mon travail de thèse se divisent en deux chapitres :

- **Le premier chapitre** : Activation des neutrophiles par les anticorps anti-HLA-A2 et conséquence sur l'endothélium qui comprend deux parties :

- L'article en révision « *Transfusion-related acute lung injury: critical neutrophil activation by anti-HLA-A2 antibodies for endothelial permeability* »

- Les résultats supplémentaires qui complètent les données de l'article

- **Le deuxième chapitre** : Mécanismes d'activation des neutrophiles par les anticorps anti-HLA



# RESULTAT DU PREMIER CHAPITRE

## ACTIVATION DES NEUTROPHILES PAR LES ANTICORPS ANTI- HLA-A2 ET CONSEQUENCE SUR L'ENDOTHELIUM

### Partie I :

Article en révision

*«Transfusion-related acute lung injury: critical neutrophil activation by anti-HLA-A2 antibodies for endothelial permeability»*



**Transfusion-related acute lung injury: critical neutrophil activation by anti-HLA-A2 antibodies for endothelial permeability**

Kathy Khoy<sup>1,2</sup>, Minh Vu Chuong Nguyen<sup>1</sup>, Dominique Masson<sup>3</sup>, Béatrice Bardy<sup>3</sup>, Christian Drouet<sup>1,4</sup>, and Marie-Hélène Paclet<sup>1,4\*</sup>

*From the <sup>1</sup>Université Grenoble Alpes, GREPI EA 7408 Grenoble, France*

*<sup>2</sup>Université de Caen Normandie, CHU Caen, Caen, France*

*<sup>3</sup>EFS Rhône-Alpes, site de Grenoble, Grenoble, France*

*<sup>4</sup>CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France.*

*\*To whom correspondence should be addressed: Marie-Hélène PACLET, GREPI EA 7408 Université Grenoble Alpes, EFS site Grenoble, 29 Avenue Maquis du Grésivaudan, BP35, 38701 La Tronche, France.*

The authors declare that they have no conflicts of interest relevant to the manuscript submitted to TRANSFUSION.

Short running head: Neutrophil activation by HLA-A2 antibodies

Word count: 3995



**ABSTRACT and KEYWORDS**

**BACKGROUND:** Transfusion-related acute lung injury (TRALI) is a major complication of hemotherapy that may occur following the transfusion of any blood type component. Though several reports on TRALI reactions are available in the literature, the pathological mechanism remains unclear. Several clinical reports have suggested the presence of anti-HLA antibodies in the blood product, yet without any further explanation. This study sought to examine the role of anti-HLA-A2 antibodies in polymorphonuclear neutrophil (PMN) activation, and thus in endothelial permeability.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** Neutrophil activation was assessed by both nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) activity and reactive oxygen species (ROS) production. A co-culture assay of endothelial cells and PMN was performed in order to estimate the impact of ROS on endothelial permeability.

**RESULTS:** Anti-HLA-A2 antibodies significantly increased PMN activation, with subsequent endothelial dysfunction. Phagocyte NADPH oxidase (NOX2) activity was shown to be involved in this process and ROS themselves were demonstrated, for the first time, to induce VE-cadherin cleavage and endothelial permeability.

**CONCLUSION:** Our data support the existence of a critical anti-HLA-A2 antibody threshold for PMN activation, with NOX2 activity and subsequent endothelial permeability in the two-hit model of TRALI.

Keywords: TRALI, PMN, reactive oxygen species, NADPH oxidase, VE-cadherin

## INTRODUCTION

Transfusion-related acute lung injury (TRALI) is a syndrome characterized by respiratory distress following blood transfusion (1, 2). It is one of the most significant complications of modern blood transfusion and remains the leading cause of transfusion-related mortality (3). A clinical definition of TRALI was established in 2004, based on acute respiratory distress, bilateral noncardiogenic pulmonary edema occurring within 6 hours of blood product administration, and hypoxemia (1, 4). Currently, no biological diagnostic tests are available. The pathogenesis of TRALI remains unclear, although the risk of TRALI was shown to be increased in transfusion recipients with critical disorders such as sepsis (5), and in patients undergoing cardiac surgery (6). Anti-human leukocyte antigen (HLA) or anti-human neutrophil antigen (HNA) antibodies in TRALI patients have been found in large proportions in donor blood products (7-11), which suggests that such antibodies play a significant role in TRALI. In particular, antibodies targeting HLA-A2, a common HLA antigen in Caucasians, were found in transfusion products, associated with fatal cases of TRALI (8). Despite the apparent association between anti-HLA antibodies and TRALI, several blood products containing anti-HLA antibodies do not cause TRALI reactions, thus rendering it difficult to predict the risk of TRALI solely on the presence of anti-HLA antibodies in transfusion products. Irrespective of the transfusion procedure, pulmonary polymorphonuclear neutrophil (PMN) activation is a critical component in TRALI patients, and has also been observed in animal models (12-15). A two-hit model for TRALI has been proposed (16), with the first hit corresponding to a recipient's predisposition to PMN adhesion on pulmonary endothelium, and the second hit relating to the transfusion product, with mediators provoking PMN and endothelial cell activation. However, some TRALI cases did not match with this model, especially in fairly healthy patients. A threshold model has therefore been proposed (17), in which a PMN activation threshold and

endothelium crossing may trigger TRALI. This model has not yet been supported by clear experimental evidence (18).

In order to gain a deeper insight into the TRALI pathogenesis and thereby prevent its occurrence and recurrence, we sought to characterize HLA antibody involvement in PMN activation by using HLA-A2 as an experimental model, with the aim to decipher the impact of activated PMN on endothelial permeability. Anti-HLA-A2 antibodies significantly increased PMN activation, with an associated increase in endothelial dysfunction. Phagocyte NADPH oxidase (NOX2) activity was shown to be involved in this process and reactive oxygen species (ROS) themselves were, for the first time, demonstrated to induce VE-cadherin cleavage and endothelial permeability.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

The chemical reagents used in this study were the following: N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), horseradish peroxidase, dimethylformamide (DMF), and bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate conjugate (BSA-FITC) (Sigma Aldrich, Lyon, France); ECL western blotting detection reagents (GE Healthcare, Orsay, France); protein A columns (Pierce ThermoScientific); monoclonal antibody directed against VE-cadherin (clone BV9, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); Transwell chamber insert (6.5mm diameter, 8µm pore, Corning Costar, Cambridge, MA).

### **Anti-HLA antibodies**

HLA class I-positive antisera were selected from multiparous women who provided informed consent. Detection of anti-HLA class-I and class-II antibodies in sera was performed by flow cytometry (Lifecodes Screening, Immucor, CA) using Luminex microbeads coated with HLA antigen, according to the manufacturer's instructions. Sera positive for anti-HLA class I antibodies were further characterized for HLA specificities by using both the complement-dependent lymphocytotoxicity (19) and Luminex single antigen assay (Lifecodes Single Antigen, Immucor), the latter being analyzed using computer software (Match it, Immucor). Sera displaying exclusive anti-HLA-A2 specificity (HLA-A2 serum) were used in this study. Pooled AB sera from healthy male donors with negative screening tests were employed as a negative control (HLA(-) serum).

### **Immunoglobulin G purification from serum**

Total immunoglobulins G (IgG) from pooled AB serum (HLA(-) IgG) and HLA-A2 serum (HLA-A2 IgG) were purified using protein A columns (Pierce Protein A columns,

ThermoScientific). IgG concentration was measured in purified fraction by the Bradford assay using BSA as protein standard (20).

### **Cell culture**

The human myeloid leukemia PLB-985 cell line (21), as well as wild-type (WT) and NOX2 knock-out PLB-985 (PLB-985 NOX2<sup>-/-</sup>) cells, were a generous gift from M. Dinauer (Department of Pediatrics, St. Louis, USA) (22). PLB-985 cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, and 10% (v/v) FBS. Granulocytic differentiation was achieved according to previously published methods. PLB-985 cells ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were treated with 0.5% (v/v) DMF for 6 days. The differentiation medium was changed after 3 days in culture (23).

The human vascular endothelial cell line (EA.hy926), established by the fusion of human umbilical vein endothelial cells and the human lung adenocarcinoma epithelial cell line A549, was a generous gift from Y. Renaudineau (Brest, France). EA.hy926 was grown in DMEM medium supplemented with 2mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, and 10% (v/v) FBS, as previously described (24). Using a cell line enabled us overcoming the difficulty of obtaining large numbers of non-contaminated primary cells and for circumventing the requirement of growth factors needed by primary endothelial cells.

### **Neutrophil isolation**

Neutrophil HLA allelic typing was performed on genomic DNA from volunteer platelet donors using the Luminex method with a LABType SSO kit, according to the manufacturer's instruction (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) (25). Human PMN were purified from heparinized blood of HLA-A2 donors (HLA-A2 PMN) and from those who did not express

HLA-A2 (HLA non-A2 PMN), diluted twice in phosphate buffered saline (PBS) containing 1% (w/v) tri-sodium citrate, using a 33% (v/v) Hypaque–Ficoll gradient. Following a 20-min centrifugation at 800×g and 20°C, the pellet was subjected to isotonic lysis for 5 to 15min on ice. After an 8-min centrifugation at 400×g and 4°C, the PMN pellet was collected and washed once in PBS (20). PMN were counted and then used within the next few hours. Cell viability was superior to 90%, as determined by the trypan blue exclusion method.

### **Neutrophil priming**

For priming experiments, PMN ( $4 \times 10^6$  cells/mL) were preincubated at 37°C with 50nM fMLP for 15min or 100ng/mL lipopolysaccharide (LPS) for 1h.

### **NADPH oxidase activity**

PMN or differentiated PLB-985 cells ( $2 \times 10^5$  cells in 50µl of PBS) were suspended in 200µL PBS containing 0.9mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM glucose, 20µM luminol, and 10U/mL horseradish peroxidase. NADPH oxidase activity was measured by luminol-enhanced chemiluminescence assays performed in a 96-well plate. Photon emission was recorded at 37°C for 30min with a Luminoskan device (Labsystem, Pontoise, France) (20). PMN were stimulated with increasing concentrations of HLA(-) or HLA-A2 IgG, as described in individual results, or with 130 nM PMA (final concentration). For the xanthine-xanthine oxidase assay, ROS production was measured as previously described in a medium containing luminol and horseradish peroxidase, along with 1mM xanthine and 0.05IU/L xanthine oxidase. In some experiments, 10µM DPI was added prior to luminescence measurement. Chemiluminescence was quantified as relative light units using a kinetic assay with readings every 30s, for 45 to 120 min.

## **Transendothelial permeability assay**

- **BSA-FITC fluorescence assay**

EA.Hy926 cell lines were grown until confluence on Transwell chamber inserts of 6.5mm diameter and 8µm pore (Corning Costar, Cambridge, MA). The endothelial monolayer culture in the upper compartment was exposed to PBS, resting PMNs ( $3 \times 10^6$  cells), PMA-stimulated PMNs ( $3 \times 10^6$  cells stimulated with 130nM PMA), or bradykinin (BK). BSA-FITC was simultaneously added to the upper compartment of each Transwell unit. Following various incubation times, endothelial monolayer dysfunction was measured by BSA conjugated-FITC flux across intact monolayers to the lower compartment using fluorimetry. Two separate Transwell units were used for each incubation time.

- **VE-cadherin shedding**

Confluent EA.hy926 monolayers incubated on a 24-well plate were exposed to differentiated PLB985 cells (PLB-985 NOX2<sup>-/-</sup> or PLB-985 WT) ( $1 \times 10^6$  cells) or PMN ( $1 \times 10^6$  cells) previously stimulated with 130nM PMA. A positive control was performed by incubating endothelial cells with  $10^{-6}$ M BK. In some experiments, endothelial cells were incubated with fMLP-primed PMN stimulated with a high amount of HLA(-), HLA-A2 IgG (200µg/mL), or with the ROS-generating acellular system, 1mM xanthine, and 0.05mIU xanthine oxidase (X/XO). After a 3h-incubation period, culture media were harvested and centrifuged, with the supernatant used for western blotting of VE-cadherin extracellular fragment. Split of VE-cadherin was employed as a marker of tight junction disruption.

## **Protein electrophoresis and immunoblotting**

Equal volumes of each sample were submitted to 12.5% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (26). For western blotting, proteins were electro-transferred to nitrocellulose membrane at 60mA for 2.5h. Nitrocellulose was incubated for 1h in 0.05% (w/v)

TBS-Tween solution (190mM NaCl, 25mM Tris-HCl, pH8.0) containing 2% (w/v) low-fat milk proteins, and then incubated for 2h with the anti-VE-cadherin mouse monoclonal antibody (BV9; dilution 1:200). The read-out was performed using sheep anti-mouse IgG antibody conjugated with peroxidase (dilution 1:5,000) for 1h, along with ECL reagents. Immunoblots were compared by densitometry.

### **Statistical analysis**

Data was presented as mean +/- standard deviation (SD). When representative data was obtained, the experiments were repeated at least three times yielding similar results. Results for paired data were compared using the Student's *t* test. The results that significantly differed (*P* values <0.05) from the control have been indicated.



## RESULTS

### *Anti-HLA-A2 antibodies activate NADPH oxidase in primed PMN expressing HLA-A2 antigen*

- Neutrophils and anti-HLA antibodies have been suggested to play a role in TRALI pathogenesis, yet without any clear evidence for such an implication. We consequently analyzed both the impact of anti-HLA antibodies on neutrophil stimulation and its consequence on endothelial permeability. In the first experiment set, resting PMN from donors who expressed either HLA-A2 antigen (HLA-A2 PMN) or HLA-non A2 antigen (HLA non-A2 PMN) were purified and incubated with increasing concentrations of HLA-A2 IgG or HLA(-) total IgG. PMN activation was assessed by the NADPH oxidase activity measured by chemiluminescence. Figure 1A did not show any change in PMN activity, using different test conditions. There was particularly no significant difference in HLA-A2 IgG (Fig.1A, right panel *versus* left panel). In the TRALI two-hit model, a first hit led to PMN priming. In the next experiment set, PMN were primed prior to incubation with anti-HLA-A2 IgG. Two different priming agents, fMLP and LPS, were used. Two concentrations of fMLP and LPS, described as priming concentrations, were first used in order to confirm that PMN were not activated in these conditions. NADPH oxidase was measured by chemiluminescence on PMN submitted to 10nM fMLP and 50nM fMLP or to 15ng/mL LPS and 100ng/mL LPS. In fMLP-primed PMN and LPS-primed PMN, NADPH oxidase activity did not differ from that in untreated conditions (*data not shown*). For further experiments, 50nM fMLP was used to prime PMN prior to IgG treatment. Furthermore, fMLP-primed PMN were submitted to an increasing concentration of HLA-A2 IgG or HLA(-) IgG. NADPH oxidase activity was monitored by chemiluminescence. It should be noted that a strong increase in NADPH oxidase activity was observed when HLA-A2 PMN were treated with a high concentration of HLA-A2 IgG (200µg/mL) (Fig. 1B, right panel). This increase was not observed when the same cells were incubated with either a low concentration of HLA-A2 IgG (50µg/mL), IgG without HLA-A2 specificity (Fig. 1B, left

panel), or when using non HLA-A2 PMN (Fig.1B open bars *versus* black bars). These observations support the existence of a critical anti-HLA-A2 antibody threshold for PMN activation.

*Activated PMN are involved in endothelial permeability induction* – The physiological impact of neutrophil activation on endothelial permeability was next investigated in a co-culture assay using endothelial cells and PMN. Endothelial cells were grown to 80-100% confluence on a microporous membrane in a Transwell co-culture system. The culture medium in the upper compartment was replaced by PBS buffer containing a fixed concentration of BSA-FITC, a tracer-molecule, and supplemented with either resting or PMA-stimulated PMNs, or not (negative control). A  $10^{-6}$ M BK concentration was used as positive control. The permeability was followed by the increasing concentration of the fluorescent marker in the lower compartment (Fig. 2A). Kinetics clearly showed that after a 30min-contact period of activated PMN with endothelial cells, the fluorescent marker in the lower compartment increased similarly to that observed with the positive control (Fig. 2B). Conversely, the permeability measured in the presence of resting neutrophils remained close to that observed in control conditions. After a 60min-incubation, the permeability significantly increased in the presence of PMA-activated PMN (Fig. 2B, *insert*). These results indicated that PMA-activated PMN were able to induce endothelial permeability.

*PMN activated by HLA-A2 IgG specifically induce endothelial permeability* – In order to determine whether PMN upon anti-HLA-A2 antibody activation could induce endothelial permeability, endothelial cells were then co-cultured with primed neutrophils activated by either HLA-A2 or HLA(-) IgG at a high concentration (200 $\mu$ g/mL). VE-cadherin shedding was used as a permeability marker. VE cadherin is an adhesion receptor expressed at endothelial cell-cell interactions and involved in endothelium tight junction (27). The VE-cadherin ectodomain, as well as its intracellular domain, are critical for the control of endothelial

permeability. Endothelial permeability was shown to correlate with proteolytic degradation of VE-cadherin, with an increased concentration of soluble VE-cadherin ectodomain (28). Co-culture supernatant was harvested after a 3h contact period of IgG-activated PMN with endothelial cells. Following centrifugation, the supernatant was submitted to western blotting for the released soluble VE-cadherin ectodomain (Fig.3). We observed a significant increase in the immunoreactive band, with an apparent molecular weight >70kDa in the event of endothelial cells with PMN stimulated by HLA-A2 IgG (Fig. 3), although not with HLA (-) IgG (Fig.3). The extent of permeability upon HLA-A2 IgG stimulation was in the same range of that observed with the BK positive control. These results indicate that primed PMN expressing A2 antigen and stimulated with a critical concentration of HLA-A2 IgG mediate endothelial permeability.

*The phagocyte NADPH oxidase is involved in increased endothelial permeability* – In order to evaluate the potential involvement of NADPH oxidase activity in this process, co-culture experiments were designed by substituting human PMN with PLB985 cells differentiated from DMF in neutrophil-like cells. Two types of PLB985 cells were employed: PLB985 cells expressing a functional phagocyte NADPH oxidase after differentiation (WT-PLB985 cells) and Nox2-deficient PLB985 cells (Nox2<sup>-/-</sup>-PLB985 cells). PMA, a strong activator of neutrophil NADPH oxidase, was used to stimulate PLB985 cells before co-culture with endothelial cells. A control experiment was performed with PMA-stimulated PMN. Soluble VE-cadherin ectodomain was measured by western-blotting in the culture medium after a 3h-incubation period. It was significantly increased in the medium following incubation with both PMA-stimulated PMN and PMA-stimulated WT-PLB985 cells, compared to the basal level of soluble VE-cadherin fragment in condition of endothelial cells alone (Fig.4A, WT, and PMN *versus* PBS condition). On the contrary, the soluble VE-cadherin ectodomain level did not show any significant increase in the presence of PMA-stimulated Nox2<sup>-/-</sup>-PLB985 cells (Fig.4A).

This data strongly supports the argument of phagocyte NADPH oxidase involvement in endothelial permeability induction.

*Reactive oxygen species induce endothelial permeability* – We then further characterized the metabolic pathway of the endothelial permeability process upon neutrophil activation while evaluating a possible direct role of phagocyte NADPH oxidase-derived ROS in this process. Confluent endothelial cells were treated for 3h with a superoxide anion-generating acellular system (xanthine/xanthine oxidase). A series of preliminary experiments was conducted in order to determine the xanthine/xanthine oxidase concentration required to generate ROS levels close to those provided by activated PMN. ROS production by systems containing 1mM xanthine and varying xanthine oxidase concentrations (0.02 to 0.1mU/mL) was measured by chemiluminescence. The system containing 1mM xanthine and 0.05mU/mL xanthine oxidase produced similar ROS amounts to those of activated PMN (Fig. 4B *insert*). Endothelial cells were subsequently incubated for 3h with xanthine/xanthine oxidase system, and the level of VE-cadherin shedding in the culture medium was analyzed by western blotting. Results revealed that in presence of ROS-generating acellular system, the signal of soluble VE-cadherin fragment was higher than that measured in buffer or in the presence of Nox2<sup>-/-</sup>-PLB985 cells (Fig. 4B). Moreover, endothelial cell treatment with ROS-generating acellular system was shown to develop VE-cadherin shedding in the same range than that observed with WT-PLB985 cells. These data strongly suggest a direct role of ROS in endothelial permeability induction.

## DISCUSSION

The etiology of TRALI has been extensively discussed over the last years. Several models have been proposed, and the popular “two-hit model” has been developed, with first a predisposition of the patient, and second, the transfusion delivering the trigger. Activation of patient pulmonary PMN has been shown to be a key event in TRALI. It was previously revealed that anti-leukocyte (HNA) antibodies, when binding to their antigen, were able to activate PMN and induce ROS production (29). Additionally, the involvement of donor HLA antibodies, which are present in the transfused blood product, on PMN activation, is generally accepted. The precise role of anti-HLA antibodies in the TRALI process, however, has not yet been clarified. In this paper, we have analyzed both the role of human anti-HLA-A2 antibodies, a common antigen in Caucasians, in human PMN activation, as well as the consequence on both endothelial dysfunction and vascular permeability. The data herein demonstrated for the first time that HLA-A2 IgG, above a critical threshold concentration, were able to significantly activate PMN expressing HLA-A2 antigen, resulting in a production of Nox2-derived ROS. It is essential to note that this activation was independent of complement, as it occurred in a plasma-free environment. Moreover, this activation was only observed on primed PMN, confirming that the patient’s predisposition is a critical condition of the TRALI process. Recent data by Silliman *et al.* (30) has shown that anti-HLA-A2 antibodies were able to prime PMN from HLA-A2 homozygous donors. In our experimental conditions, we did not recognize an effect of the neutrophil expression level of HLA-A2 on ROS production induced by the HLA-A2 IgG, as results with PMN from HLA-A2 homozygous or heterozygous donors were similar (data not shown). This discrepancy could be accounted for by the concentration of HLA-A2 IgG used in our experiments.

We also demonstrated that PMN activated by HLA-A2 IgG were able to induce endothelial permeability. The characterization of the metabolic pathway for inducing endothelial

permeability pointed towards the crucial role of the neutrophil NADPH oxidase (Nox2). Particularly by using Nox2<sup>-/-</sup>-PLB985 cells that differentiated in neutrophil-like cells, we have demonstrated that endothelial permeability induction was associated with the presence of a functional neutrophil NADPH oxidase. It has already been shown that ROS, when released by endothelial Nox, are involved in both endothelial cell function and dysfunction. It has particularly been demonstrated that ROS can mediate phosphorylation of VE-cadherin and catenins, with the disassembly of the VE-cadherin/catenin complex and subsequent breakdown of the endothelial junctions (31). We herein established that neutrophil Nox2-derived ROS were directly involved in VE-cadherin shedding, thus in endothelial permeability. We suggested a HLA-A2 IgG-mediated TRALI model combining both the two-hit model and threshold model (Fig.5). The “first hit” corresponds to the patient susceptibility characterized by the presence of primed PMN and their sequestration in the lung capillary. The “second hit” is attributed to HLA-A2-IgG contained in the blood products that recognize the patient’s PMN HLA. When the concentration of HLA-A2 antibodies is above a threshold, the contact between HLA-A2 IgG and plasma membrane receptors generate conditions for PMN activation. The role of Fcγ receptors in this process is currently under investigation. Activated PMN release Nox2-derived ROS. A direct consequence is the endothelial wall damage, vascular leakage, and pulmonary edema. This model can support the fact that not all patients transfused with a blood product containing HLA-A2 IgG develop a TRALI. At present, this adverse effect is underdiagnosed, since the pathological mechanism of TRALI remains largely unknown. One of the preventive measures for reducing TRALI risk is to eliminate all blood products containing HLA antibodies. This radical procedure leads to further increases in blood donation shortage. Investigating the precise threshold concentration of HLA antibodies with activation properties and the molecular pathway, especially the role of Fcγ receptors, will contribute to the development of less drastic preventive measures for reducing TRALI incidence.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This paper was supported by a program conducted within the Etablissement Français du Sang (EFS call 2011; coordinator: Christian Drouet). The authors would like to express their gratitude to Prof. P. Tiberghien and Dr. F. Cognasse for their continuous encouragement; they are appreciative to Dr. B. Favier from Grenoble for his helpful comments.

**REFERENCES**

1. Goldman M, Webert KE, Arnold DM, *et al.* Proceedings of a consensus conference: towards an understanding of TRALI. *Transfusion Med Rev* 2005; 19:2-31.
2. Marik PE, Corwin, HL. Acute lung injury following blood transfusion: expanding the definition. *Crit Care Med* 2008; 36:2080-3084.
3. Holness L, Knippen MA, Simmons L *et al.* Fatalities caused by TRALI. *Transfusion Med Rev* 2004; 18:184-188.
4. Kleinman S, Caulfield T, Chan P, *et al.* Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 2004; 4:1774-1789.
5. Gajic O, Rana R, Winters JL, *et al.* Transfusion related acute lung injury in the critically ill: prospective nested case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:886-891.
6. Vlaar AP, Hofstra JJ, Determann RM, *et al.* The incidence, risk factors, and outcome of transfusion-related acute lung injury in a cohort of cardiac surgery patients: a prospective nested case control study. *Blood* 2011; 117:4218-4225.
7. Popovsky MA, Moore SB. Diagnostic and pathogenic considerations in transfusion related acute lung injury. *Transfusion* 1985; 25:573-577.
8. Bux J, Becker F, Seeger W, *et al.* Transfusion related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br J Haematol* 1996; 93:707-713.
9. Curtis BR, McFarland JG. Mechanisms of transfusion-related acute lung injury (TRALI): anti-leukocyte antibodies. *Crit Care Med* 2006; 34:S118-23.
10. Middelburg RA, van Stein D, Briet E *et al.* The role of donor antibodies in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury: a systemic review. *Transfusion* 2008; 48:2167-2176.



11. Peters AL, van Stein D, Vlaar APJ. Antibody-mediated transfusion-related acute lung injury; from discovery to prevention. *Br J Haematol* 2015; 170:597-614.
12. Seeger W, Schneider U, Kreuzler B, *et al.* Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood* 1990; 76:1438-1444.
13. Wyman TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, *et al.* A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C1592-1603.
14. Looney MR, Su X, Van Ziffle JA, *et al.* Neutrophils and their FC receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1615-1623.
15. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, *et al.* Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood* 2006; 107:1217-1219.
16. Silliman CC. The two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Crit. Care Med.* 2006; 34: S124-131.
17. Bux J, Sachs UJ. The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol* 2007; 136:788-799.
18. Vlaar APJ, Juffermans NP. Transfusion-related acute lung injury: a clinical review. *The Lancet* 2013; 382: 984-994.
19. Terasaki PL, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204:998-1000.
20. Champion Y, Paclet MH, Jesaitis AJ, *et al.* New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. *Biochimie* 2007; 89:1145-58.

21. Tucker KA, Lilly MB, Heck LJ, *et al.* Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* 1987; 70: 372–378.
22. Yu L, Zhen L, Dinauer MC. Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome *b*<sub>558</sub>: role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91-phox and p22-phox subunits. *J Biol Chem* 1997; 272: 27288–27294.
23. Baillet A, Xu R, Grichine A, *et al.* Coupling of 6-phosphogluconate dehydrogenase with NADPH oxidase in neutrophils: Nox2 activity regulation by NADPH availability. *FASEB J* 2011; 25:2333–2343.
24. Bouïs D, Hospers GA, Meijer C, *et al.* Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 2001; 4:91-102.
25. Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA. Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum Immunol.* 1991; 30:190-201.
26. Laemmli UK, Favre MJ. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *Mol. Biol.* 1973; 80:575-599.
27. Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin, a wacky comradeship. *Cell Adhesion & Migration* 2014; 8: 158-164.
28. Vilgrain I, Sidibé A, Polena H, *et al.* Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PLoS One* 2013; 12: e80056.
29. Sachs UJH, Hattar K, Weissmann N, *et al.* Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood* 2006; 107: 1217-1219.

30. Silliman CC, Bercovitz RS, Khan SY, *et al.* Antibodies to the HLA-A2 antigen prime neutrophils and serve as the second event in an *in vitro* model of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sanguinis* 2014; 107: 76-82.
31. Zhou Y, Yan H, Jiangha Z, *et al.* Reactive oxygen species in vascular formation and development. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013: 374963

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. Effect of HLA-A2 IgG on neutrophil NADPH oxidase activity.** NADPH oxidase activity was measured in HLA non-A2 PMN (white bars) or HLA-A2 PMN (black bars) after adding increasing concentrations of HLA(-) IgG or HLA-A2 IgG by chemiluminescence. NADPH oxidase activity was measured on resting PMN stimulated with IgG (A) or on fMLP-primed PMN stimulated with IgG (B). Error bars indicate SD for duplicate in one representative experiment for at least three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , compared to PMN without IgG stimulation.

**Figure 2. Activated PMN induce endothelial permeability.** EA.hy926 cells were seeded on the microporous membrane of the upper compartment of a Transwell system to form an impermeable monolayer. Resting or PMA-stimulated PMN, PBS (negative control) or bradykinin (BK, positive control) were added in the upper compartment along with the fluorescent tracer FITC-BSA (A). The permeability status of the endothelial monolayer was evaluated by measuring the kinetic of BSA-FITC fluorescence in the lower compartment (B). *Insert*, Permeability measured after a 60min-contact period, expressed in percentage of the positive control, from two independent experiments.

**Figure 3. HLA-A2 IgG-activated PMN lead to VE-cadherin shedding and endothelial permeability.** Confluent EA.hy926 monolayer cells were incubated with primed PMN activated with HLA(-) or HLA-A2 IgG, or bradykinin (BK, positive control) for three hours. VE-cadherin cleavage was estimated by western blotting as a marker of tight junction loss. (A) Western-blot of soluble VE-cadherin in the EA.hy926 cells culture supernatant. (B) Densitometry analysis of the soluble VE-cadherin western-blot. Error bars indicate SD for

duplicate in one representative experiment (n=3). \*  $p < 0.05$ , compared with HLA(-) activated-PMN stimulation.

**Figure 4. Nox2-derived ROS production induces endothelial permeability.** Confluent EA.hy926 monolayer cells were treated with PBS, PMA-stimulated PLB985 WT cells, PMA-stimulated PLB985 Nox2<sup>-/-</sup> cells or PMA-stimulated PMN (A) or treated with 1mM of xanthine and 0.05mU/mL of xanthine oxidase (X/XO) (B) for 3h. Split VE-cadherin was estimated by western blotting as a marker of tight junction loss. Histograms illustrate the densitometry analysis of western-blot of soluble VE-cadherin measured in culture supernatant. Error bars indicate SD for duplicate in one representative experiment (n=3). \*  $p < 0.05$  compared with the treatment with PMA-stimulated PLB985 Nox2<sup>-/-</sup> cells. (B inset) An *in vitro* xanthine/xanthine oxidase superoxide production system was used at a concentration of 1mM xanthine and 0.05mUI xanthine oxidase. Oxidase activity was measured for 2h at 37°C by chemiluminescence in presence of luminol and compared to oxidase activity measured in differentiated PLB985 WT or Nox2<sup>-/-</sup> stimulated by PMA. Error bars indicate SD for duplicates in one representative experiment for at least three independent experiments.

**Figure 5. Schematic model of HLA-A2 IgG mediated-TRALI.** This Figure illustrates the proposed pathway linking HLA-A2 IgG, PMN activation, and endothelial permeability in a revisited “two-hit model”. 1) The “first-hit”, an underlying clinical condition of the patient, results in the priming of neutrophils and their sequestration and accumulation to the lung capillary. 2) The “second-hit” is caused by anti-HLA-A2-class I antibodies contained in the blood products that recognize patient’s HLA-A2 PMN. If the concentration of anti-HLA-A2 antibodies is above a certain threshold, PMN are activated and in turn release Nox2-derived

ROS. The direct consequence is endothelial wall damage, vascular leakage, and pulmonary edema.

Figure 1

*Khoy et al*

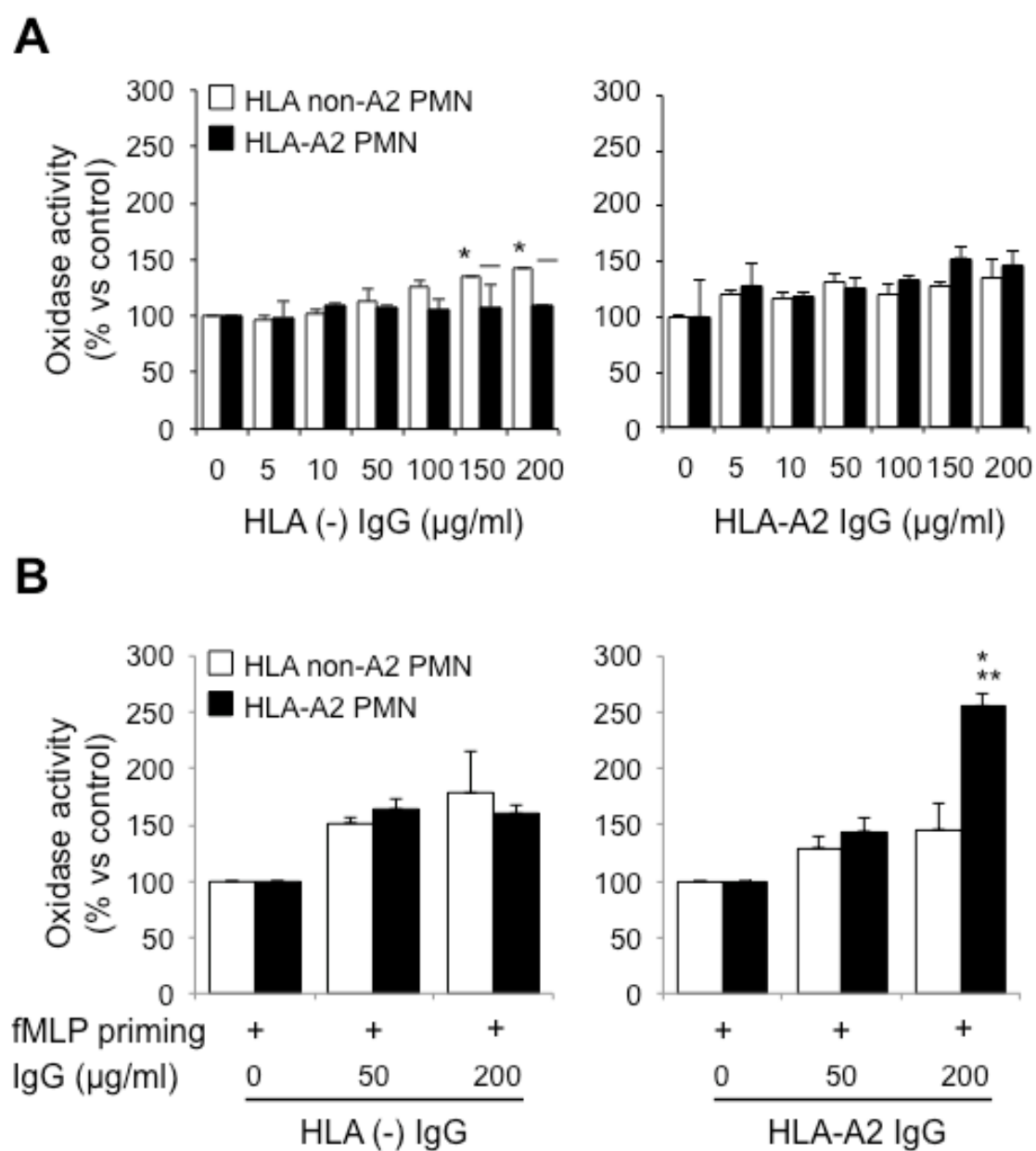


Figure 2

Khoy et al

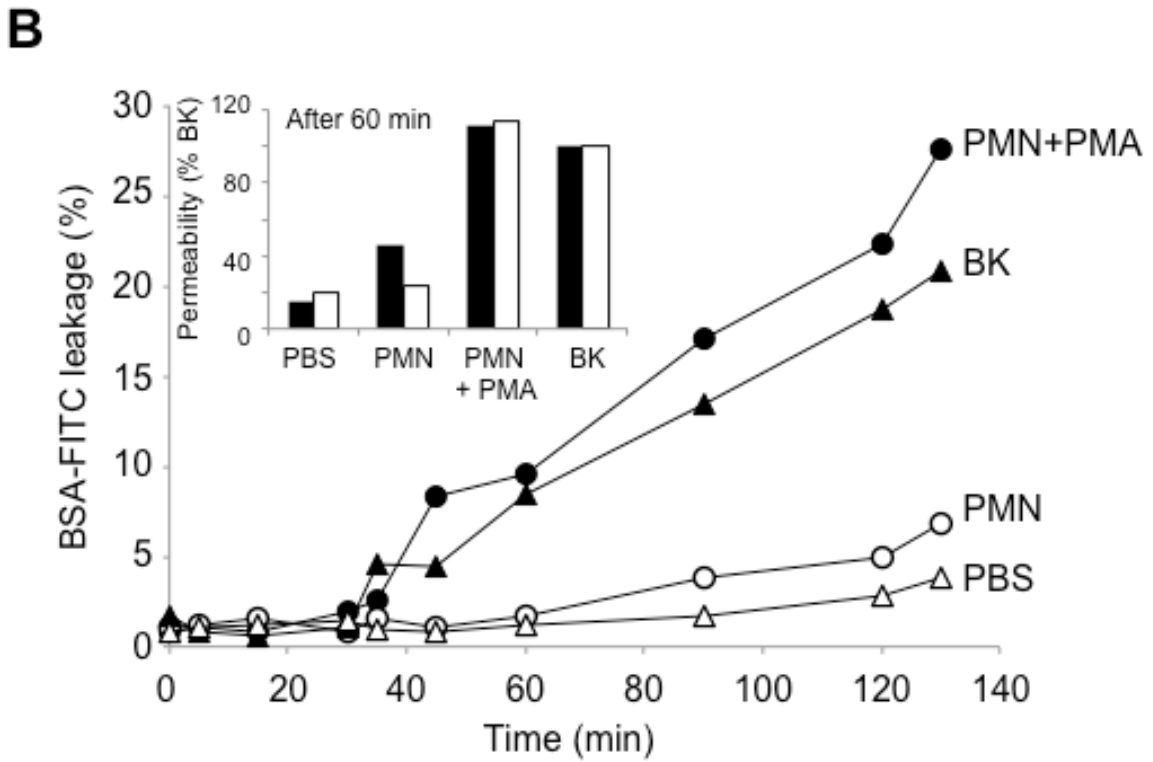
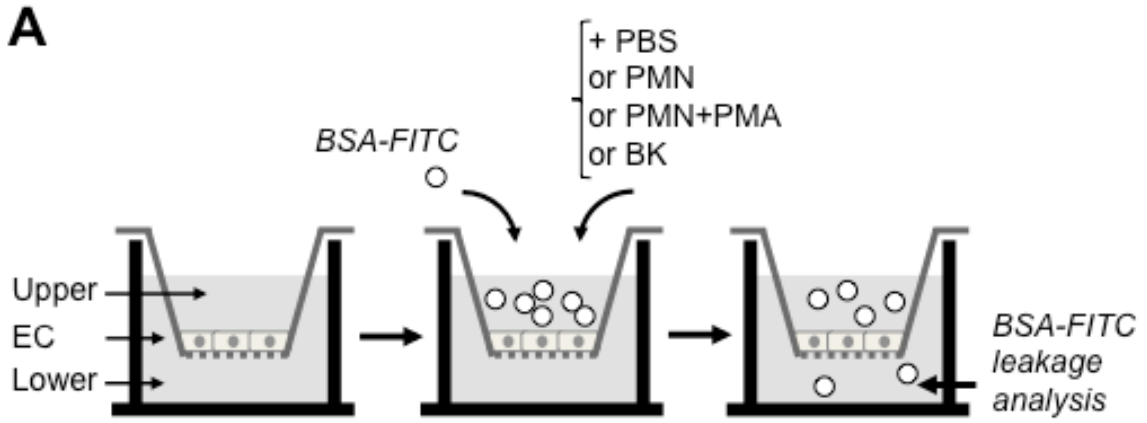
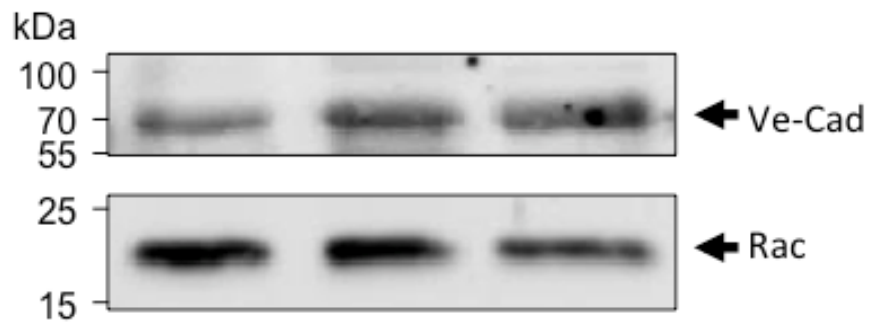




Figure 3

*Khoy et al*

**A**



**B**

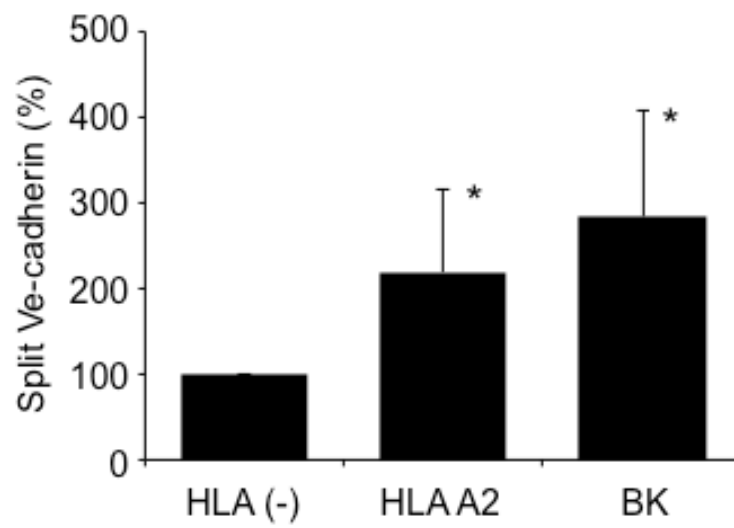


Figure 4

*Khoy et al*

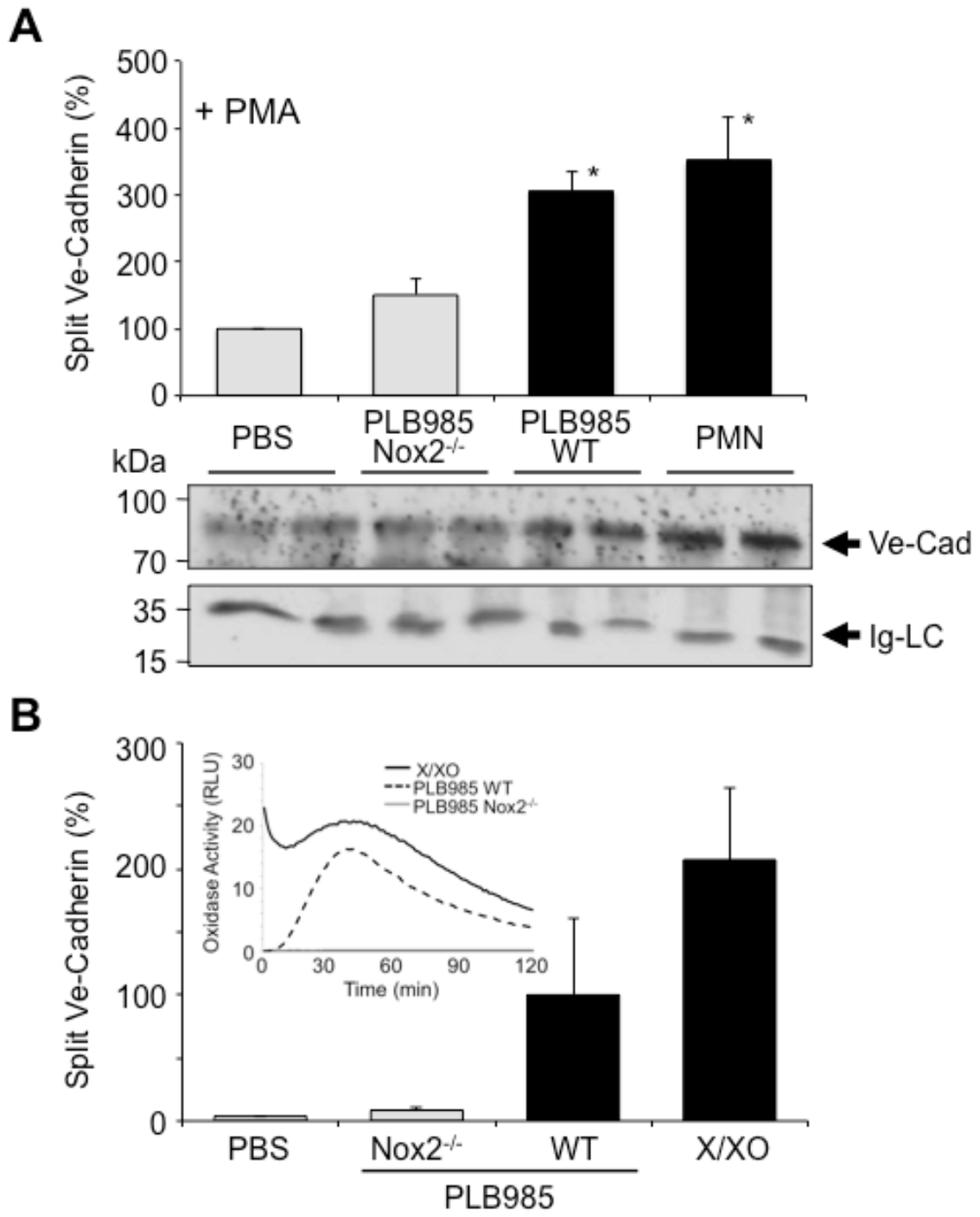
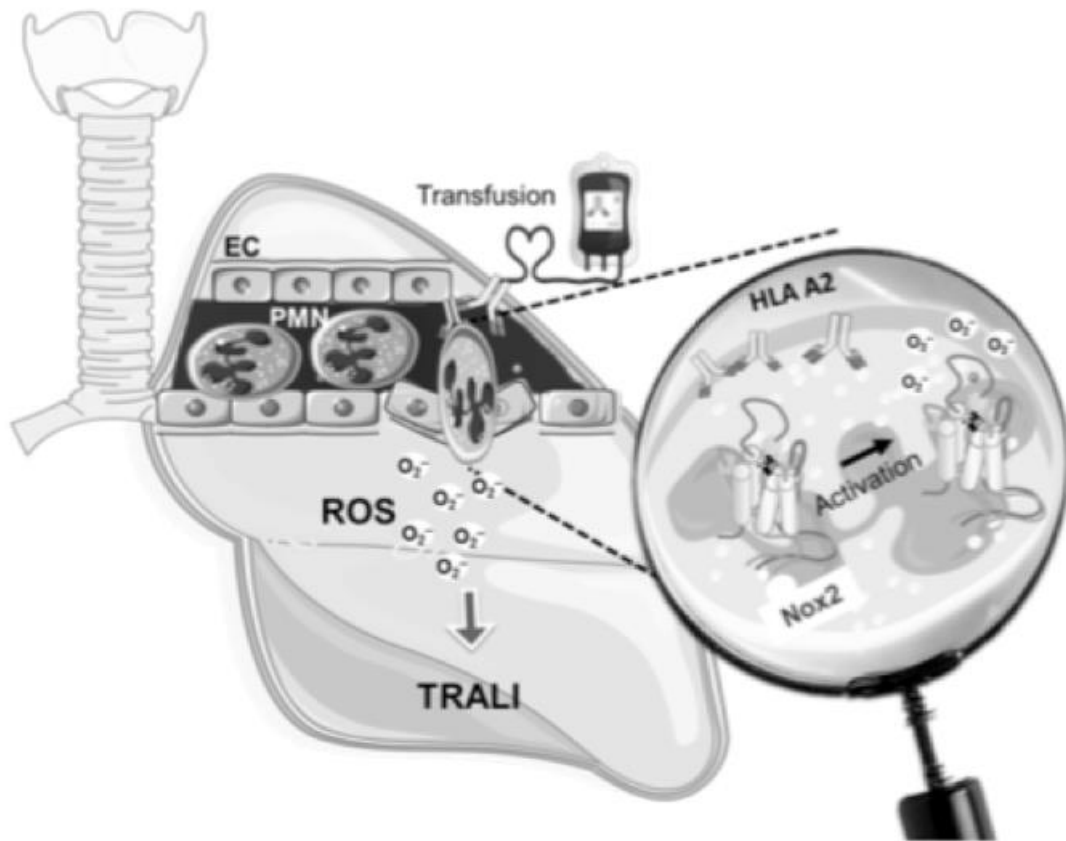


Figure 5

*Khoy et al*



# RESULTATS DU PREMIER CHAPITRE

ACTIVATION DES NEUTROPHILES PAR LES ANTICORPS ANTI-  
HLA-A2 ET CONSEQUENCE SUR L'ENDOTHELIUM

Partie II :

Résultats supplémentaires



**PREMIER CHAPITRE**

**ACTIVATION DES NEUTROPHILES PAR LES ANTICORPS ANTI-HLA-A2 ET CONSEQUENCE SUR L'ENDOTHELIUM**

**I. Les outils de travail : sélection des sérums et des cellules.**

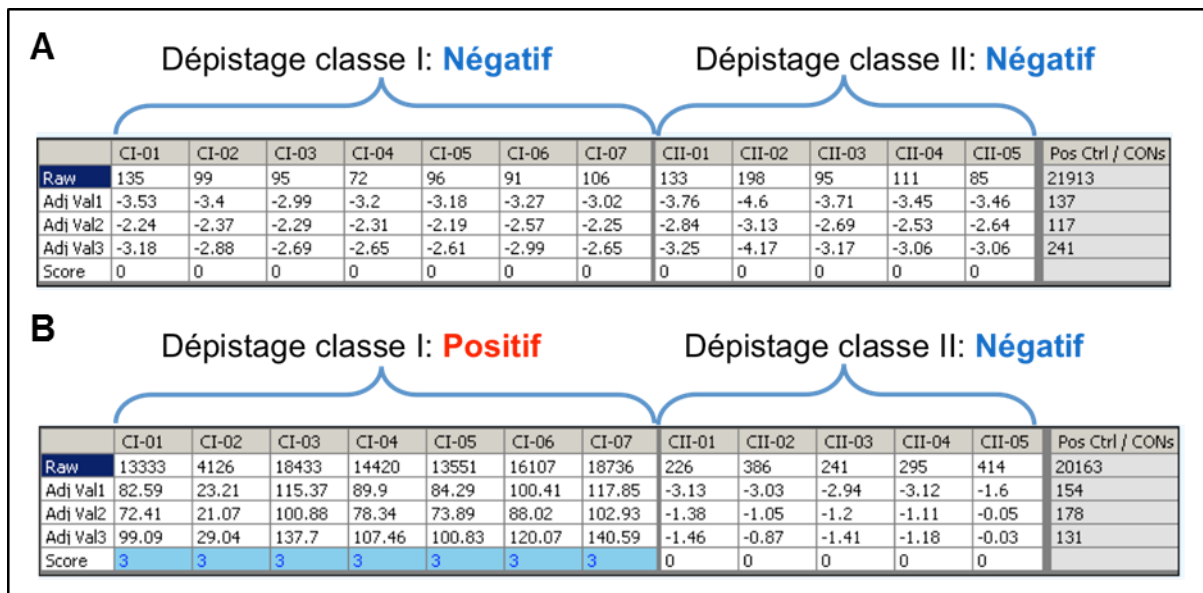
**I.1 Du dépistage des anticorps anti-HLA à leur purification**

**I.1.1 Dépistage et recherche d'anticorps anti-HLA**

- Dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex

Dans un premier temps, les sérums de donneurs sains sont triés après dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex. Il s'agit de sélectionner des sérums dont le dépistage est positif en classe I mais négatif en classe II d'une part et des sérums dont le dépistage est négatif en classe I et II.

La Figure 41 illustre les résultats de dépistage négatif (Figure 41.A) ou positif (Figure 41.B) en classe I et négatif en classe II. L'interprétation de ces résultats nécessite d'analyser plusieurs facteurs qui sont détaillés dans la partie Matériels et Méthodes.



**Figure 41. Le dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™.**

Le sérum est incubé avec des billes couplées à un fluorochrome et recouvertes par des cellules de spécificité HLA connue. Il existe 7 billes différentes pour la classe I (notée CI-01 à CI-07) et 5 billes pour la classe II (notée CII-01 à CII-05). Après marquage par un anticorps secondaire, le cytomètre en flux permet la mesure de la fluorescence (« Raw » sur la figure) pour chaque type de bille. Un signal au-dessus du seuil de détection (Intensité de fluorescence ou Raw > 500, score > 1) indique la présence des anticorps anti-HLA spécifiques de la bille. **(A)** Exemple de dépistage négatif en anticorps de classe I et de classe II. **(B)** Exemple de dépistage positif en anticorps de classe I et négatif en anticorps de classe II.

Les résultats de la Figure 41A montre une fluorescence « Raw » pour chaque bille de spécificité HLA classe I et HLA classe II inférieure à 500 ainsi qu'un score égal à 0 ce qui valide un dépistage négatif en anticorps anti-HLA de classe I et de classe II : le sérum ne possède pas d'anticorps anti-HLA.

Sur la Figure 41B, les fluorescences « Raw » de toutes les billes de classe I sont supérieures à 500 et le score pour chaque bille est égal à 3 (>1). Le dépistage est positif pour les anticorps anti-HLA de classe I. Par ailleurs, les fluorescences des billes de classe II sont inférieures à 500 et possèdent un score égal à 0 ; le dépistage est négatif pour les anticorps anti-HLA de classe II. Le sérum possède exclusivement des anticorps anti-HLA de classe I.

Plus la valeur de fluorescence est élevée, plus le sérum présente un taux élevé d'anticorps anti-HLA.

- Analyse des anticorps anti-HLA par la technique de lymphocytotoxicité (LCT)

Dans un second temps, l'absence ou la présence d'anticorps anti-HLA cytotoxiques dans les sérums est analysée par la technique de lymphocytotoxicité (LCT) (Figures 42 et 43).

Cette technique est réalisée en plaque 96 puits. Dans chaque puits, un panel de lymphocytes de typage HLA connu est incubé avec le sérum et le complément. Si les anticorps du sérum reconnaissent la structure antigénique HLA des lymphocytes, le complément est activé et lyse la cellule. Le nombre de cellules lysées et mortes (colorées en vert) par rapport au nombre de cellules vivantes (colorées en rouge) est évalué par microscopie à fluorescence ce qui permet d'établir un score entre 1 (aucune cellule lysée) et 8 (toutes les cellules sont lysées).

Pour les différents panels de lymphocytes de typage HLA connu (Figure 42), aucune cellule n'est lysée en présence du sérum. Le score est de 1 pour tous les puits : le sérum ne possède pas d'anticorps anti-HLA cytotoxiques.

Dénomination des cellules du panel	Evaluation de la réaction (SCORE)	Spécificité antigénique du panel		
		HLA-A	HLA-B	HLA-C
PA0001	1	A1 A68 A28	B13 B41	CW6 CW*1701
PA0002	1	A1 A30	B18 B51	
PA0003	1	A24 A11 A9	B35 B38 B16	
PA0007	1	A2	B39 B51 B16 B5	
PA0008	1	A2 A31 A19	B39 B47 B16	
PA0011	1	A1 A11	B57 B55 B17 B22	CW3
PA0015	1	A32 A34 A19 A10	B7 B62 B15	CW*0303
PA0017	1	A1 A31 A19	B8 B67	
PA0019	1	A1 A3	B13 B37	CW*0602
PA0024	1	A2 A11	B49 B35 B21	
PA0028	1	A24 A31 A9 A19	B60 B62 B15 B40	CW3
PA0029	1	A23 A32 A9 A19	B27 B49 B21	CW2 CW7
PA0030	1	A1 A24 A9	B65 B27 B14	CW2 CW8
PA0035	1	A3 A26 A10	B35 B45 B12	
PA0039	1	A3 A24 A9	B56 B27 B22	CW*0102 CW*0202
PA0042	1	A1 A2	B52 B58 B17 B5	
PA0043	1	A24 A25 A10 A9	B39 B56 B16 B22	
PA0045	1	A23 A31	B50 B51	
PA0048	1	A68 A32 A19 A28	B55 B61 B40 B22	CW*0202
PA0050	1	A32 A66 A10 A19	B38 B41 B16	
PA0051	1	A30 A32 A19	B7 B13	
PA0054	1	A25 A68 A28 A10	B18 B37	
PA0055	1	A26 A31 A10 A19	B7 B64 B14	CW7 CW8
PA0060	1	A3 A80	B35 B58 B17	
PA0063	1	A1 A2	B44 B63 B15 B12	CW*0501 CW*0701
PA0064	1	A2 A33 A19	B18 B44 B12	CW*0501 CW*0701
PA0066	1	A23 A68 A9	B60 B40 B12	CW3 CW4
PA0067	1	A2	B39 B42 B16	CW*1203 CW*1701
PA0068	1	A11 A26 A10	B27	CW*0102
PA0069	1	A2	B7 B58 B17	CW7 CW7
PA0070	1	A1 A33 A19	B35 B58 B17	CW3 CW4
PA0071	1	A25 A10	B18 B57 B17	CW6 CW*1203
PA0072	1	A29 A33 A19	B44 B37 B12	CW6 CW*1601
PA0073	1	A68 A68 A28	B53 B58 B17 B5	CW4 CW7
PA0074	1	A3 A24	B64 B35	CW4 CW8
PA0075	1	A3 A32	B8 B44	CW7 CW*1601
PA0076	1	A29 A68	B13 B58	
TA0081	1	A2 A68 A28	B49 B53 B21 B5	CW4 CW7
TA0114	1	A1 A29	B13 B35	CW4 CW6
TA0165	1	A2 A34 A10	B8 B18	CW*1203
TA0204	1	A24 A69 A9 A28	B7 B8	
TA0211	1	A3 A3	B44 B70 B15 B12	
TA0219	1	A1 A11	B35 B73	CW4

Figure 42. Absence d'anticorps anti-HLA par la technique de lymphocytotoxicité. 36 panels de lymphocytes de typage HLA connus sont mis en présence du sérum à tester. Après ajout du complément ainsi que d'un réactif (Fluoroquençh®) qui colore les cellules vivantes en vert et les cellules mortes en rouge, la mortalité cellulaire est évaluée en SCORE (0 à 8) en microscopie à fluorescence. Le score de 0 correspond à une fluorescence ininterprétable.

Sur la Figure 43, seuls les puits possédant un panel de lymphocytes de typage HLA-A2 ont un score de 8 car toutes les cellules sont lysées par le complément : le sérum possède exclusivement des anticorps anti-HLA-A2.



Dénomination des cellules du panel	Evaluation de la réaction (SCORE)	Spécificité antigénique du panel		
		HLA-A	HLA-B	HLA-C
PA0007	8	A2	B39 B51 B16 B5	
PA0008	8	A2 A31 A19	B39 B47 B16	
PA0024	8	A2 A11	B49 B35 B21	
PA0033	8	A2 A23 A9	B37 B72 B15	CW*0602
PA0042	8	A1 A2	B52 B58 B17 B5	
PA0063	8	A1 A2	B44 B63 B15 B12	CW*0501 CW*0701
PA0064	8	A2 A33 A19	B18 B44 B12	CW*0501 CW*0701
PA0067	8	A2	B39 B42 B16	CW*1203 CW*1701
PA0069	8	A2	B7 B58 B17	CW7 CW7
TA0081	8	A2 A68 A28	B49 B53 B21 B5	CW4 CW7
TA0165	8	A2 A34 A10	B8 B18	CW*1203
PA0001	1	A1 A68 A28	B13 B41	CW6 CW*1701
PA0002	1	A1 A30	B18 B51	
PA0003	1	A24 A11 A9	B35 B38 B16	
PA0011	1	A1 A11	B57 B55 B17 B22	CW3
PA0015	1	A32 A34 A19 A10	B7 B62 B15	CW*0303
PA0017	1	A1 A31 A19	B8 B67	
PA0019	1	A1 A3	B13 B37	CW*0602
PA0028	1	A24 A31 A9 A19	B60 B62 B15 B40	CW3
PA0029	1	A23 A32 A9 A19	B27 B49 B21	CW2 CW7
PA0030	1	A1 A24 A9	B65 B27 B14	CW2 CW8
PA0035	1	A3 A26 A10	B35 B45 B12	
PA0039	1	A3 A24 A9	B56 B27 B22	CW*0102 CW*0202
PA0043	1	A24 A25 A10 A9	B39 B56 B16 B22	
PA0045	1	A23 A31	B50 B51	
PA0048	1	A68 A32 A19 A28	B55 B61 B40 B22	CW*0202
PA0050	1	A32 A66 A10 A19	B38 B41 B16	
PA0051	1	A30 A32 A19	B7 B13	
PA0054	1	A25 A68 A28 A10	B18 B37	
PA0055	1	A26 A31 A10 A19	B7 B64 B14	CW7 CW8
PA0060	1	A3 A80	B35 B58 B17	
PA0062	1	A24 A29 A9	B57 B63 B17 B15	CW7 CW6
PA0066	1	A23 A68 A9	B44 B60 B40 B12	CW3 CW4
PA0068	1	A11 A26 A10	B27	CW*0102
PA0070	1	A1 A33 A19	B35 B58 B17	CW3 CW4
PA0071	1	A25 A10	B18 B57 B17	CW6 CW*1203
PA0072	1	A29 A33 A19	B44 B37 B12	CW6 CW*1601
PA0073	1	A68 A68 A28	B53 B58 B17 B5	CW4 CW7
PA0074	1	A3 A24	B64 B35	CW4 CW8
PA0075	1	A3 A32	B8 B44	CW7 CW*1601
TA0114	1	A1 A29	B13 B35	CW4 CW6
TA0204	1	A24 A69 A9 A28	B7 B8	
TA0211	1	A3 A3	B44 B70 B15 B12	
TA0219	1	A1 A11	B35 B73	CW4

**Figure 43. Présence d'anticorps anti-HLA-A2 par la technique de lymphocytotoxicité.**

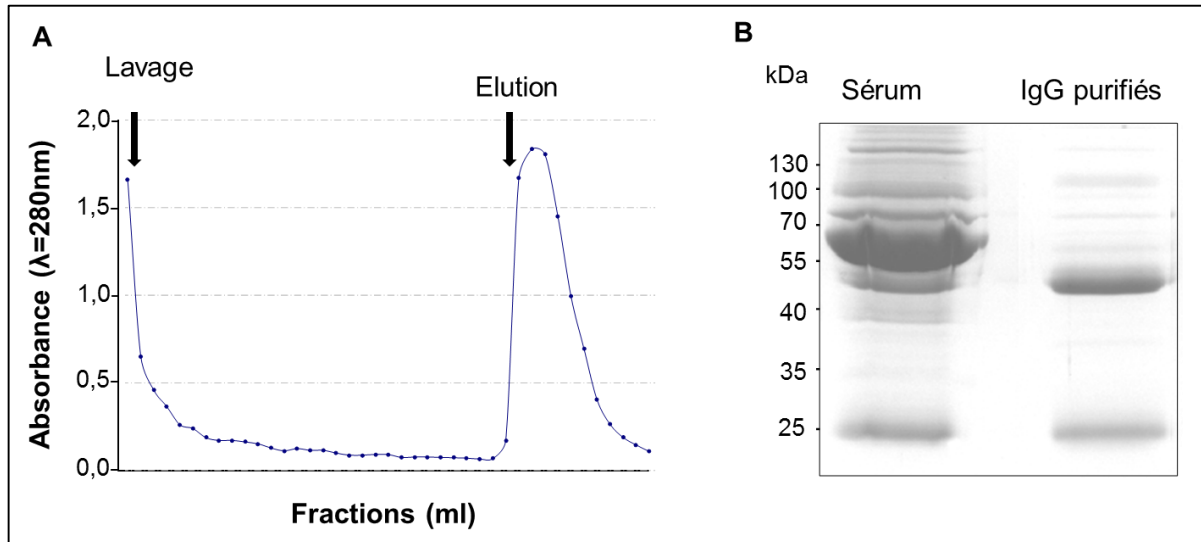
44 panels de lymphocytes de typage HLA connu sont mis en présence du sérum à tester. Après ajout de complément ainsi que d'un réactif (Fluoroquenck®) qui colore les cellules mortes en rouge et les cellules vivantes en vert, la mortalité cellulaire est évaluée en SCORE (allant de 0 à 8) au microscope à fluorescence. Le score de 0 correspond à une fluorescence ininterprétable.

Dans ce travail, les sérums retenus sont répartis en deux groupes :

- Un pool de sérums dont le dépistage en anticorps anti-HLA de classe I et de classe II est négatif par technique Luminex™ et dont la recherche d'anticorps anti-HLA est négative en LCT : **ce sont les sérums HLA (-). Ces sérums ne contiennent aucun anticorps anti-HLA.**
- Les sérums dont le dépistage est positif en anticorps anti-HLA de classe I et négatif en anticorps anti-HLA de classe II par technique Luminex™ et dont seule la présence d'anticorps anti-HLA-A2 (classe I) est retrouvée en LCT : **ce sont les sérums HLA-A2.**

### I.1.2 Purification des immunoglobulines G à partir des sérums

Les IgG sont purifiées à partir du pool de sérum HLA (-) et des sérums HLA-A2 par chromatographie d'affinité sur une colonne de protéine A Sepharose. L'éluion à pH acide des protéines est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm (Figure 44A). Le pic d'absorption confirme la bonne éluion des IgG.



**Figure 44. Purification des Immunoglobulines G.** (A) Les IgG sont purifiées sur colonne d'affinité de protéine A. Les protéines non fixées sont éliminées par un tampon de lavage. Les IgG fixées sont éluées à pH acide (pH=3) en fraction de 1 ml. (B) Les protéines (15  $\mu\text{g}$  / dépôt) du sérum et de la fraction d'IgG purifiées (IgG) sont séparées par SDS-PAGE et colorées au Bleu de Coomassie.

Les IgG purifiées sont ensuite déposées sur une colonne de dessalage équilibrée avec un tampon PBS ce qui permet de changer le tampon et d'éliminer les sels et les molécules de bas poids moléculaire. La purification est ensuite évaluée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en conditions réductrices et après coloration au Bleu de Coomassie (Figure 44B). Les fractions purifiées montrent la présence majoritaire de bandes à 55 kDa et 25 kDa, qui correspondent respectivement à la chaîne lourde et à la chaîne légère des IgG. La concentration totale des immunoglobulines G est dosée par la méthode de Bradford.

On distinguera par la suite les fractions des IgG purifiées à partir du sérum HLA-A2 (qui contient exclusivement des anticorps anti-HLA-A2 cytotoxiques) et les fractions d'IgG purifiées à partir du pool de sérums HLA (-) (qui ne contiennent aucun anticorps anti-HLA) (Tableau 19). Elles sont appelées respectivement les IgG HLA-A2 et les IgG HLA (-).

Tableau 20. Récapitulatif des étapes de sélection des sérums

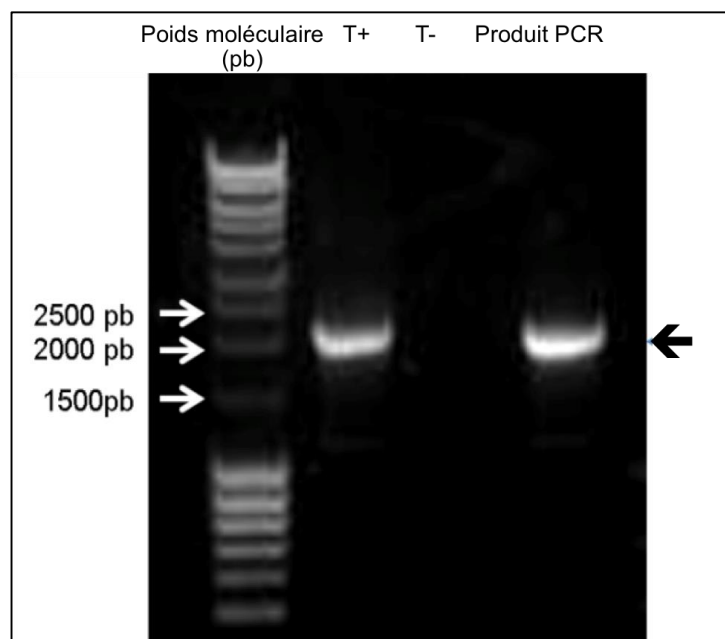
Donneurs sains	Dépistage anticorps anti-HLA	Anticorps anti-HLA	Dénominations des sérums	Dénomination des IgG purifiées
Sans événement immunisant	Classe I : NEGATIF Classe II :NEGATIF	Absence	Pool sérums HLA (-)	IgG HLA (-)
Avec événement immunisant	<b>Classe I : POSITIF</b> Classe II : NEGATIF	<b>Anti-HLA-A2 uniquement</b>	Sérums HLA-A2	<b>IgG HLA-A2</b>

## I.2 Identification des antigènes HLA : phénotypage HLA des donneurs

Dans cette étude, nous avons utilisé deux types de neutrophiles : des neutrophiles de donneurs volontaires sains de typage HLA-A2 et des neutrophiles de volontaires sains de typage HLA différent.

Le typage HLA est réalisé, entre autres, chez des donneurs volontaires sains à l'occasion de leur inscription dans le registre du don de moelle osseuse. Il a été effectué au laboratoire HLA de l'Etablissement Français du sang (EFS Site de Grenoble) par séquençage à partir d'ADN génomique.

L'ADN est extrait pour chacun des individus à typer puis l'ADN spécifique des gènes HLA est amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques.



**Figure 45. Contrôle de l'amplification des exons 2, 3 et 4 des gènes HLA du locus A sur gel d'agarose 1%.** Le produit de PCR issu de l'amplification des gènes HLA (10 µl) est déposé sur un gel d'agarose. La vérification de la migration et de l'amplification des produits de PCR se fait sous UV à l'aide la caméra Quantum ST4 et à l'aide du logiciel Image Camtup-Capt (Vilber Lourmat). Un témoin négatif (T- : H<sub>2</sub>O) et un témoin positif (T+, ADN du gène HLA du locus A) sont amplifiés en parallèle comme contrôle de la méthode. Un marqueur de poids moléculaire est déposé en parallèle.

La taille des fragments amplifiés est contrôlée par migration sur gel d'agarose 1 % (Figure 45). Un fragment à 2000 pb est détecté correspondant à la taille des gènes HLA du locus A. Le contrôle positif (ADN de contrôle des gènes HLA du locus A) révèle la présence d'un fragment de même taille.

Une fois amplifié, le fragment d'ADN spécifique des gènes HLA est séquencé. Le résultat du séquençage se matérialise sous la forme d'un électrophorégramme qui correspond à une succession de bases A, T, C, G (Figure 46). Le logiciel utilisé (Assign™) compare puis identifie les séquences du même locus avec les séquences HLA consensus appartenant à une banque d'allèles. Ce logiciel aligne de façon automatique les exons sur une séquence consensus et propose une liste de résultats possibles de 0 à n mismatch (*0 MM à n MM*) correspondant au nombre de positions discordantes avec la séquence consensus.

La Figure 46A montre les résultats du séquençage de l'un des 3 exons (exon 2) des allèles HLA de classe I en utilisant 2 amorces (X2F et X2R). Il n'existe aucune discordance entre la séquence à typer et la séquence consensus de l'allèle de typage HLA-A\*02:01 puisqu'il y a 0 MM (Figure 46B). Cette parfaite corrélation suggère que le phénotypage de cet individu correspond au typage HLA-A\*02:01 (résolution allélique) ou HLA-A\*02 (résolution générique) et qu'il est homozygote pour le locus A. De la même manière, les résultats présentés sur la Figure 46C montrent que l'individu possède un typage HLA-A\*11, 32.



**A**

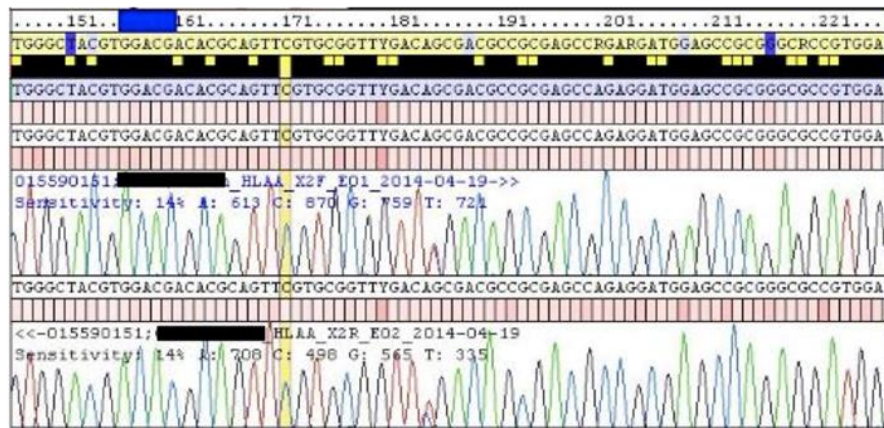
Séquence consensus

Séquence

Amorce X2F

Séquence

Amorce X2R



**B**

**C**

Start: 2 (74) cDNA 2, Exons 74, Exons 74, Exons 74, Exons 74  
 Stop: 271 (343) cDNA 271, Exons 343, Exons 343, Exons 343, Exons 343

Allele 1	Allele 2	MM
A*02:01 01:01	A*02:01 01:01	0
A*02:01 01:01	A*02:01 01:02L	0
A*02:01 01:01	A*02:01 01:03	0
A*02:01 01:01	A*02:01 04	0
A*02:01 01:01	A*02:01 05	0
A*02:01 01:01	A*02:01 06	0
A*02:01 01:01	A*02:01 08	0
A*02:01 01:01	A*02:01 10	0
A*02:01 01:01	A*02:01 11	0
A*02:01 01:01	A*02:01 14Q	0
A*02:01 01:01	A*02:01 15	0
A*02:01 01:01	A*02:01 18	0
A*02:01 01:01	A*02:01 21	0
A*02:01 01:01	A*02:01 22	0
A*02:01 01:01	A*02:01 24	0
A*02:01 01:01	A*02:01 25	0
A*02:01 01:01	A*02:01 27	0
A*02:01 01:01	A*02:01 28	0
A*02:01 01:01	A*02:01 30	0
A*02:01 01:01	A*02:01 32	0
A*02:01 01:01	A*02:01 34	0
A*02:01 01:01	A*02:01 35	0
A*02:01 01:01	A*02:01 36	0
A*02:01 01:01	A*02:01 37	0
A*02:01 01:01	A*02:01 41	0
A*02:01 01:01	A*02:01 42	0
A*02:01 01:01	A*02:01 46	0
A*02:01 01:01	A*02:01 47	0
A*02:01 01:01	A*02:01 48	0
A*02:01 01:01	A*02:01 50	0
A*02:01 01:01	A*02:01 54	0

Start: 2 (74) cDNA 2, Exons 74, Exons 74, Exons 74, Exons 74  
 Stop: 271 (343) cDNA 271, Exons 343, Exons 343, Exons 343, Exons 343

Allele 1	Allele 2	MM
A*11:01 15	A*32:13	0
A*11:01 15	A*32:16	0
A*11:01 15	A*32:19	0
A*11:01 15	A*32:21	0
A*11:01 15	A*32:22	0
A*11:01 15	A*32:23	0
A*11:01 15	A*32:26	0
A*11:01 15	A*32:28	0
A*11:01 15	A*32:30	0
A*11:01 15	A*32:32	0
A*11:01 15	A*32:33 01	0
A*11:01 15	A*32:33 02	0
A*11:01 15	A*32:34	0
A*11:01 15	A*32:36	0
A*11:01 15	A*32:41	0
A*11:01 15	A*32:44	0
A*11:01 15	A*32:45	0
A*11:01 15	A*32:46	0
A*11:01 15	A*32:47	0
A*11:01 15	A*32:48	0
A*11:01 15	A*32:52	0
A*11:01 15	A*32:53	0
A*11:01 15	A*32:54	0
A*11:01 15	A*32:55 01	0
A*11:01 15	A*32:55 02	0
A*11:01 15	A*32:57	0
A*11:01 15	A*32:61	0
A*11:01 16	A*32:01 01	0
A*11:01 16	A*32:01 02	0
A*11:01 16	A*32:01 03	0
A*11:01 16	A*32:01 04	0

Figure 46. Résultat du séquençage de l'exon 2 sous forme d'électrophorégramme. (A) Les séquences du fragment d'ADN obtenu à partir de l'amorce X2F et X2R sont comparées à la séquence d'amorce consensus. Chaque nucléotide est différencié par une couleur par base (bleu pour la cytosine (C), vert pour l'adénine (A), noir pour la guanine (G) et rouge pour la thymine (T)). La figure (B) et (C) représente les différentes combinaisons alléliques possibles obtenues et le nombre de discordance (ou MM= MisMatch) avec la séquence consensus de l'allèle : l'individu a un typage HLA-A\*02:01 (B) ou un typage HLA-A\*11, 32 (C).

Dans ce travail, les PMN purifiés à partir de sang frais provenant d'un individu sain de typage HLA-A\*02 sont appelés : « **PMN HLA-A2** » et les PMN purifiés à partir de sang provenant d'un individu d'un typage HLA différent sont appelés « **PMN HLA non A2** » (Tableau 20).

**Tableau 21. Acronymes utilisés pour les PMN de cette étude**

Typage HLA pour le locus A	
Nomenclature BM « 2 digits »	Dénomination des PMN
HLA-A*02	<b>PMN HLA-A2</b>
HLA-A différent	<b>PMN HLA non A2</b>

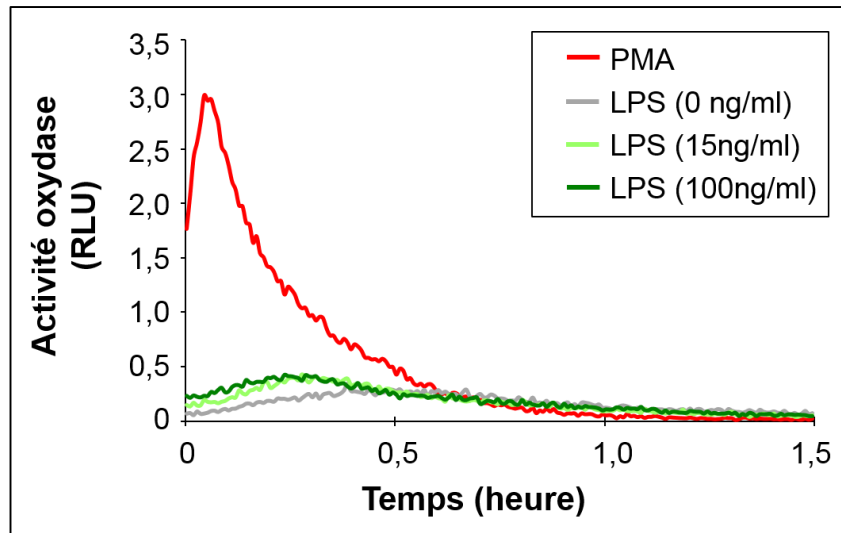
## II. Article Transfusion : Impact des anticorps anti-HLA sur l'activation des neutrophiles après priming par le LPS

Pour compléter les données de l'article, nous avons étudié la production de ROS libérés par les PMN quand ceux-ci sont pré-activés (« *primés* ») avec un agent primant différent du fMLP. Pour rappel, le « *priming* » des PMN est un état dans lequel les PMN n'ont pas (ou très peu) d'activité NADPH oxydase, mais ils deviennent plus sensibles à un deuxième stimulus qui lui va déclencher l'activité oxydase. Les agents sensibilisants (primants) que nous avons testés sont le fMLP (dont les résultats sont présentés dans l'article) et le lipopolysaccharide bactérien (LPS), endotoxine bactérienne de la membrane externe des bactéries Gram (-).

### II.1 Mesure de l'activité oxydase des neutrophiles sensibilisés avec le LPS

L'effet du « *priming* » est vérifié dans les expériences ci-dessous. Dans cette étude, le « *priming* » des PMN est réalisé par incubation des PMN en présence de faible concentration de l'endotoxine bactérienne, le LPS. L'objectif de sensibilisation des neutrophiles est de mimer *in vitro* l'état de vulnérabilité du patient à risque de développer le TRALI.

Les PMN sont mis en contact pendant 60 minutes avec deux concentrations de LPS décrites dans la littérature comme étant des concentrations de priming (Almkvist et al. 2001). La cinétique de l'activité oxydase mesurée des PMN sensibilisés par le LPS, aux concentrations de 15 et 200 ng/ml, est comparable à celle des PMN non stimulés (Figure 47). L'activité oxydase des PMN à l'état de priming est de faible intensité si on compare celle des PMN stimulés par le PMA, un activateur non physiologique de la NADPH oxydase, où l'on observe très nettement un pic d'activité au bout de quelques minutes.



**Figure 47. Activité oxydase des PMN stimulés par le LPS.** Les PMN proviennent de sang frais après leur purification par gradient de Ficoll. Les cellules ont été stimulées par le LPS à 37°C pendant 60 minutes à deux concentrations différentes : 15 ng/mL et 100 ng/mL. La production totale de ROS a été mesurée par chimioluminescence en présence de luminol. L'activité oxydase est exprimée en somme de RLU pendant 1h30 à raison d'une mesure tous les 30 secondes. L'activité oxydase est représentée en fonction du temps. La stimulation des PMN par le PMA (80 ng/mL) est utilisée comme témoin positif. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

Dans ces expériences, le priming des PMN par le LPS n'induit pas à lui seul une activation des neutrophiles. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus après le priming des PMN par le fMLP.

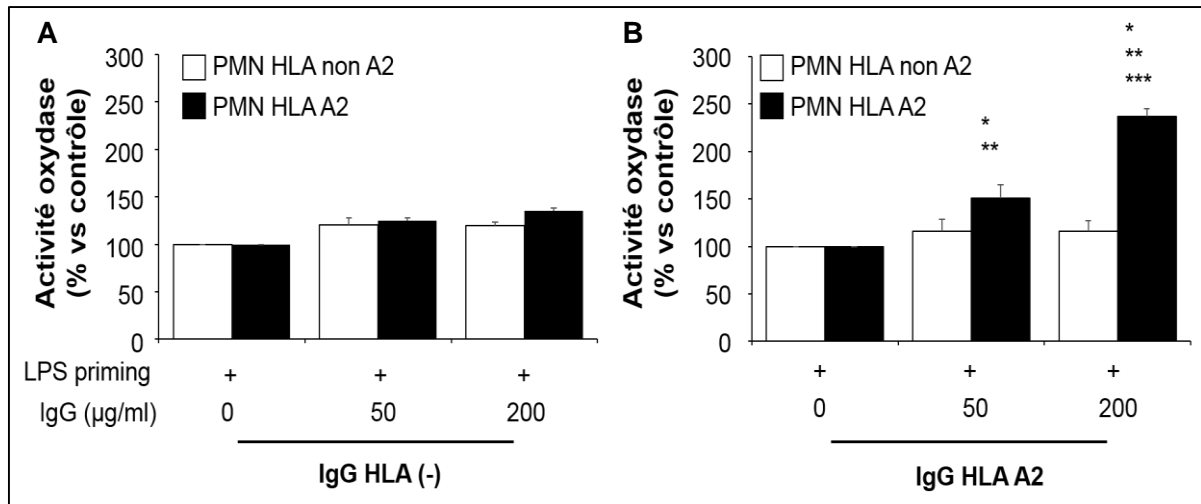
## II.2 Mesure de l'activité oxydase des neutrophiles sensibilisés par le LPS en présence d'immunoglobulines G

Après vérification que le priming des polynucléaires neutrophiles n'entraînait pas une activation des PMN, la deuxième partie de cette étude consiste à évaluer l'effet des IgG sur l'activité oxydase des PMN préalablement stimulés par le LPS.

Les expériences sont réalisées à partir des deux types de PMN de phénotypage HLA différent : des PMN ne possédant pas la structure antigénique reconnue par l'anticorps anti-HLA-A2 (PMN HLA non A2) et des PMN exprimant la structure antigénique HLA-A2 reconnue par l'anticorps anti-HLA-A2 (PMN HLA-A2). La production de ROS est évaluée après priming par le LPS, en présence des IgG HLA-A2 ou des IgG HLA (-), aux concentrations de 50 et 200 µg/ml.

L'activité oxydase des PMN, préalablement sensibilisés par le LPS à la concentration de 100 ng/m est mesurée, en présence d'IgG HLA (-) (Figure 48A) ou d'IgG HLA-A2 (Figure 48B).





**Figure 48. Effet des IgG sur l'activité oxydase des PMN préalablement stimulés par le LPS.** Les PMN HLA non A2 et les PMN HLA-A2 sont incubés avec le LPS (100 ng /mL) à 37°C pendant 60 min. L'activité NADPH oxydase est évaluée par la mesure des ROS produits par chimioluminescence en présence de luminol, après stimulation par des IgG HLA (-) (A) ou des IgG HLA-A2 (B).

\* résultat significativement différent ( $p < 0,05$ ) de celui obtenu dans les mêmes conditions avec les PMN HLA non A2 ; \*\* résultat significativement différent ( $p < 0,05$ ) de celui obtenu en absence d'IgG ; \*\*\* résultat significativement différent ( $p < 0,05$ ) de celui obtenu en présence de 50 µg/ml d'IgG HLA-A2. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

En présence d'IgG HLA (-) (Figure 48A) :

- L'activité oxydase est faiblement augmentée (augmentation non significative) pour les deux types de PMN, quelle que soit la concentration d'IgG présente, en comparaison avec l'activité des PMN en absence d'IgG.
- Aux mêmes concentrations d'IgG HLA (-), il n'y a pas de différence significative entre l'activité oxydase des PMN HLA non A2 et les PMN HLA-A2.

En revanche, les mêmes expériences réalisées en présence d'IgG HLA-A2 ne donnent pas les mêmes résultats (Figure 48B) :

- Dès 50 µg/ml d'IgG HLA-A2, il existe une différence significative entre l'activité oxydase des PMN HLA-A2 par rapport à celle obtenue avec les PMN HLA non A2 ( $*p < 0,05$ ) ou en absence d'IgG ( $**p < 0,05$ ).
- Cette différence augmente avec une concentration supérieure d'IgG (200 µg/ml) ( $***p < 0,05$ )
- Avec les PMN HLA non A2, aucune différence significative d'activité oxydase n'est observée en comparaison avec l'activité des PMN en absence d'IgG.

L'effet des IgG HLA-A2, aux deux concentrations testées, sur les PMN sensibilisés par le fMLP ou le LPS n'entraîne pas d'activation significative des PMN si ceux-ci ne possèdent pas à leur surface le déterminant antigénique HLA correspondant à l'anticorps HLA. A l'inverse, la production de ROS est largement augmentée quand les PMN préalablement sensibilisés rencontrent l'anticorps spécifique capable de former un complexe antigène-anticorps HLA. Il est à noter que l'activation est d'autant plus forte si les PMN sont soumis à une importante concentration en IgG HLA-A2. Ces données suggèrent « un effet seuil » au-delà duquel l'activité de la NADPH oxydase des PMN devient plus forte.

Pour conclure et pour replacer l'objectif de notre étude dans le contexte du TRALI, les anticorps anti-HLA possèdent un fort impact dans l'activation des neutrophiles si les PMN expriment à leur surface l'antigène HLA correspondant. Il faut cependant bien prendre en compte l'existence d'un facteur favorisant la « pré-activation des PMN » chez le patient transfusé.

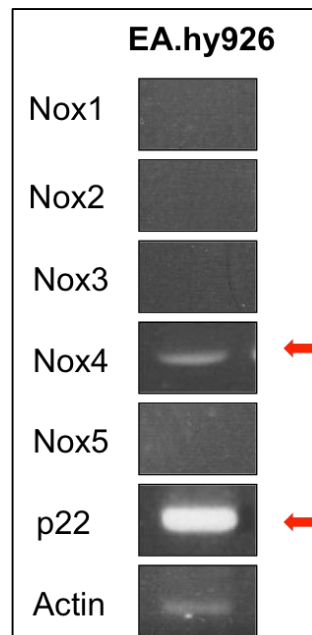
### **III. Caractérisation des NADPH oxydases de la lignée endothéliales EA.Hy926**

Nous avons vu précédemment que les anticorps anti-HLA-A2 entraînent l'activation des PMN HLA-A2 quand ceux-ci étaient préalablement sensibilisés par le LPS. L'activation des PMN résulte en grande partie de l'activation de leur NADPH oxydase phagocytaire, ou Nox2.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au lien qu'il pouvait exister entre le neutrophile activé et la cellule endothéliale. Contrairement aux PMN humains qui n'expriment que Nox2, les cellules non phagocytaires, comme les cellules endothéliales, ont été décrites comme pouvant exprimer plusieurs Nox (Chen et al. 2012; Lassegue et al. 2012). Ici, nous avons étudié l'expression et l'activité des Nox dans la lignée endothéliale EA.hy926.

#### **III.1 Mise en évidence de l'ARNm des NADPH oxydases**

Nous avons tout d'abord étudié la présence de l'ARN messenger des NADPH oxydases dans la lignée EA.hy926. Les résultats de l'expression des Nox par RT-PCR montre que seuls les transcrits de Nox4 ainsi que p22phox sont mis en évidence dans les cellules en culture (Figure 49).



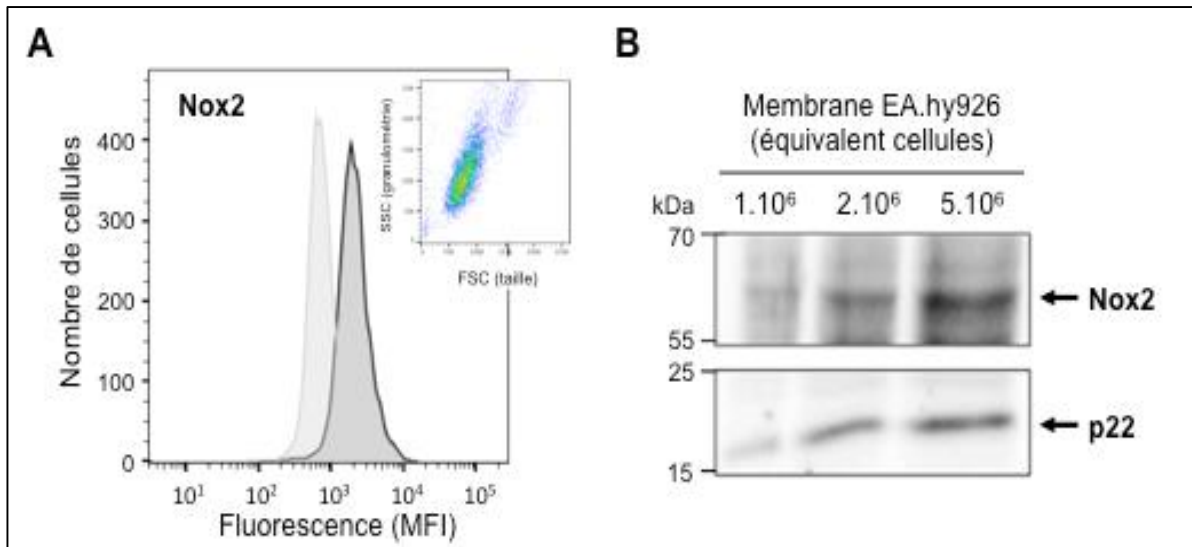
*Figure 49. Expression de l'ARNm des NADPH oxydases dans la lignée endothéliale EA.hy926. Les expériences par RT-PCR ont montré que parmi la famille des NADPH oxydase, seuls les transcrits de Nox4 et p22phox sont exprimés dans les cellules endothéliales.*

## III.2 Mise en évidence de l'expression protéique des NADPH oxydases

### III.2.1 Mise en évidence de l'expression de Nox2

Dans la littérature, il est décrit que Nox4 et Nox2 sont exprimées dans la cellule endothéliale (Bedard et al. 2007 ; Lener et al. 2009). Dans un premier temps, la technique de cytométrie en flux a été utilisée pour étudier l'expression de Nox2 grâce à l'anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire de Nox2 (clone 15B12) qui a été développé et validé au laboratoire (Campion et al. 2007). Il existe un décalage vers la droite du pic de fluorescence après marquage des cellules avec l'anticorps anti-Nox2 par rapport au pic obtenu avec le contrôle isotypique, indiquant que Nox2 est exprimée dans la lignée cellulaire EA.Hy926 (Figure 50.A). D'autre part, le marquage obtenu sur les cellules intactes montre que Nox2 est présente, au moins partiellement, au niveau de la membrane plasmique de ces cellules.

Ce résultat est contrôlé par Western blot sur des fractions membranaires des cellules endothéliales EA.Hy926, en utilisant des anticorps monoclonaux développés au laboratoire (Figure 50.B). Ils sont dirigés spécifiquement contre la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire de Nox2 (clone 7A2) et contre la partie cytosolique de p22<sup>phox</sup> (clone 16G7). Les résultats d'immunomarquage révèlent la présence de Nox2 et p22<sup>phox</sup> sous la forme d'une bande respectivement entre 60 et 65 kDa et à 20 kDa.

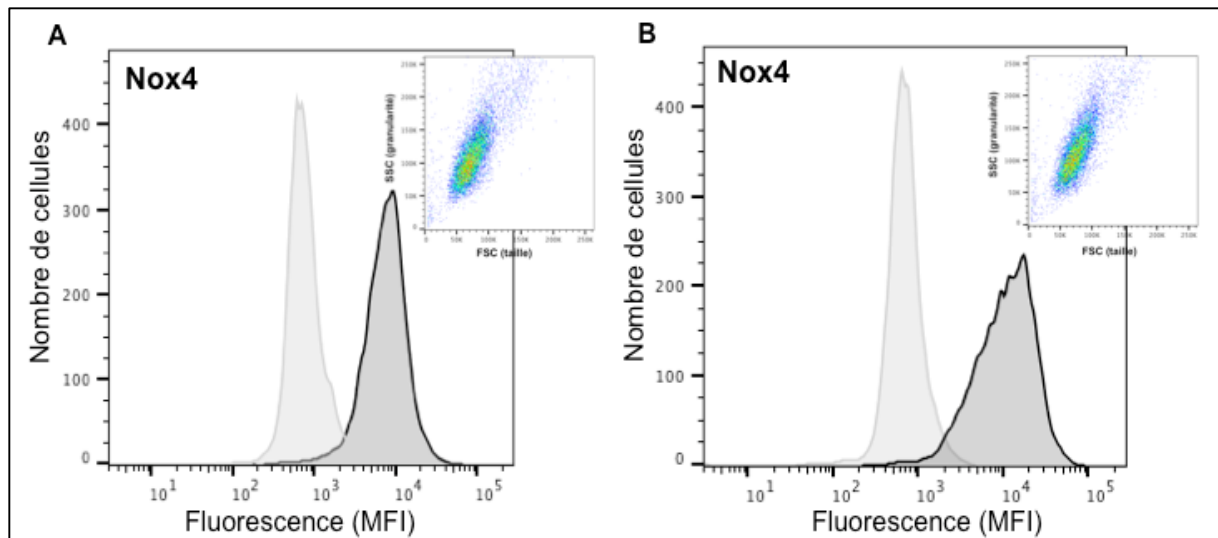


**Figure 50. Mise en évidence de l'expression de Nox2 de la lignée endothéliale EA.hy926. (A) Cytométrie en flux.**  $5 \times 10^6$  cellules/mL de la lignée EA.Hy926 sont incubées avec  $5 \mu\text{g}$  d'anticorps monoclonal de souris anti-Nox2 (clone 15B12). Le marquage est révélé grâce un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor (pic gris foncé). La fluorescence des cellules est analysée par cytométrie en flux et est représentée sous forme d'histogramme. Un contrôle isotypique est utilisé et est représenté en gris clair. Le petit encart indique l'état des cellules et représente la granularité en fonction de la taille des cellules.

**(B) Western-blot** réalisé à partir de fractions membranaires. Un équivalent de cellules ( $1.10^6$ ,  $2.10^6$  et  $5.10^6$  équivalent cellules) membranaires est déposé sur gel SDS-PAGE 11%. Après transfert des protéines sur une membrane, l'anticorps monoclonal anti-Nox2 (clone 7A2, sous classe Ig2, dilution 1:2000) ou anti-p22phox (clone 7G16, dilution 1 :10000) est ajouté. Les protéines sont révélées par chimioluminescence en utilisant le réactif ECL.

### III.2.2 Mise en évidence de l'expression de Nox4

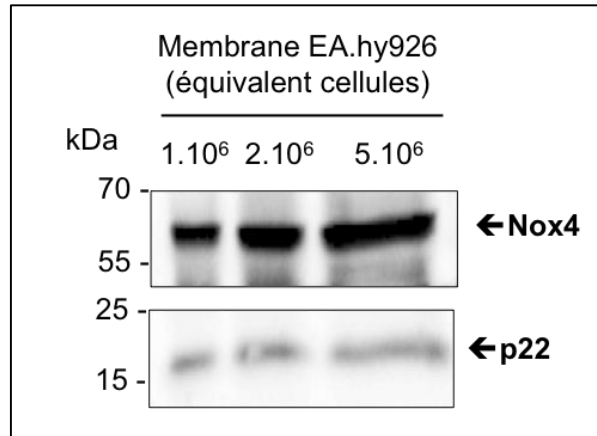
L'expression de Nox4 dans les cellules endothéliales a été analysée, dans un premier temps, par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris 8E9 et 5F9 développés au laboratoire, spécifiques respectivement d'un épitope externe et interne de Nox4 (Zhang et al. 2011) (Figure 51). Des IgG2a de souris aspécifiques sont utilisés comme contrôle négatif pour estimer la spécificité d'interaction (contrôle isotypique).



**Figure 51. Mise en évidence de l'expression de Nox4 de la lignée endothéliale EA.hy926 par cytométrie en flux.**  $5 \times 10^6$  cellules/mL de la lignée EA.Hy926 sont incubées avec 5  $\mu$ g d'anticorps monoclonal de souris Nox4 (clone 5F9, sous classe IgG2a **(A)** et clone 8E9, sous classe IgM **(B)**). Le marquage est révélé grâce un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor. La fluorescence des cellules est analysée par cytométrie en flux et est représentée sous forme d'histogramme. Un contrôle isotypique est utilisé et est représenté en gris clair. Le petit encart indique l'état des cellules et représente la granularité en fonction de la taille des cellules.

Au terme de ces expériences, il existe un décalage vers la droite du pic de fluorescence après marquage des cellules avec les deux anticorps anti-Nox4 par rapport au pic obtenu avec l'anticorps non-spécifique, affirmant que Nox4 est exprimée dans la lignée cellulaire EA.Hy926. D'autre part, le marquage obtenu sur les cellules intactes avec l'anticorps 8E9 dirigé contre un épitope extracellulaire de Nox4 indique que cette Nox est présente, au moins partiellement, au niveau de la membrane plasmique de ces cellules.

Ce résultat est contrôlé par Western blot en utilisant les anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines Nox4 (le clone 8E9) et la protéine p22phox (le clone 16G7). Les résultats d'immunomarquage révèlent la présence de Nox4 et de son partenaire p22<sup>phox</sup> sous la forme d'une bande respectivement entre 60 et 65 kDa et à 20 kDa (Figure 52).



**Figure 52. Mise en évidence de l'expression de Nox4 de la lignée endothéliale EA.hy926 par western-blot.** Expérience réalisée à partir de fractions membranaires. Un équivalent de cellules ( $1.10^6$ ,  $2.10^6$  et  $5.10^6$  équivalent cellules) de ces fractions membranaires est déposé sur gel SDS-PAGE 11%. Après transfert des protéines sur une membrane, l'anticorps monoclonal anti-Nox4 (8E9, sous classe IgM, dilution 1:500) ou anti-p22<sup>phox</sup> (clone 16G7, dilution 1:10000) est ajouté. Les protéines sont révélées par chimioluminescence en utilisant le réactif ECL.

En résumé, en appui avec les expériences de cytométrie en flux et de western blot, nous avons montré que la lignée endothéliale EA.Hy926 exprime naturellement Nox2 et Nox4 ainsi que leur partenaire p22<sup>phox</sup>.

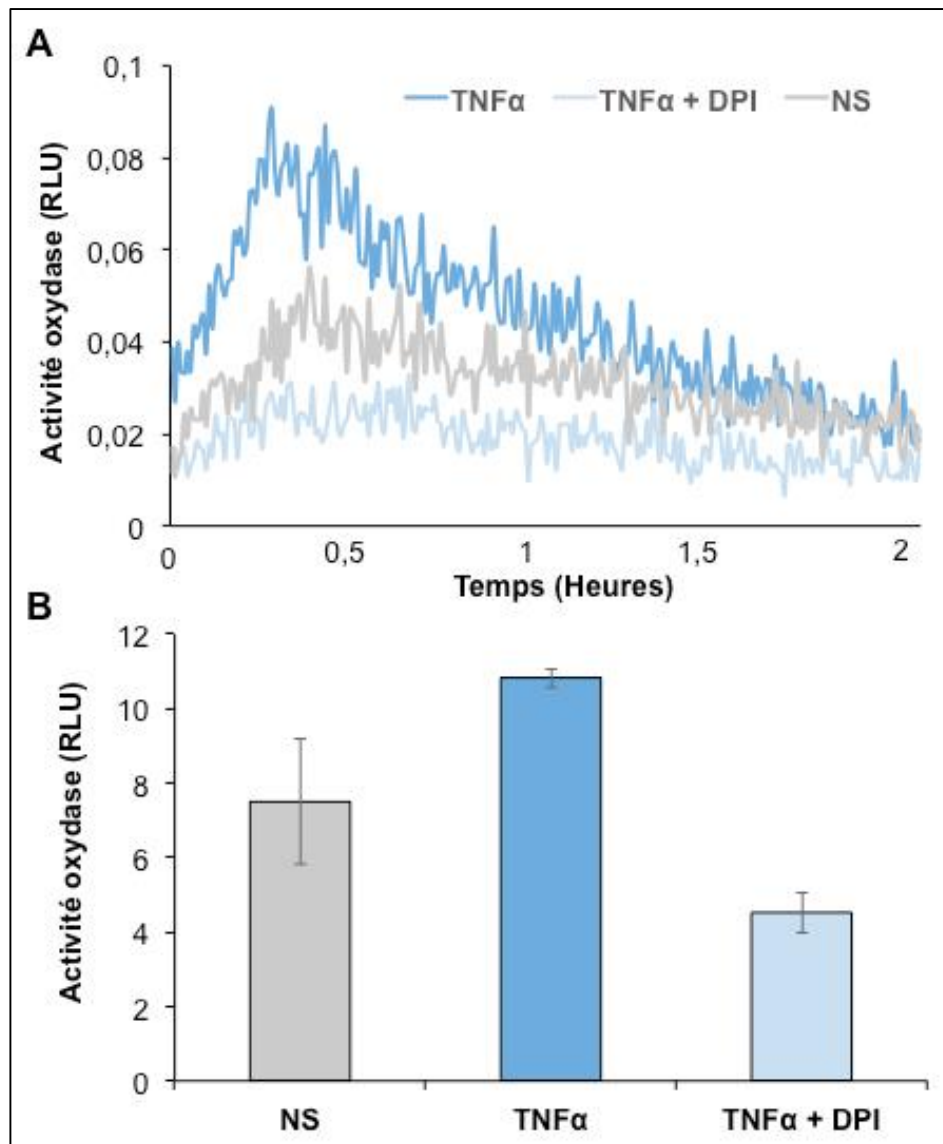
### III.3 Etude de l'activité NADPH oxydase de lignée endothéliale EA.hy926 induite par le TNF $\alpha$

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale EA.hy926. Il a été montré que les cellules endothéliales sont capables de produire des ROS en présence d'une stimulation par le TNF $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire qui est libérée par les neutrophiles quand ceux-ci sont activés (Cassatella et al. 1995)

Nous avons évalué ici la capacité des cellules endothéliales EA.hy926 à produire des ROS après stimulation par le TNF $\alpha$ .

#### III.3.1 Mesure de l'activité NADPH oxydase par chimioluminescence

Après deux heures de stimulation par le TNF $\alpha$ , l'activité NADPH oxydase des cellules EA.hy926 adhérentes est mesurée par chimioluminescence (Figure 53). La spécificité de l'activité NADPH oxydase est contrôlée à l'aide d'un inhibiteur connu, le DPI, qui inhibe spécifiquement les flavoprotéines dont font partie Nox2 et Nox4.



**Figure 53. Activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale EA.hy926 par chimioluminescence**  
Après adhésion de  $5 \times 10^6$  cellules/mL sur une plaque 96 puits, les cellules sont stimulées pendant 2 heures en présence de 20 ng/mL de TNF $\alpha$ . Dans certaines conditions, la spécificité de la production de dérivés oxygénés par la NADPH oxydase est vérifiée en ajoutant 10  $\mu$ M de diphénylèneiodonium (DPI) lors cette incubation. **(A)** Mesure de l'activité NADPH oxydase par le luminol. A la fin de l'incubation, le milieu de culture est enlevé et le milieu réactionnel contenant la horseradish peroxydase (HRP) et du luminol est ajouté (200  $\mu$ l/puits) pour la mesure de chimioluminescence. L'émission de lumière est enregistrée à 37°C pendant 2 heures avec une mesure toutes les 30 secondes **(A)**. Les mesures sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU=Relative Luminescence Unit). **(B)** Les histogrammes représentent l'activité oxydase exprimée en somme de RLU enregistrée sur 2h.

Les résultats de chimioluminescence montrent que :

- Les cellules EA.hy926 non stimulées présentent une activité NADPH oxydase constitutive mais très faible. Cette activité est inhibée par le DPI.
- Après stimulation par le TNF $\alpha$ , l'activité NADPH oxydase des cellules EA.hy926 est augmentée.

Ces résultats suggèrent l'implication des deux Nox dans la production de ROS générée par les cellules EA.hy926 : une production de ROS constitutive et faible liée à l'activité de Nox4 dans les cellules à l'état de repos, et une activité Nox2 stimulable par le TNF $\alpha$ .

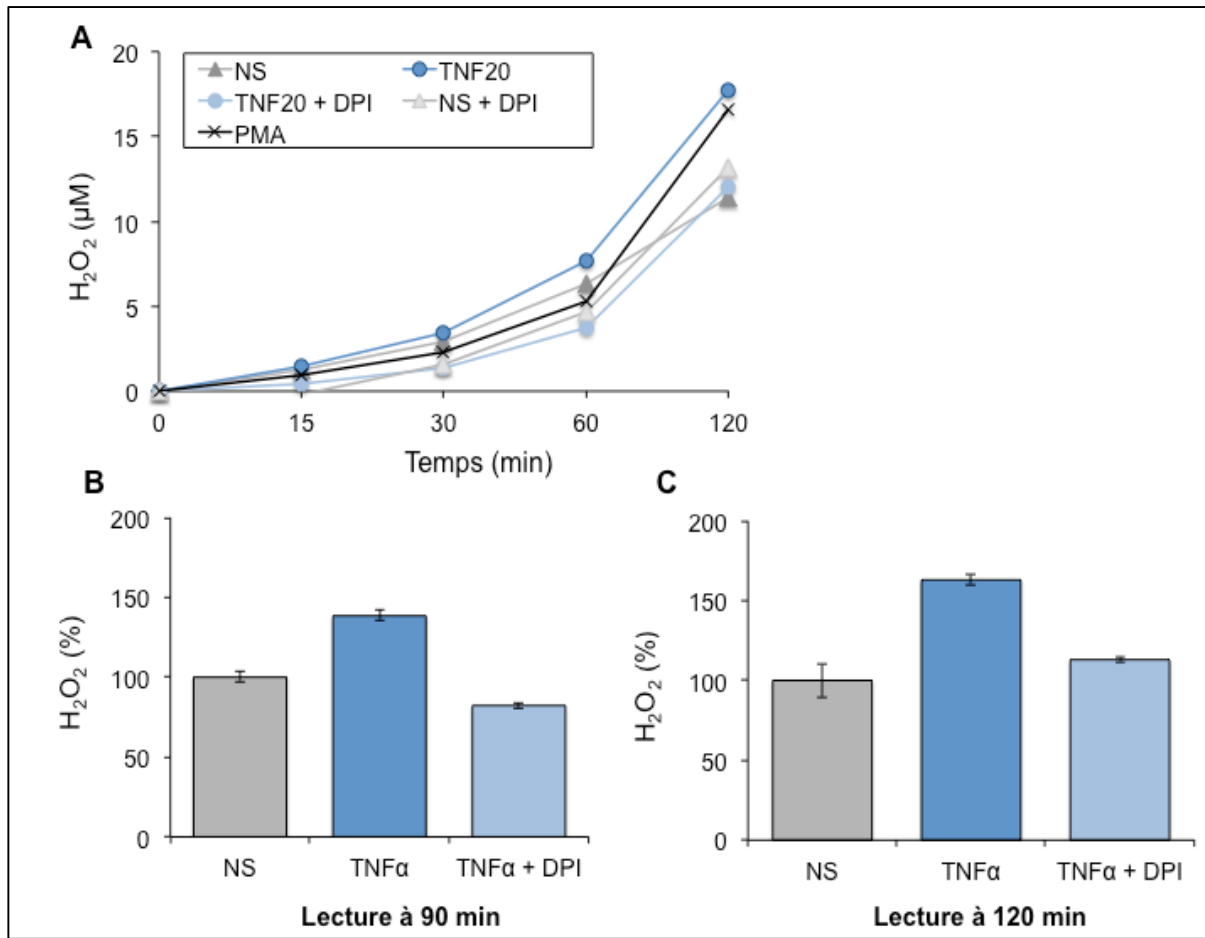
### III.3.2 Mesure de l'activité NADPH oxydase par fluorescence

L'activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale est confirmée par la mesure du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) produit par les cellules EA.hy926 adhérentes par la technique fluorimétrique de détection de l'oxydation de l'Amplex®Red (Figure 54). La mesure est faite sur des cellules au repos ou stimulées par le TNF $\alpha$ , en présence ou non de DPI.

Pendant les 30 premières minutes de lecture, on observe une libération de  $H_2O_2$  qui est comparable entre les cellules endothéliales stimulées par le TNF $\alpha$  et les cellules au repos (Figure 54A). La libération de  $H_2O_2$  par les cellules stimulées par le TNF $\alpha$  augmente par la suite puis cette différence s'accroît et devient très nette après 90 minutes de lecture (Figure 54B et C). En présence de DPI, l'activité oxydase est complètement inhibée. Ces résultats confirment ceux obtenus par chimioluminescence à savoir une production constitutive de ROS par les cellules endothéliales EA.hy926 par Nox4 et une production de ROS par Nox2 en réponse au TNF $\alpha$ .

En outre, la lecture à 90 minutes de la production de  $H_2O_2$  montre que l'activité des cellules endothéliales stimulées par le TNF $\alpha$  et traitées par le DPI est inférieure aux cellules non stimulées. En revanche, celle-ci est plus élevée après 120 minutes de lecture. Le DPI semble perdre son effet inhibiteur vis-à-vis des Nox après un certain temps.





**Figure 54. Activité NADPH oxydase de la lignée endothéliale EA.hy926 par fluorimétrie (Amplex®Red).** Après adhésion de  $5 \times 10^5$  cellules par puits, les cellules sont stimulées pendant 2 heures en présence de 20 ng/mL de TNF $\alpha$  avant lecture de la plaque. Dans certaines conditions, la spécificité de la production de dérivés oxygénés par la NADPH oxydase est vérifiée en ajoutant 10  $\mu$ M de diphénylèneiodonium (DPI) lors cette incubation. La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est mesurée en rajoutant 100  $\mu$ L de milieu réactionnel composé de 50  $\mu$ M de réactif Amplex® Red et de 0,1 U/mL HRP. Les résultats sont exprimés par le cumul des unités de fluorescence relatives (RFU) enregistrés toutes les 30 secondes pendant 2h (A). (B) Les histogrammes représentent l'activité oxydase exprimée en somme du cumul de RFU enregistrée sur 2h.

# **RESULTATS DU SECOND CHAPITRE**

**MECANISMES D'ACTIVATION DES NEUTROPHILES PAR  
LES ANTICORPS ANTI-HLA-A2**

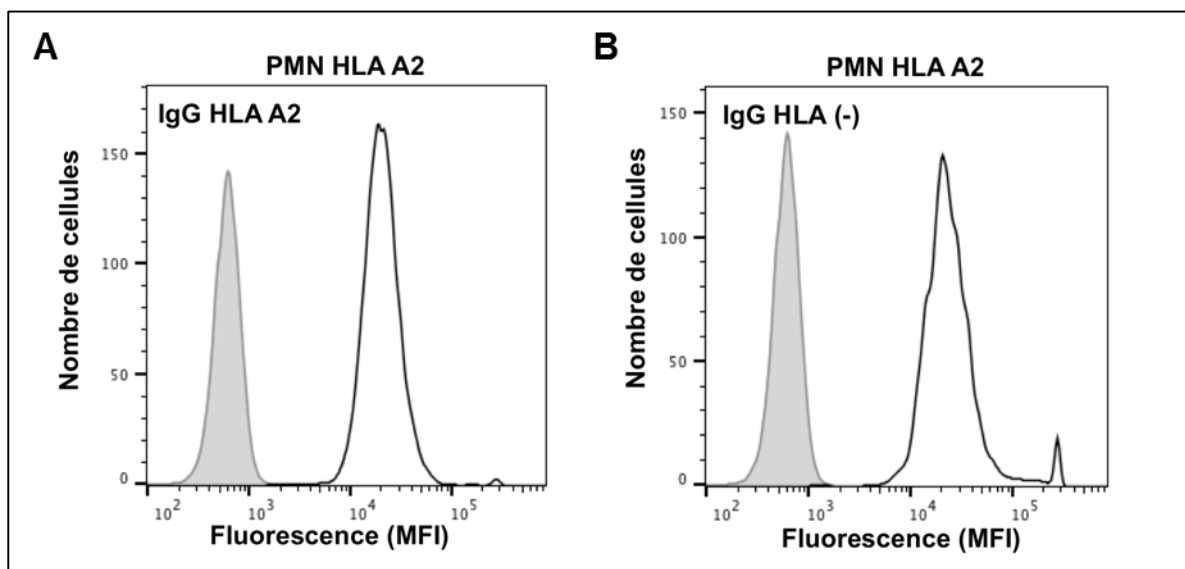


## DEUXIEME CHAPITRE

### MECANISMES D'ACTIVATION DES NEUTROPHILES PAR LES ANTICORPS ANTI-HLA-A2

Dans la première partie du travail, nous avons montré que les IgG HLA-A2 étaient capables d'activer les PMN primés qui exprimaient à leur surface l'antigène HLA-A2. Pour essayer de caractériser les mécanismes d'action de ces IgG HLA-A2, nous avons étudié la fixation des IgG HLA-A2 et HLA (-) sur des PMN HLA-A2 par cytométrie en flux.

Les résultats présentés sur la figure 55 révèlent un décalage vers la droite du pic de fluorescence en présence des IgG HLA-A2 et en présence des IgG HLA (-) indiquant que les deux types d'IgG sont capables de se lier au PMN HLA-A2.



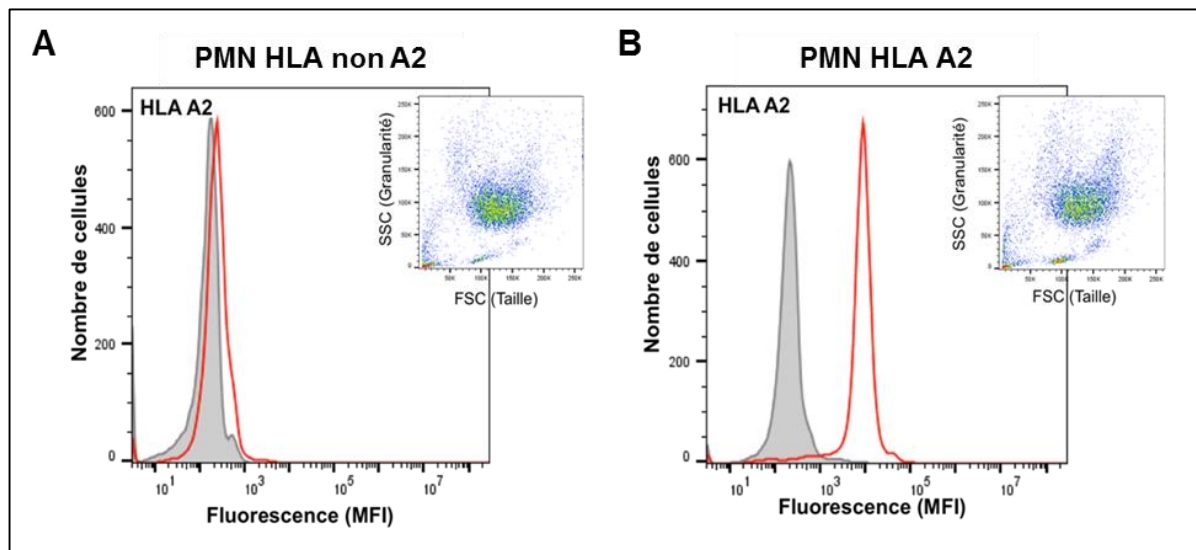
**Figure 55.** Fixation des IgG humaines à la surface des PMN HLA-A2. Les IgG HLA-A2 et HLA (-) sont purifiées sur protéine A à partir de sérums provenant de donneurs. Les PMN HLA-A2 fraîchement isolés ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL) sont incubés avec  $5 \mu\text{g}$  d'IgG HLA-A2 (A) ou HLA(-) (B). La fixation des IgG HLA-A2 et HLA (-) est analysée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor 488 (courbe noire) et comparée au marquage obtenu en présence d'un contrôle isotypique (courbe grise).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux sites potentiels de fixation des IgG sur les PMN HLA-A2.

## I. Analyse des cibles des anticorps anti-HLA sur le neutrophile au repos

### I.1 Les antigènes HLA-A2 des neutrophiles

Pour rappel, le système HLA est un ensemble de gènes qui s'expriment sous la forme d'antigènes à la surface de la plupart des cellules de l'organisme. Le typage ou phénotypage HLA consiste à identifier ces antigènes, caractéristiques de l'individu. Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression de l'antigène HLA-A2 sur les PMN phénotypés HLA-A2. Une expérience de marquage des PMN intacts avec un anticorps monoclonal anti-HLA-A2 (BB7.2) est réalisée. L'analyse par cytométrie en flux montre un décalage vers la droite du pic de fluorescence avec les PMN HLA-A2 indiquant l'expression des antigènes HLA-A2 à leur membrane plasmique (Figure 56.B). Ce décalage n'est pas observé avec les PMN HLA non A2, confirmant l'absence d'expression des antigènes HLA-A2 sur les PMN HLA non A2 (Figure 56.A).



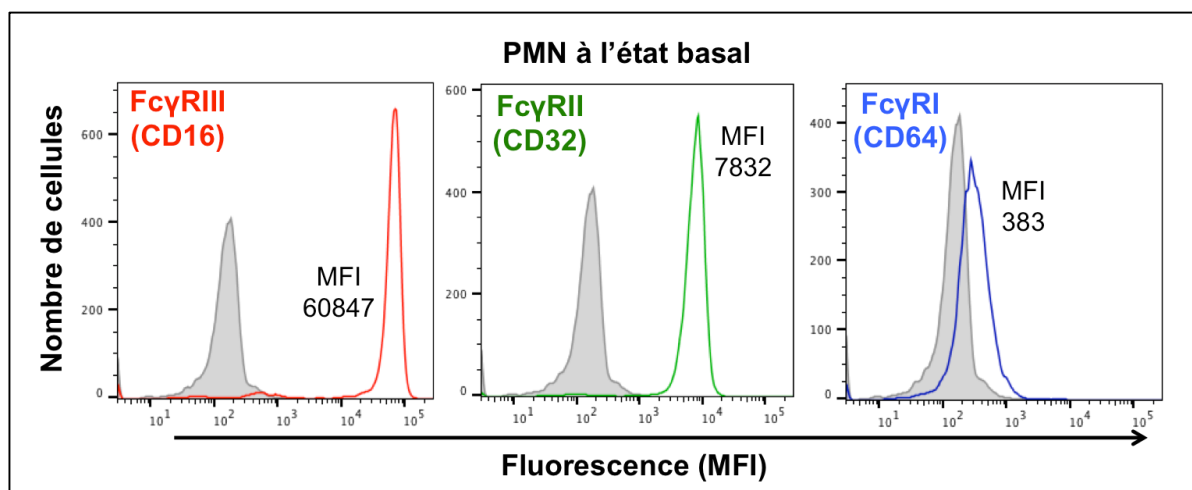
**Figure 56. Expression de l'antigène HLA-A2 à la membrane plasmique des PMN HLA non A2 (A) et des PMN HLA-A2 (B).** Les PMN sont fraîchement isolés sur un gradient de Ficoll. La présence de l'antigène HLA-A2 est analysée par cytométrie en flux après marquage de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL des PMN HLA non A2 (A) ou des PMN HLA-A2 (B) avec l'anticorps monoclonal de souris anti-HLA-A2 (clone BB7.2, sous-classe IgG2b) puis avec un anticorps secondaire de souris couplé à l'Alexa Fluor 488. La courbe grise correspond au marquage des cellules avec l'isotype contrôle IgG2b. La courbe rouge correspond au marquage des cellules avec l'anticorps anti-HLA-A2. Le petit encart indique l'état des cellules et représente la granularité en fonction de la taille des cellules.

Les PMN HLA-A2 expriment bien à leur surface des antigènes HLA-A2 reconnus par les anticorps anti-HLA-A2.

## I.2 Les récepteurs Fc des neutrophiles

Les PMN possèdent à leur surface des récepteurs, les récepteurs Fc $\gamma$ , qui lient spécifiquement les immunoglobulines d'isotype G par leur fragment Fc. Ces récepteurs sont de trois types : les récepteurs Fc $\gamma$ RIII (CD16), Fc $\gamma$ RII (CD32) et Fc $\gamma$ RI (CD64) (Daeron 1997).

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression de ces récepteurs Fc $\gamma$  sur les PMN à l'état de repos, par cytométrie en flux (Figure 57). Il existe un marquage des récepteurs Fc $\gamma$ RIII et Fc $\gamma$ RII mais pas de marquage significatif du récepteur Fc $\gamma$ RI. A l'état basal, les récepteurs Fc $\gamma$ RIII et Fc $\gamma$ RII sont exprimés constitutivement à la membrane plasmique des PMN mais pas le récepteur Fc $\gamma$ RI.



**Figure 57. Expression des récepteurs Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII) à la membrane plasmique des PMN à l'état basal.** Les PMN sont fraîchement isolés par gradient de Ficoll. L'expression des récepteurs Fc est analysée par cytométrie en flux après marquage de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL de PMN par les anticorps monoclonaux de souris (isotype IgG1) anti-Fc $\gamma$ RIII (anti-CD16, clone 5G8), anti-Fc $\gamma$ RII (anti-CD32, clone AT10) et anti-Fc $\gamma$ RI (anti-CD64, clone 10.1) puis par un anticorps secondaire de souris couplé à l'Alexa-Fluor 488. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle IgG1.

En résumé :

Les IgG anti-HLA-A2 peuvent se lier aux PMN HLA-A2 par deux mécanismes :

- le premier est inhérent au phénomène de complémentarité entre le paratope de l'anticorps HLA et l'épitope de l'antigène HLA pour former un complexe antigène-anticorps.
- Le deuxième fait appel aux récepteurs Fc $\gamma$  des neutrophiles qui peuvent fixer toutes les immunoglobulines G.

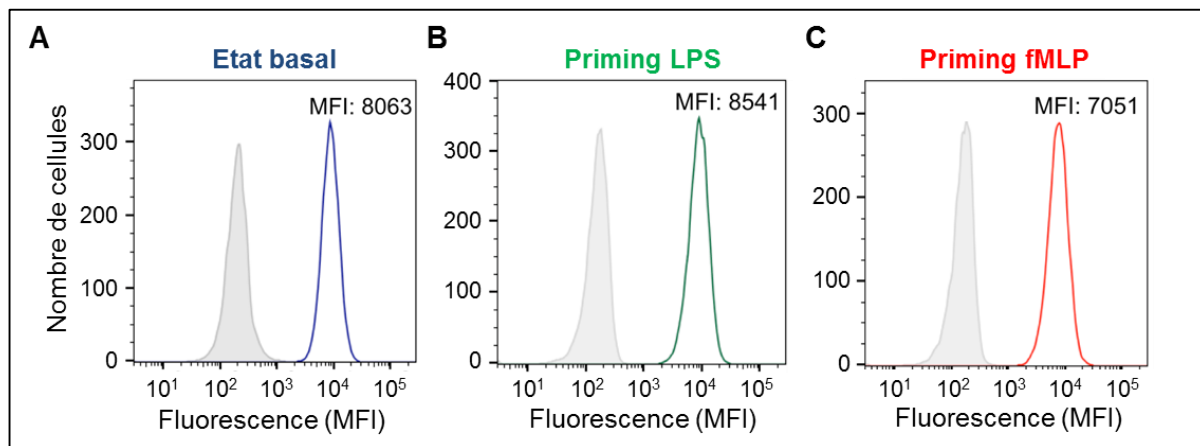
Les IgG HLA (-) ne peuvent interagir avec les PMN que *via* les récepteurs Fc $\gamma$ .

Les résultats obtenus dans la première partie du travail montrent que l'effet des anticorps anti-HLA-A2 devient significativement différent de celui des anticorps HLA (-) quand les PMN sont préalablement « primés ». Pour comprendre cet effet, nous avons ensuite analysé l'impact du « priming » des PMN sur l'expression à leur membrane plasmique de l'antigène HLA-A2, des récepteurs Fc $\gamma$  et de la protéine Nox2 qui est le centre catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire.

## II. Effet du « priming » des PMN sur la fixation des IgG HLA-A2

### II.1 Expression de l'antigène HLA-A2 sur les PMN « primés »

Nous avons évalué par cytométrie en flux le niveau d'expression de l'antigène HLA-A2 sur les PMN HLA-A2 à l'état de repos ou primés avec le LPS ou le fMLP (Figure 58).



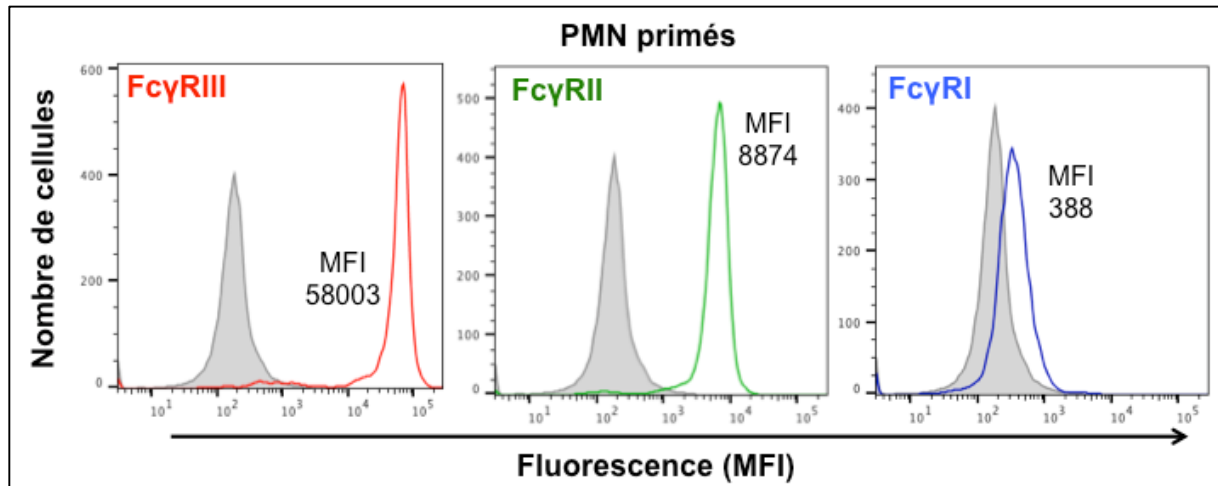
**Figure 58. Expression de l'antigène HLA-A2 à la surface des PMN HLA-A2 en condition de priming.** Les PMN sont fraîchement isolés par gradient de Ficoll. La présence de l'antigène HLA-A2 est mise en évidence par cytométrie en flux après marquage de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL de PMN par l'anticorps monoclonal anti-HLA-A2 (clone BB7.2, sous classe IgG2b) puis par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. Le marquage est réalisé sur des PMN à l'état basal (courbe bleue (A)), primés par le LPS (100ng/mL) à 37°C pendant 60 minutes (courbe verte, (B)) ou par le fMLP (50nM) à 37°C pendant 15 minutes (courbe rouge (C)). La courbe grise correspond au marquage obtenu en présence de l'isotype contrôle IgG2b.

Nous n'observons pas de différence de marquage des PMN avant et après le « priming » des PMN par le LPS (MFI= 8541) ou par le fMLP (MFI=7051) (Figure 58).

L'expression de l'antigène HLA-A2 à la surface des PMN n'est pas modifiée par le « priming ».

## II.2 Expression des récepteurs Fc $\gamma$ sur les PMN « primés »

Nous avons ensuite analysé l'expression des récepteurs Fc $\gamma$  sur les PMN « primés » (Figure 59).



**Figure 59. Expression des récepteurs Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII) à la membrane plasmique des PMN primés.** Les PMN fraîchement isolés sont soit primés par le LPS (100 ng/mL) à 37°C pendant 60 minutes. L'expression des récepteurs Fc $\gamma$  est analysée par cytométrie en flux après marquage de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL de PMN par les anticorps monoclonaux (d'isotype IgG1) anti-Fc $\gamma$ RIII (anti-CD16, clone 5G8), anti-Fc $\gamma$ RII (anti-CD32, clone AT10) et anti-Fc $\gamma$ RI (anti-CD64, clone 10.1) puis par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 488. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle IgG1.

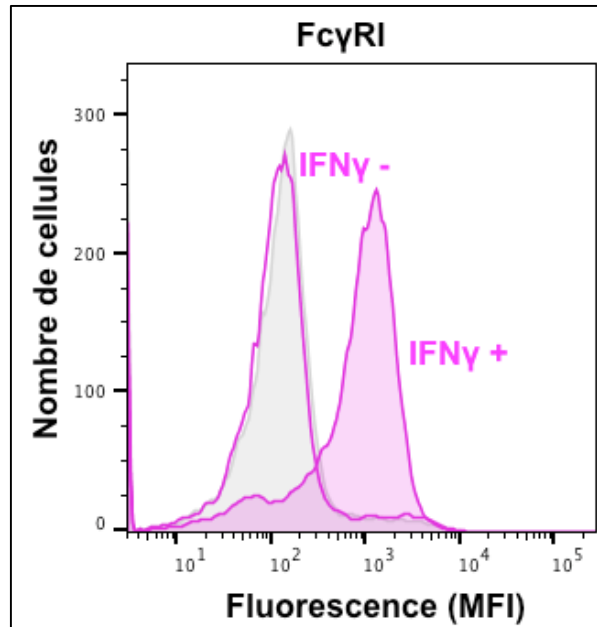
Les résultats de cytométrie en flux n'indiquent pas de différence significative de l'intensité de fluorescence des pics correspondant à l'expression des récepteurs Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII entre les PMN à l'état basal et les PMN « primés » par le LPS (Figure 59). En ce qui concerne le récepteur Fc $\gamma$ RI, la fluorescence du pic de marquage obtenu après priming des PMN n'est pas significativement différente de celle obtenue avec le contrôle isotypique. Ces résultats indiquent que le priming des PMN par le LPS n'entraîne pas de changement dans l'expression des récepteurs Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII, et n'induit pas l'expression du récepteur Fc $\gamma$ RI. De la même manière, le priming des PMN par le fMLP (non montré ici) ne modifie pas l'expression protéique membranaire des récepteurs Fc $\gamma$ .

Ces données sont conformes à ceux de la littérature qui montrent que les PMN expriment constitutivement deux récepteurs Fc $\gamma$  de faible affinité, Fc $\gamma$ RIIa (CD32a) et Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b). D'autre part, il est décrit que le récepteur de haute affinité Fc $\gamma$ RI (CD64) est inductible par l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Buckel et al. 1989).

Pour valider l'absence de marquage du récepteur Fc $\gamma$ RI sur les PMN « primés » et vérifier qu'il n'y avait pas de problème de reconnaissance entre l'anticorps monoclonal utilisé pour le marquage et le récepteur Fc $\gamma$ RI, les PMN ont été traités avec 500U/mL d'IFN $\gamma$  pendant 18



heures à 37°C. L'expression du récepteur FcγRI sur les PMN traités par l'IFNγ a été analysée par cytométrie en flux (Figure 60). Les résultats montrent, après traitement par l'IFNγ, un décalage vers la droite du pic de fluorescence indiquant l'induction de l'expression du récepteur FcγRI, ce qui valide les anticorps utilisés pour le marquage.



**Figure 60. Induction du récepteur FcγRI (CD64) des PMN par l'IFNγ.** Les PMN sont fraîchement isolés par gradient de Ficoll puis sont cultivés en plaque de 24 puits en absence ou en présence de 500U/ml d'IFNγ pendant 18 heures à 37°C. L'expression du récepteur FcγRI est analysée par cytométrie en flux après marquage de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL de PMN par l'anticorps monoclonal anti-FcγRI (anti-CD64, clone 10.1, sous classe IgG1) puis par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 488. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle IgG1.

**En résumé, le « priming » des PMN n'entraîne aucune modification d'expression des récepteurs Fcγ à la surface des PMN.**

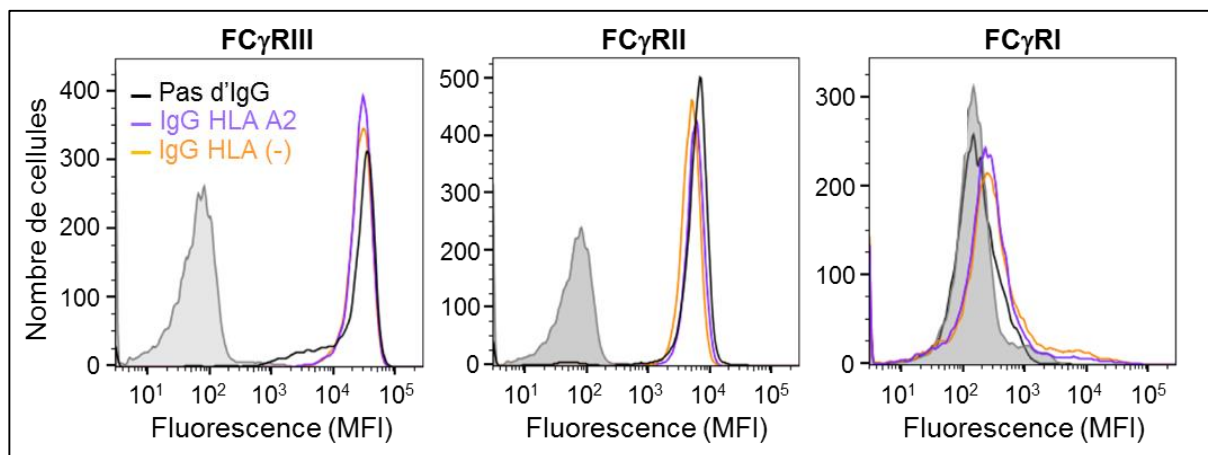
### III. Effet de l'activation des PMN HLA-A2 par les IgG HLA-A2

#### III.1 Expression des récepteurs Fcγ sur les PMN « primés » puis activés par les IgG

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'impact de l'activation des PMN par les IgG (IgG anti-HLA-A2 ou IgG HLA (-)) sur l'expression des récepteurs Fcγ. Cette expérience est réalisée sur des PMN HLA-A2, préalablement « primés » avec le fMLP, puis stimulés avec 200 μg/ml d'IgG HLA-A2 ou IgG HLA (-) puis analysée par cytométrie en flux (Figure 61).

Les histogrammes montrent qu'il n'existe pas de décalage du pic de fluorescence après stimulation par les IgG, que ce soit par les IgG HLA-A2 ou les IgG HLA (-) :

- pour le marquage du récepteur Fc $\gamma$ RIII : la MFI rapportée pour les PMN primés, non stimulés par les IgG est de 26832. Elle reste similaire après stimulation par les IgG (27203 avec les IgG HLA (-) et 28067 avec les IgG HLA-A2).
- pour le marquage du récepteur Fc $\gamma$ RII : la MFI rapportée pour les PMN primés non stimulés par les IgG est de 6900. Elle n'est pas significativement différente après stimulation par les IgG (4991 avec les IgG HLA (-) et 5618 avec les IgG HLA-A2).
- pour le marquage du récepteur Fc $\gamma$ RI : la MFI rapportée pour les PMN primés, non stimulés par les IgG est de 239. Elle est légèrement augmentée en présence des IgG, mais cette augmentation n'est pas différente en présence des IgG HLA(-) (MFI = 347) et IgG HLA-A2 (MFI = 327).



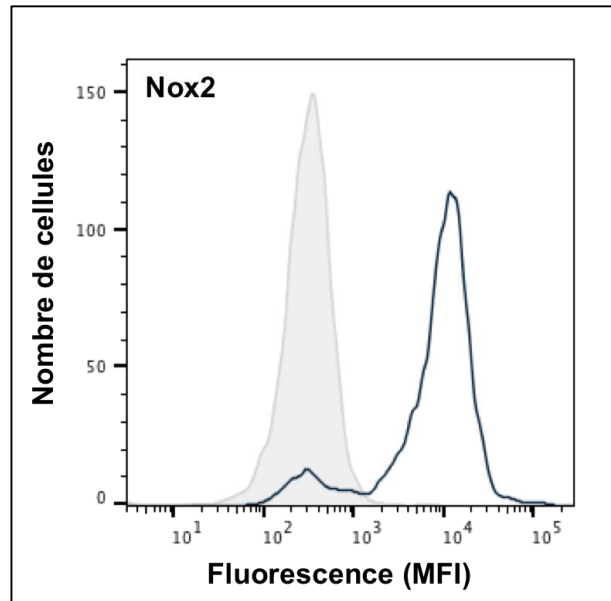
**Figure 61. Expression des récepteurs Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII) à la membrane plasmique des PMN HLA-A2 activés par les IgG.** Les PMN HLA-A2 fraîchement isolés sont préalablement incubés avec le fMLP (50nM) à 37°C pendant 15 minutes. Les PMN ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL) sont ensuite incubés pendant 15 minutes avec 200  $\mu$ g/mL d'IgG HLA (-) ou d'IgG HLA-A2. L'expression des récepteurs Fc $\gamma$  est analysée par cytométrie en flux après marquage avec les anticorps monoclonaux anti-Fc $\gamma$ RI (anti-CD16, clone 5G8), anti-Fc $\gamma$ RII (anti-CD32, clone AT10) et anti-Fc $\gamma$ RI (anti-CD64, clone 10.1) puis avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 488. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle IgG1 des anticorps monoclonaux utilisés.

**L'activation, par les anticorps anti-HLA-A2 des PMN HLA-A2 préalablement « primés », n'entraîne pas de modification de l'expression des récepteurs Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII, ni d'induction de l'expression des récepteurs Fc $\gamma$ RI.**

### III.2 Expression membranaire de Nox2

Nox2 est le centre catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire. Il forme un hétérodimère avec p22<sup>phox</sup>, hétérodimère appelé cytochrome *b*<sub>558</sub>. Son activation nécessite l'assemblage des facteurs cytosoliques activateurs au niveau du cytochrome *b*<sub>558</sub> membranaire.

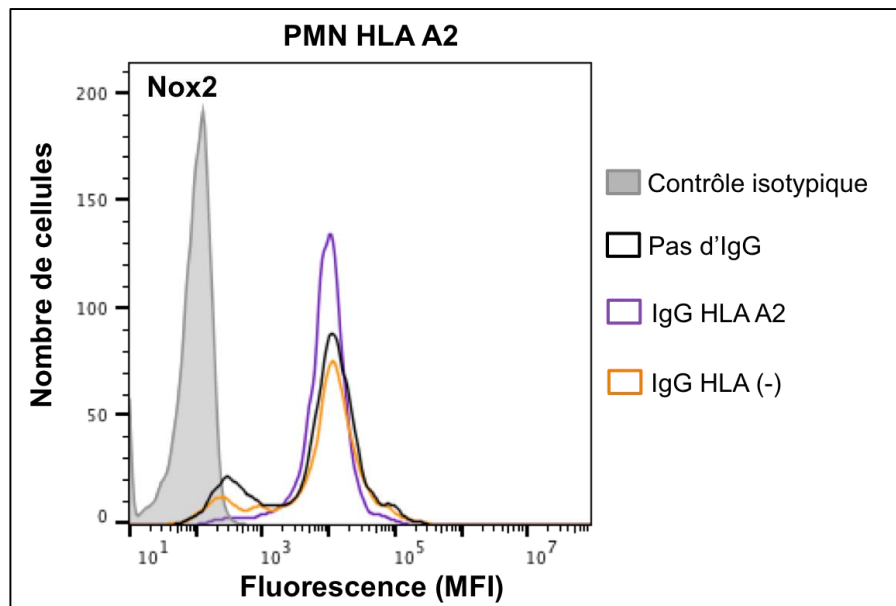
L'analyse par cytométrie en flux permet de confirmer l'expression protéique de Nox2 à la surface des PMN fraîchement isolés à partir de donneurs volontaires sains (Figure 62).



**Figure 62. Expression de Nox2 des neutrophiles.** L'expression de la protéine Nox2 (courbe bleue) est analysée par cytométrie en flux après marquage de  $5 \times 10^6$  cellules/mL de PMN avec l'anticorps monoclonal de souris anti-Nox2 (clone 15B12) puis avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 488. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle IgG2.

L'augmentation d'activité oxydase des PMN HLA-A2, primés puis activés par les IgG pourrait être due à une augmentation de l'expression de la protéine Nox2 à la surface des PMN.

Pour vérifier cette hypothèse, l'expression de Nox2 à la membrane plasmique est analysée sur des PMN HLA-A2 intacts, « primés » par le fMLP puis activés en présence de 200µg/mL d'IgG HLA-A2 ou d'IgG HLA (-) (Figure 63). L'expression de Nox2 à la membrane plasmique des PMN HLA-A2 n'est pas augmentée en présence des IgG (HLA-A2 ou HLA (-)).



**Figure 63. Expression de Nox2 à la membrane plasmique des PMN HLA-A2 activés par les IgG.** Les PMN HLA-A2 fraîchement isolés préalablement « primés » avec le fMLP (50nM) à 37°C pendant 15 minutes. Les PMN « primés » ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL) sont ensuite activés pendant 15 minutes avec 200  $\mu\text{g/mL}$  d'IgG HLA (-) ou d'IgG HLA-A2. L'expression de la protéine Nox2 est analysée par cytométrie en flux après marquage avec l'anticorps monoclonal de souris anti-Nox2 (clone 15B12) puis avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 488. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle IgG2.

L'ensemble des données obtenues dans cette partie montre que les IgG HLA-A2 peuvent se lier à la surface des PMN en interagissant avec les récepteurs Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII. Cette interaction a également lieu en présence des IgG HLA (-) et ne peut pas expliquer à elle seule, la différence d'activité oxydase des PMN HLA-A2 observée avec les IgG HLA-A2. D'autre part, les IgG HLA-A2 peuvent former un complexe avec les antigènes HLA-A2 exprimés à la surface des PMN HLA-A2. Cette interaction est spécifique des IgG HLA-A2 mais n'entraîne pas à elle seule une activation des PMN.

L'hypothèse qui se dessine serait un effet synergique de l'interaction des IgG HLA-A2 avec les antigènes HLA-A2 et avec les récepteurs Fc $\gamma$ . L'implication des radeaux lipidiques dans ce processus a été envisagée.

#### **IV. Impact des radeaux lipidiques sur les mécanismes d'activation des PMN**

Les radeaux lipidiques ou « rafts » lipidiques sont caractérisés par des zones de la membrane enrichies en certaines espèces lipidiques, notamment en cholestérol. Ces rafts lipidiques sont connus pour potentialiser l'activité de la NADPH oxydase et amplifier l'effet des récepteurs Fc $\gamma$  des PMN. Nous avons étudié l'impact de la destruction des radeaux lipidiques sur l'activation de la NADPH oxydase après activation des PMN HLA-A2 avec des IgG HLA-A2.

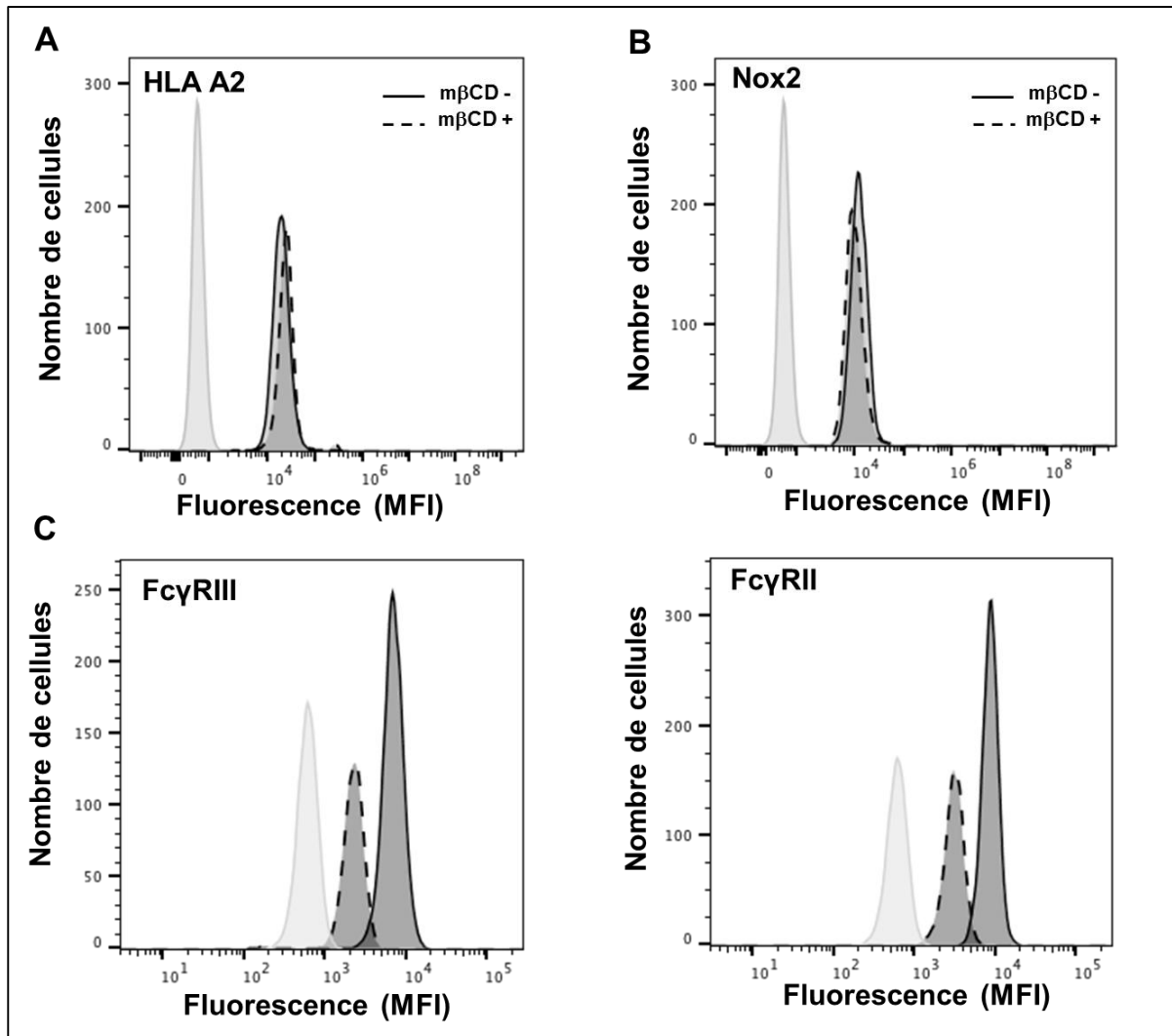
##### **Effet de la déplétion des radeaux lipidiques**

Pour supprimer les radeaux lipidiques, nous avons utilisé un agent chimique, la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (m $\beta$ CD), qui a la propriété de chélater et d'extraire le cholestérol membranaire (Yancey et al, 1996). Au préalable, différentes conditions de traitement des PMN avec la m $\beta$ CD (concentrations, temps d'incubation...) ont été testées (résultats non montrés). Les expériences préliminaires nous ont conduits à fixer la concentration de m $\beta$ CD à 10 mM et le temps d'incubation des PMN à 15 minutes à 37°C.

##### **IV.1 Effet de la déplétion des radeaux lipidiques sur l'expression des récepteurs Fc $\gamma$ , de l'antigène HLA-A2 et Nox2**

Dans un premier temps, nous avons évalué, par cytométrie en flux, l'impact de la suppression des radeaux lipidiques sur l'expression des antigènes HLA-A2 et des récepteurs Fc $\gamma$  des PMN HLA-A2 ainsi que sur l'expression de Nox2.

D'après ces expériences, la déplétion des radeaux lipidiques ne modifie ni l'expression membranaire des sites antigéniques HLA-A2 ni celle de la protéine Nox2 des PMN HLA-A2 (Figure 64A et B).

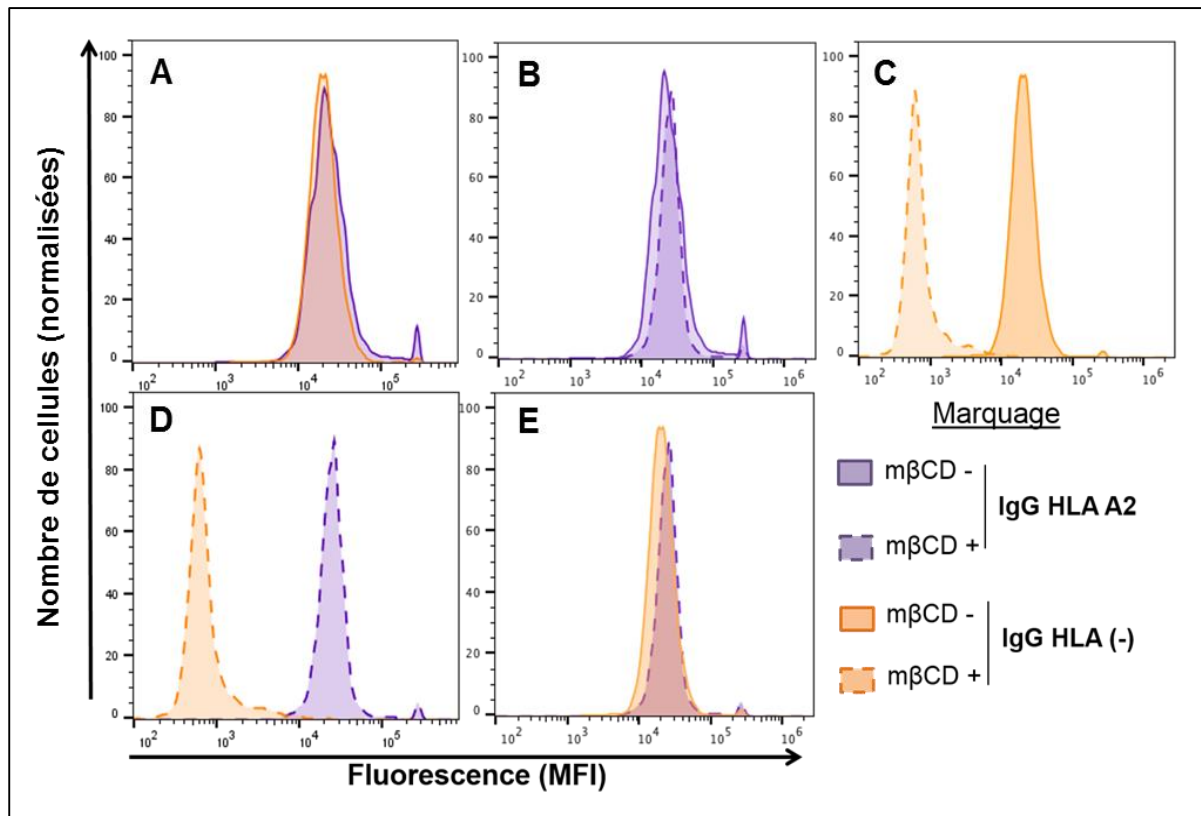


**Figure 64.** Effet de la déplétion des radeaux lipidiques sur l'expression des sites antigéniques HLA-A2, de Nox2 et des récepteurs Fc des PMN HLA-A2. Les PMN fraîchement isolés traités avec 10 mM de mβCD pendant 15 min à 37°C. La présence des antigènes HLA-A2 (A), de Nox2 (B) et des récepteurs FcγRIII et FcγRII (C) est mise en évidence par le marquage de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL de PMN HLA-A2 en présence respectivement de l'anticorps monoclonal anti-HLA-A2 (clone BB7.2), anti-Nox2 (clone 15B12), anti-FcγRIII (anti-CD16, clone 5G8) et anti-FcγRII (anti-CD32, clone AT10) puis d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 488. Le clone BB7.2 reconnaît spécifiquement un épitope du domaine  $\alpha 2$  de la chaîne lourde  $\alpha$  de l'antigène HLA-A2. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle IgG2b (A), IgG2 (B) et IgG1 (C).

En revanche, le traitement des PMN avec la mβCD diminue le signal obtenu pour les récepteurs FcγRIII (MFI rapportée de 6803 sans déplétion du cholestérol contre 2173 après déplétion) et les récepteurs FcγRII (MFI rapportée de 8302 sans déplétion du cholestérol contre 3069 après déplétion) (Figure 64C), suggérant que la déplétion des radeaux lipidiques entraîne une partielle altération de ces récepteurs membranaires.

Nous n'avons pas analysé l'expression du récepteur FcγRI car il n'est pas présent constitutivement à la membrane des neutrophiles à l'état de repos.

Nous avons ensuite vérifié si la diminution du marquage des récepteurs FcγRII et FcγRIII à la surface des PMN traités par la mβCD se traduisait par une altération de la fixation des IgG sur ces cellules. Pour cela, nous avons analysé, par cytométrie en flux, la fixation des IgG HLA (-) et les IgG HLA-A2 sur des PMN HLA-A2 traités ou pas avec la mβCD (Figure 65). La concentration d'IgG utilisée est de 200 µg/mL, concentration pour laquelle les récepteurs sont saturés.



**Figure 65. Effet de la déplétion des radeaux lipidiques sur la fixation des IgG HLA (-) et des IgG HLA-A2 à la surface des PMN HLA-A2.** Les PMN fraîchement isolés sont traités (traits pointillés) ou pas (trait plein) avec 10 mM de mβCD pendant 15 minutes à 37°C. 5.10<sup>6</sup> cellules/mL de PMN HLA-A2 sont ensuite incubés avec 200 µg/ml d'IgG HLA-A2 ou d'IgG HLA (-) pendant 15 minutes dans la glace. La fixation des IgG est ensuite analysée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor 488 et reconnaissant spécifiquement les IgG humaines. Comparaisons du marquage :

(A) des IgG HLA-A2 (violet) et des IgG HLA (-) (orange) sur les PMN non traités avec la mβCD.

(B) des IgG HLA-A2 sur les PMN traités (trait pointillé) ou non (trait plein) avec la mβCD.

(C) des IgG HLA (-) sur les PMN traités (trait pointillé) ou non (trait plein) avec la mβCD.

(D) des IgG HLA-A2 et des IgG HLA (-) sur les PMN traités avec la mβCD

(E) des IgG HLA-A2 sur les PMN traités (trait pointillé) avec la mβCD et des IgG HLA (-) sur les PMN non traités (trait plein).

A concentration égale, les IgG HLA (-) se fixent autant que les IgG HLA-A2 à la membrane des PMN HLA-A2 (Figure 65.A). D'autre part, bien que l'expression des récepteurs FcγRIII et FcγRII soit diminuée après déplétion des radeaux lipidiques, la fixation des IgG HLA-A2 sur les PMN est similaire avec ou sans traitement par la mβCD (figure 65.B).



Concernant la fixation des IgG HLA (-) sur les PMN HLA-A2, elle est en revanche très diminuée après traitement par le m $\beta$ CD (Figure 65. C). Ces résultats indiquent que les radeaux lipidiques jouent un rôle important dans la fixation des IgG au niveau des récepteurs Fc $\gamma$  des PMN. Par contre, ils ne semblent pas impliqués dans l'interaction des IgG HLA-A2 avec l'antigène A2.

En résumé, nous avons montré précédemment que les IgG HLA (-) se lient aux PMN par les récepteurs Fc $\gamma$  alors que les IgG HLA-A2 possèdent une liaison supplémentaire *via* les sites antigéniques HLA-A2 des PMN HLA-A2. Les résultats de la figure 65 permettent de dire que, malgré cette liaison supplémentaire, le nombre d'IgG HLA-A2 fixé à la membrane des PMN HLA-A2 n'est pas augmenté mais que les IgG HLA-A2 sont capables de se fixer doublement : *via* leur fragment Fc $\gamma$  sur les récepteurs Fc $\gamma$  des neutrophiles d'une part et d'autre part, *via* leur fragment F'ab avec l'antigène HLA-A2 soit du même PMN soit d'un autre PMN.

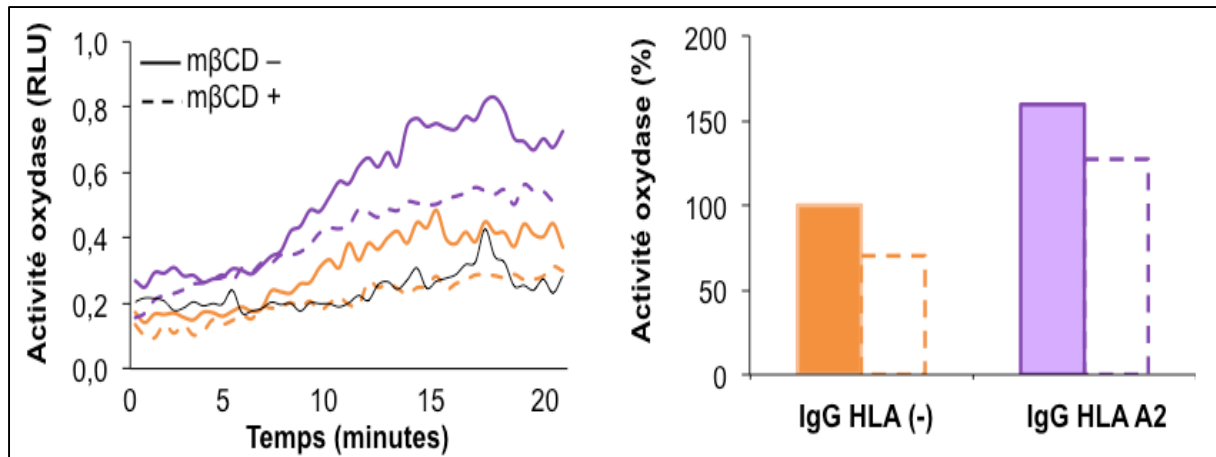
**Au terme de cette analyse, nous pouvons affirmer que la déplétion des rafts lipidiques a un impact direct sur la fixation des IgG sur les PMN HLA-A2.**

## IV.2 Effet sur l'activité NADPH oxydase

Etant donné que la déplétion des radeaux lipidiques a un impact sur la fixation des IgG sur les PMN, nous avons mesuré l'activité NADPH oxydase des PMN HLA-A2 « primés » par le fMLP après déplétion du cholestérol par le m $\beta$ CD, en présence des 2 types d'IgG (IgG HLA (-) ou IgG HLA-A2). L'activité NADPH oxydase est déterminée par chimioluminescence par la mesure des ROS produits et est exprimée en unités relatives de fluorescence (RLU) (Figure 66).

Comme nous l'avons précédemment démontré, la production des ROS par les PMN HLA-A2 sensibilisés est plus élevée en présence d'IgG HLA-A2 que d'IgG HLA (-). La cinétique est similaire avec les deux types d'IgG avec un pic d'activité après 15 minutes (Figure 66.A). Comme précédemment, on voit que l'activité oxydase en présence d'IgG HLA-A2 est plus élevée (1,5 fois) que celle en présence d'IgG HLA (-) (Figure 66B).





**Figure 66. Effet de la déplétion des radeaux lipidiques sur l'activation des PMN HLA-A2.** Les PMN fraîchement isolés sont stimulés par le fMLP (50 nM) à 37°C pendant 15 minutes. Ils sont ensuite incubés (traits pointillés) ou pas (traits pleins) avec 10 mM de mβCD à 37°C pendant 15 minutes. L'activité oxydase est évaluée par la libération de ROS produits mesurée par chimioluminescence en présence de luminol, après stimulation par 200 µg/mL d'IgG HLA (-) (orange) ou des IgG HLA-A2 (violet) ou par du PBS (gris) à T=0. **(A)** Cinétique de production des ROS dans les PMN stimulés. **(B)** Histogrammes présentant la quantité de ROS produits après activation des PMN par les IgG, en pourcentage de l'activité des cellules activées par les IgG HLA (-).

Lorsque les cellules sont traitées par la mβCD à 10 mM, l'activité NADPH oxydase des PMN HLA-A2 activés par les IgG est diminuée, quelle que soit la nature des IgG (HLA-A2 ou non) :

- En présence des IgG HLA (-), l'activité oxydase des PMN traités par la mβCD devient comparable à celle des PMN primés non-stimulés (PBS), indiquant une altération importante de la signalisation par les récepteurs Fcγ lorsque les radeaux lipidiques sont déplétés. Ces résultats sont cohérents avec la diminution du marquage des récepteurs Fcγ observés par cytométrie en flux après traitement des cellules par la mβCD (Figure 64).
- En revanche, en présence des IgG HLA-A2, l'activité oxydase des PMN traités par la mβCD, même si elle est diminuée, n'est pas complètement abolie, suggérant que la fixation des IgG HLA-A2 sur leurs sites antigéniques à la surface des PMN HLA-A2 peut maintenir une activation partielle des récepteurs Fcγ même lorsque les radeaux lipidiques sont détruits.

Evaluer l'activité oxydase des PMN traités par la mβCD puis stimulés par les IgG permet finalement de comparer l'activation isolée des récepteurs Fcγ, avec l'activation des récepteurs Fcγ combinée à l'interaction des IgG HLA-A2 avec l'antigène HLA-A2 exprimé à la surface des PMN.

Ces expériences montrent ainsi que l'activation des PMN HLA-A2 est plus importante quand les IgG peuvent se lier aux sites antigéniques HLA-A2 en plus de la fixation aux récepteurs Fcγ. D'autre part, l'interaction antigène-anticorps semble préserver une activation, partielle,

des récepteurs Fc $\gamma$  en l'absence de radeaux lipidiques, suggérant un couplage de l'interaction antigène-anticorps avec l'activation des récepteurs Fc $\gamma$  par les IgG HLA-A2.

Pour résumer :

- L'effet seul de la fixation des IgG avec les récepteurs Fc $\gamma$  a été analysé en utilisant des IgG HLA (-).
- L'effet seul de la fixation des IgG HLA par leur reconnaissance des déterminants antigéniques HLA des PMN a été analysé en déplaçant les radeaux lipidiques membranaires.

Lorsque l'un ou l'autre des mécanismes de fixation des IgG HLA-A2 est absent (ou inhibé), on observe une diminution de l'activité NADPH oxydase des PMN HLA-A2.

## V. Etude de l'activation de la NADPH oxydase en présence d'anticorps monoclonaux anti-HLA purifiés

Dans les expériences réalisées jusqu'alors, nous avons utilisé des IgG HLA-A2 purifiées sur protéine A Sepharose à partir de sérums de patients. La purification des IgG HLA-A2 par chromatographie d'affinité sur protéine A permet d'extraire toutes les IgG des échantillons : les IgG anti-HLA-A2 présentes mais également les autres types d'IgG. A l'heure actuelle, nous n'avons pas à disposition de méthode quantitative pour déterminer précisément la proportion de ces anticorps anti-HLA par rapport aux IgG totales purifiées.

Pour contourner ce problème et nous permettre de quantifier l'impact des anticorps anti-HLA dans le processus d'activation des PMN HLA, nous avons utilisé deux types d'anticorps monoclonaux murins anti-HLA commerciaux :

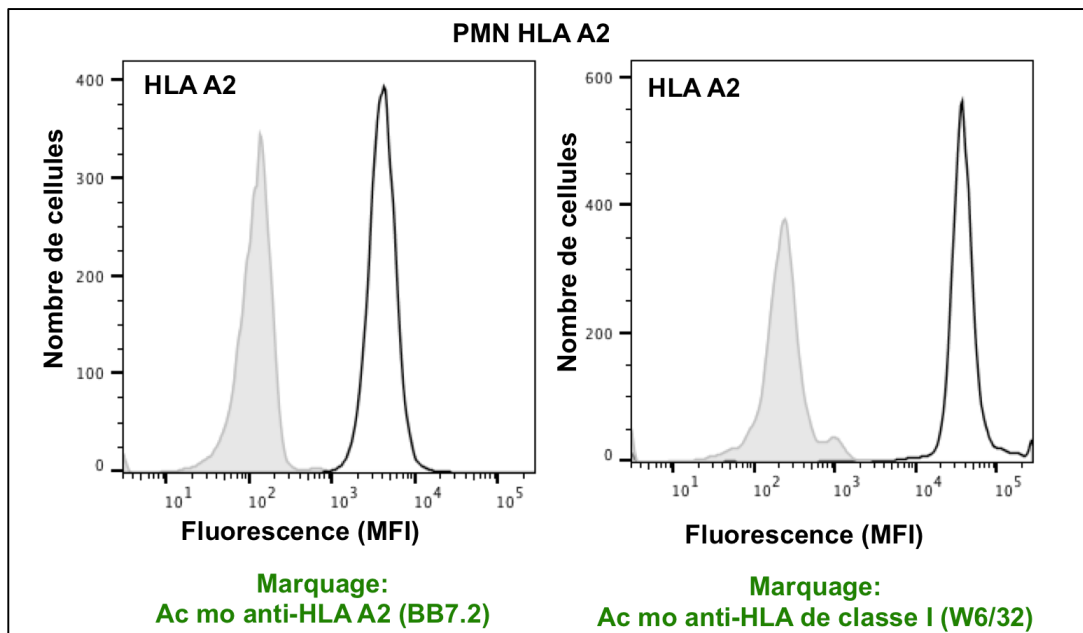
- L'anticorps monoclonal BB7.2 dirigé contre un épitope du domaine  $\alpha 2$  de la chaîne lourde  $\alpha$  de la molécule HLA-A2 humaine
- L'anticorps monoclonal W6/32 dirigé contre un épitope commun à toutes les molécules HLA de classe I (locus A, B et C).

L'objectif de ce travail consiste à :

- Etudier l'impact seul de la liaison des IgG HLA-A2 sur les sites antigéniques HLA-A2 des PMN HLA
- Etudier l'effet dose-réponse des anticorps anti-HLA-A2 sur l'activation des PMN HLA-A2

## V.1 Validation des deux anticorps monoclonaux

Dans un premier temps, nous avons validé par cytométrie en flux que ces deux anticorps monoclonaux reconnaissent bien les sites antigéniques HLA-A2 des PMN HLA-A2. Les résultats montrent un pic de fluorescence décalé vers la droite en présence de l'anticorps monoclonal BB7.2 ou W6/32 indiquant une bonne reconnaissance des sites antigéniques HLA-A2 par ces deux anticorps (Figure 67).



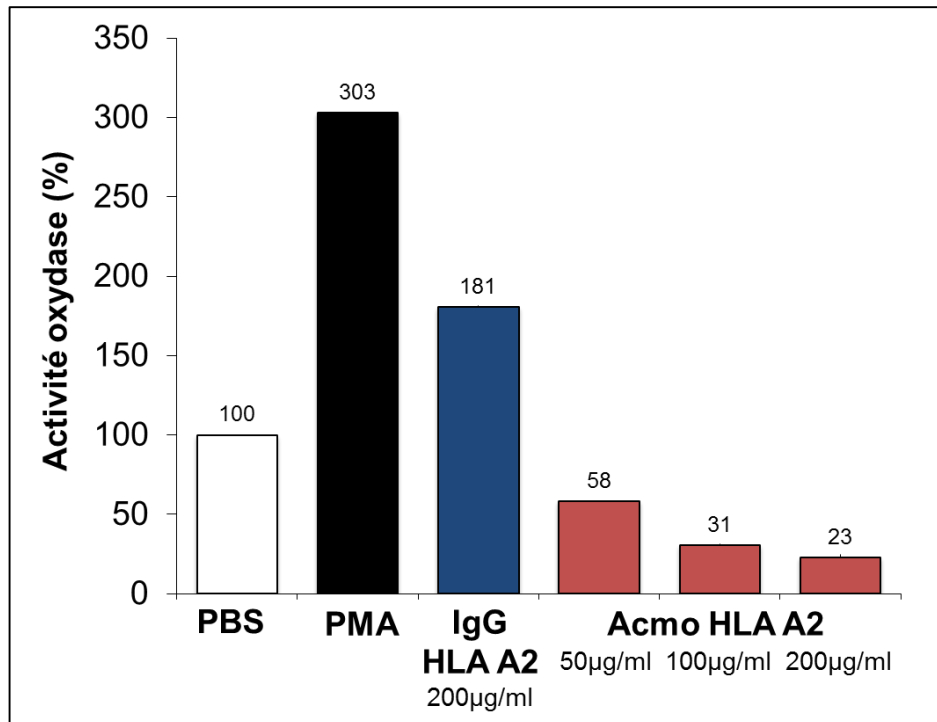
**Figure 67. Expression de l'antigène HLA-A2 à la membrane plasmique des PMN HLA-A2.** Les PMN fraîchement isolés par gradient de Ficoll ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL) sont marqués avec l'anticorps monoclonal anti-HLA-A2 (clone BB7.2) (A) ou l'anticorps monoclonal anti-CMH de classe I (clone W6/32) puis avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. Le clone BB7.2 reconnaît spécifiquement un épitope du domaine  $\alpha 2$  de la chaîne lourde  $\alpha$  de l'antigène HLA-A2. Le clone W6/32 reconnaît spécifiquement un épitope commun de toutes les molécules HLA de classe I. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle IgG2b (A) ou IgG2a (B).

## V.2 Effet des anticorps monoclonaux anti-HLA sur l'activation des PMN HLA-A2

### V.2.1 Effet de l'anticorps monoclonal murin anti-HLA-A2

Pour déterminer la quantité d'anticorps, dirigés spécifiquement contre l'antigène HLA-A2, nécessaire pour stimuler les PMN HLA-A2, nous avons stimulé des PMN HLA-A2, préalablement primés par le fMLP, avec des concentrations croissantes (50, 100 et 200  $\mu\text{g/ml}$ ) de l'anticorps monoclonal anti-HLA-A2 (clone BB7.2). Les PMN sont également stimulés par les IgG HLA-A2 humaines purifiées à la concentration de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Cette étude indique une absence d'activation de la NADPH oxydase en présence des anticorps monoclonaux murins anti-HLA-A2, voir même une inhibition qui est proportionnelle à la quantité d'anticorps

monoclonaux ajoutés, alors que les IgG HLA-A2 humaines purifiées entraînent bien une augmentation de l'activité oxydase des PMN primés (Figure 68).



**Figure 68. Comparaison de l'activité oxydase des PMN HLA-A2 après stimulation par les IgG HLA-A2 humaines et l'anticorps monoclonal anti-HLA-A2 (clone BB7.2).** Les PMN ( $4 \cdot 10^6$  cellules/ml) ont été au préalable « primés » par le fMLP à 50nM pendant 15 minutes à 37°C. L'activité oxydase est évaluée par la libération de ROS produits mesurée pendant 1h30 par chimioluminescence en présence de luminol. La lecture (T=0) commence après la stimulation des PMN avec 200 µg/ml d'IgG HLA-A2 ou par l'anticorps monoclonal de souris anti-HLA-A2 (clone BB7.2, sous-classe IgG2b) aux concentrations de 50, 100 ou 200 µg/ml. La stimulation des PMN par le PMA (80 ng/mL) est utilisée comme témoin positif. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

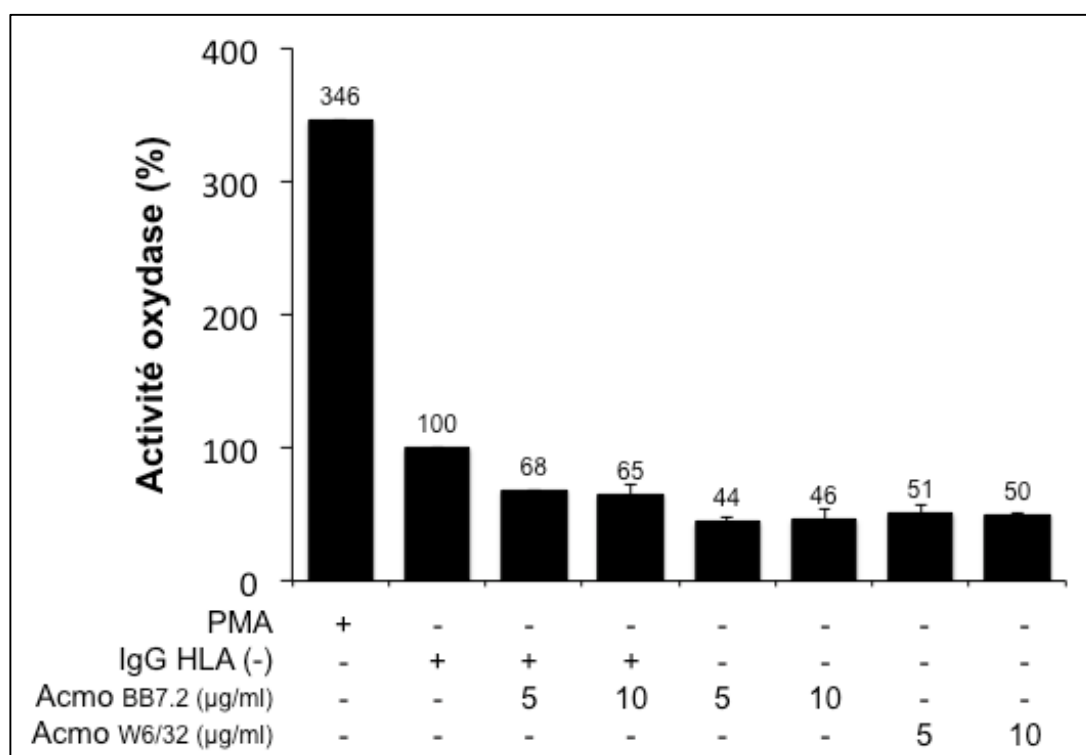
Cette inhibition de l'activité oxydase pourrait s'expliquer par un phénomène de zone dû à un excès d'anticorps. La compétition par les anticorps pour occuper tous les sites antigéniques peut conduire à la saturation des sites et empêchent la réaction d'agglutination. La dilution de ces anticorps monoclonaux est donc envisagée.

Une autre explication possible pourrait être l'origine des IgG monoclonaux (anticorps murins, isotype des anticorps utilisés) et la concentration utilisée.

## V.2.2 Effet de la combinaison des IgG HLA (-) humaines avec les anticorps monoclonaux murins anti-HLA

Pour essayer de se rapprocher des concentrations d'IgG HLA-A2 présentes dans le mélange d'IgG purifiées humaines, de nouvelles expériences ont été réalisées dans lesquelles les PMN HLA-A2 sont stimulés avec un mélange d'IgG HLA (-) humaines (200 µg/mL) et de faibles concentrations d'IgG murines monoclonales anti-HLA-A2 (5 à 10 µg/mL) pour mimer ce qui se passe lors de la transfusion (Figure 69).

La stimulation des PMN HLA-A2 primés, avec le mélange d'anticorps (200 µg/ml d'IgG HLA (-) additionné de 5 µg/ml ou de 10 µg/ml de l'anticorps monoclonal murin anti-HLA-A2 (BB7.2) entraîne une diminution de l'activité NADPH oxydase d'environ 30% par rapport à la stimulation obtenue en présence des IgG HLA (-). Cet effet est également visible sur les PMN HLA-A2 stimulés avec seulement les anticorps monoclonaux murins (clone BB7.2) à faibles concentrations (5 ou 10 µg/ml). L'inhibition de l'activité NADPH oxydase ne peut pas s'expliquer par un effet de zone.

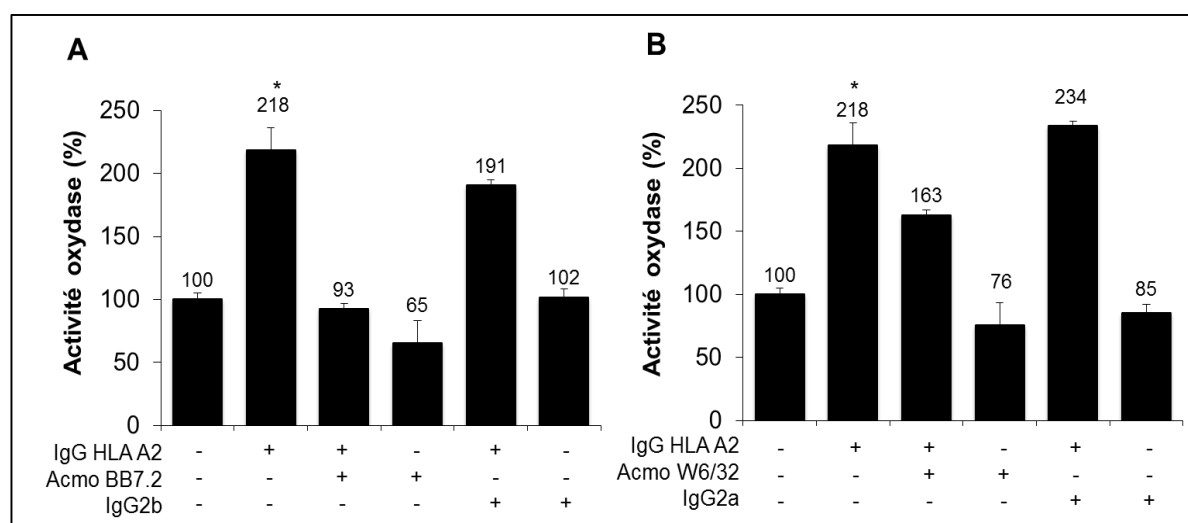


**Figure 69. Activité NADPH oxydase des PMN HLA-A2 primés par le fMLP, après stimulation par les anticorps monoclonaux murins anti-HLA (BB7.2 et W6/32).** Les PMN ( $4 \cdot 10^6$  cellules/ml) sont « primés » par le fMLP à 50nM pendant 15 minutes à 37°C puis stimulés par 200 µg/ml d'IgG HLA (-) humaines purifiées, ou par un mélange d'anticorps (200 µg/ml d'IgG HLA (-) et/ou 5µg/ml ou 10µg/ml de l'anticorps monoclonal murin anti-HLA-A2 (clone BB7.2) ou anti-CMH de classe I (clone W6/32). L'activité oxydase est évaluée par la libération de ROS produits mesurée pendant 1h30 par chimioluminescence en présence de luminol. La stimulation des PMN par le PMA (130 nM) est utilisée comme témoin positif. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

Pour savoir si cet effet inhibiteur est spécifique à l'anticorps monoclonal utilisé, nous avons étudié l'effet d'un autre anticorps monoclonal murin anti-HLA de classe I qui reconnaît spécifiquement un épitope commun à toutes les molécules HLA de classe I. Le même effet inhibiteur est observé avec les anticorps monoclonaux murins anti-HLA (clone W6/32), même avec de faibles concentrations d'IgG (5 ou 10 µg/mL) (Figure 69).

La sous-classe de l'anticorps monoclonal HLA-A2 (BB7.2) est l'IgG2b tandis que l'anticorps monoclonal HLA de classe I (W6/32) correspond à la sous-classe IgG2a. Pour comprendre cet effet inhibiteur, nous avons évalué l'activité oxydase des PMN HLA-A2 « primés » par le fMLP après stimulation avec des IgG contrôles d'isotype IgG2b (isotype de l'anticorps monoclonal HLA-A2, BB7.2) et des IgG contrôles d'isotype IgG2a (isotype de l'anticorps monoclonal HLA de classe I, W6/32).

D'après ces expériences, l'addition d'IgG murines non spécifiques, d'isotype IgG2a ou IgG2b, n'a pas d'impact sur l'activité NADPH oxydase des PMN « primés », confirmant que l'effet des anticorps monoclonaux murins anti-HLA est lié à la formation du complexe antigène-anticorps à la surface des PMN (Figure 70).



**Figure 70. Activité oxydase des PMN HLA-A2 primés par le fMLP, après stimulation par les IgG HLA-A2 ou les anticorps monoclonaux (BB7.2 et W6/32).** Les PMN ( $4 \cdot 10^6$  cellules/ml) préalablement primés par le fMLP à 50nM pendant 15 minutes à 37°C sont stimulés avec un mélange d'anticorps (200 µg/ml IgG HLA-A2 et/ou 5 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-HLA-A2 (clone BB7.2) ou l'anticorps monoclonal anti-CMH de classe I (clone W6/32), et/ou un contrôle isotypique IgG2b ou IgG2a. L'activité oxydase est évaluée par la libération de ROS produits mesurée pendant 1h30 par chimioluminescence en présence de luminol. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes

### V.2.3 Effet de la combinaison des IgG HLA-A2 humaines avec les anticorps monoclonaux murins anti-HLA

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'effet des anticorps monoclonaux murins anti-HLA sur l'activité NADPH oxydase des PMN « primés » et stimulés par les IgG HLA-A2 humaines (Figure 70).

Comme démontré précédemment, les IgG HLA-A2 humaines seules induisent une activation des PMN HLA-A2 primés par le fMLP (218% vs 100%).

La stimulation des PMN par un mélange d'IgG HLA-A2 humaines et d'anticorps monoclonaux murins anti-HLA-A2 (BB7.2) (5µg/ml) se traduit par une complète inhibition de l'effet des IgG HLA-A2 humaines sur l'activité oxydase des PMN HLA-A2 « primés » (98% du contrôle vs 218% en présence des IgG HLA-A2 humaines) (Figure 70.A). L'addition d'IgG murines contrôles d'isotype IgG2b aux IgG HLA-A2 humaines n'a en revanche aucun impact sur l'activation des PMN (191% vs 218%,  $p>0,05$ ).

Des résultats similaires sont obtenus avec l'anticorps monoclonal murin anti-HLA classe I W6/32 (Figure 70.B) : la stimulation des PMN par un mélange d'IgG HLA-A2 humaines et d'anticorps monoclonaux murins anti-HLA-A2 (W6/32) (0.5 µg) se traduit également par une inhibition de l'effet des IgG HLA-A2 humaines sur l'activité oxydase des PMN HLA-A2 même si l'effet semble moins important qu'avec l'anticorps BB7.2 (165% vs 218%) (Figure 70.A). L'addition d'IgG murines contrôles d'isotype IgG2a aux IgG HLA-A2 humaines n'a en revanche aucun impact sur l'activation des PMN (234% vs 218%,  $p>0,05$ ) (Figure 70.B).

Dans cette partie, nous n'avons pas pu étudier l'effet seuil des anticorps anti-HLA-A2 dans l'activation des PMN HLA-A2. Nous n'avons pas pu utiliser des anticorps anti-HLA monoclonaux murins pour quantifier l'effet activateur des IgG HLA-A2 humaines sur les PMN HLA-A2 car ces anticorps monoclonaux murins ont un effet inhibiteur sur l'activité NADPH oxydase des PMN HLA-A2. Une explication possible est l'origine murine de ces anticorps monoclonaux. Ces anticorps murins n'interagissent pas (ou très peu) avec les récepteurs Fcγ. Ils ne peuvent interagir avec les PMN HLA-A2 que *via* les antigènes HLA-A2 (complexe antigène – anticorps). La formation de ce type de complexes immuns pourrait induire un encombrement stérique à la surface des PMN et empêcher leur activation.



## VI. Blocage des récepteurs Fcγ

Pour identifier clairement le rôle joué par les récepteurs Fcγ dans l'activation des PMN HLA-A2 médiée par les IgG HLA-A2, un blocage des récepteurs Fcγ a été envisagé.

Deux techniques ont été utilisées :

- une première technique consistait à bloquer ces récepteurs par l'utilisation de fortes concentrations en IgG HLA (-)
- une deuxième technique consistait à bloquer les récepteurs en les couplant de façon covalente à des anticorps monoclonaux anti-FcγRII (anti-CD32) et anti-FcγRIII (anti-CD16) à l'aide d'un agent chimique, le bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS<sup>3</sup>).

### VI.1 Blocage des récepteurs Fcγ par le marquage des PMN avec des IgG couplées au FITC

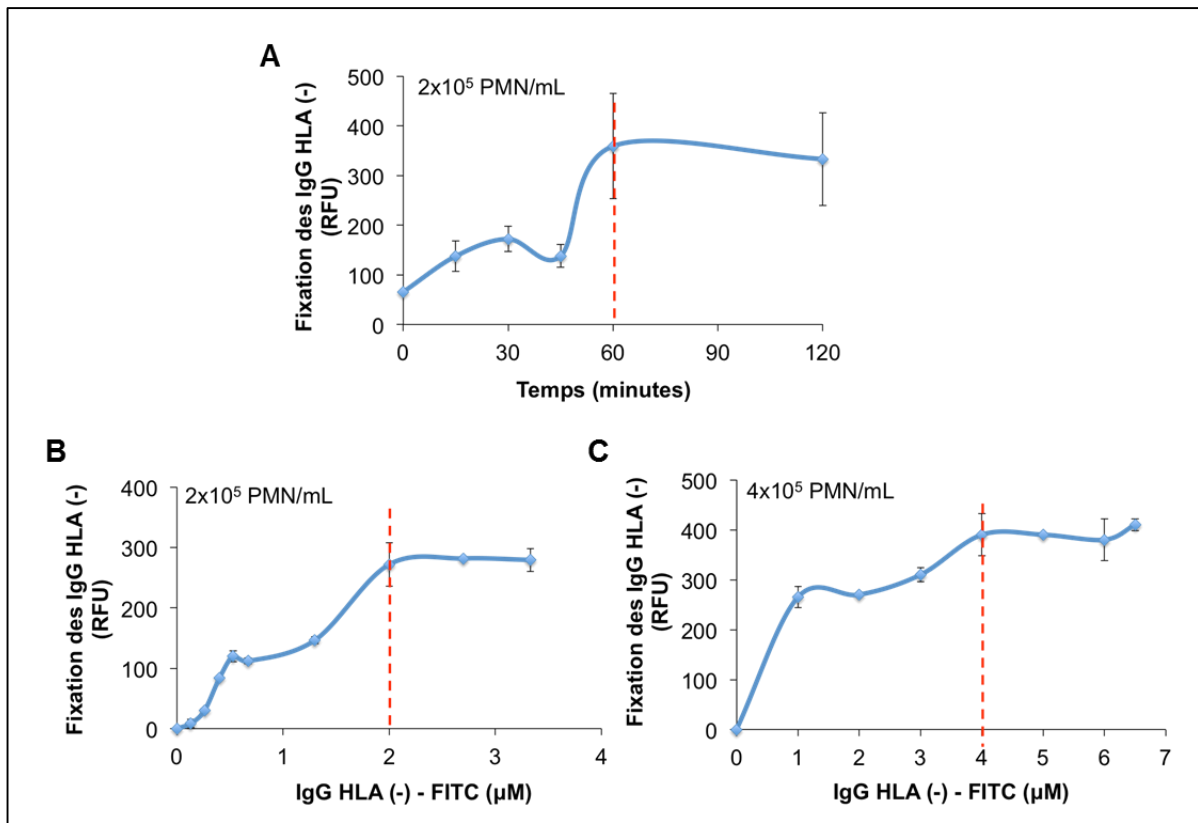
Afin de bloquer les fonctions effectrices des Fcγ, les PMN sont incubés en présence d'une concentration saturante d'IgG HLA (-) couplées au FITC. Les conditions de saturation sont établies après optimisation de la concentration des IgG HLA (-) marquées utilisée, du nombre de PMN, ainsi que leur temps d'incubation avec les IgG (Figure 71). Le marquage des IgG HLA (-) couplées au FITC est contrôlée par fluorimétrie.

- Dans un premier temps, la cinétique d'incubation en présence d'une concentration constante de PMN ( $2 \times 10^5$  cellules/ml) avec une concentration constante d'IgG HLA (-) marquées est étudiée afin de connaître le temps optimal à partir duquel la fixation des IgG HLA (-) aux PMN est stable. La fluorescence des cellules est mesurée après 15 à 120 min d'incubation avec les IgG HLA (-) couplées au FITC. La fluorescence reste constante après 60 min (Figure 71.A).

Dans les expériences ultérieures, le temps d'incubation est fixé à 1h.

- Dans un deuxième temps, la concentration saturante d'IgG couplées au FITC est déterminée en incubant pendant 1h des PMN, à une concentration fixe, avec des concentrations croissantes d'IgG HLA (-) couplées au FITC (Figure 71.B). Ces différentes expériences ont permis ainsi d'établir la concentration optimale d'IgG HLA (-) qui entraîne la saturation de tous les récepteurs Fcγ pour un nombre de PMN donné:
  - pour  $2 \times 10^5$  cellules/ml, une concentration de 2  $\mu$ M d'IgG est nécessaire (Figure 71.B)
  - pour  $4 \times 10^5$  cellules/ml, la concentration saturante de fixation des IgG HLA (-) aux PMN est de 4  $\mu$ M (Figure 71.C).





**Figure 71. Etude des conditions optimales du blocage des récepteurs Fc $\gamma$  des PMN par des IgG couplées au FITC.** Les PMN sont incubés avec des IgG HLA (-) couplés avec du FITC dans la glace. Le marquage des PMN avec les IgG HLA (-) couplées au FITC est mesuré par fluorimétrie. **(A)**, cinétique d'incubation avec  $2 \times 10^5$  cellules/mL de PMN et une concentration constante de  $2 \mu\text{M}$  d'IgG HLA (-) - FITC est mesurée. **(B)** et **(C)** Les PMN ( $2 \times 10^5$  cellules/mL, **B** ou  $4 \times 10^5$  cellules/mL, **C**) sont incubés avec des concentrations croissantes d'IgG HLA (-) - FITC. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

En résumé, ces expériences ont permis d'évaluer la concentration d'IgG nécessaire pour bloquer les récepteurs Fc $\gamma$  des PMN. Les perspectives résultant de cette étude préliminaire représentaient une piste intéressante pour répondre aux deux objectifs fixés :

- Evaluer l'impact de la liaison des IgG HLA-A2 avec les antigènes HLA-A2 dans l'activation des PMN HLA-A2. Pour cela, l'activité oxydase des PMN HLA-A2 primés puis stimulés par les IgG HLA-A2 est mesurée après le blocage de leur récepteur Fc $\gamma$  avec une concentration saturante d'IgG HLA (-).
- Analyser les paramètres de compétition entre les IgG HLA-A2 et les IgG HLA (-). L'évaluation du phénomène de compétition met en jeu l'incubation de PMN HLA non A2 en présence d'une concentration saturante d'IgG HLA (-) dans un premier temps puis dans un second temps, d'une concentration croissante d'IgG HLA-A2. La compétition est analysée en évaluant l'intensité de fixation des IgG HLA (-) couplée au FITC par fluorimétrie. D'autre part, l'affinité des deux types d'IgG pour les récepteurs Fc $\gamma$  est évaluée

par l'incubation simultanée avec des PMN HLA non A2, d'une concentration saturante d'IgG HLA (-) couplées au FITC avec une concentration croissante d'IgG HLA-A2 puis par le marquage des IgG HLA (-) est suivi par fluorimétrie.

Malheureusement, les expériences de compétition réalisées ne sont pas interprétables du fait de la grande variabilité des résultats obtenus, probablement du fait de la fixation réversible des IgG HLA (-) marquées aux PMN et cela, indépendamment de la présence ou l'absence d'IgG HLA-A2. Ce protocole mérite d'être optimisé à nouveau.

Quant à l'impact de la liaison antigènes HLA-A2-anticorps anti-HLA-A2 dans l'activation des PMN HLA-A2 par les IgG HLA-A2, il était également difficile d'évaluer l'activité oxydase des PMN si le blocage de leur récepteur Fc $\gamma$  n'était pas total.

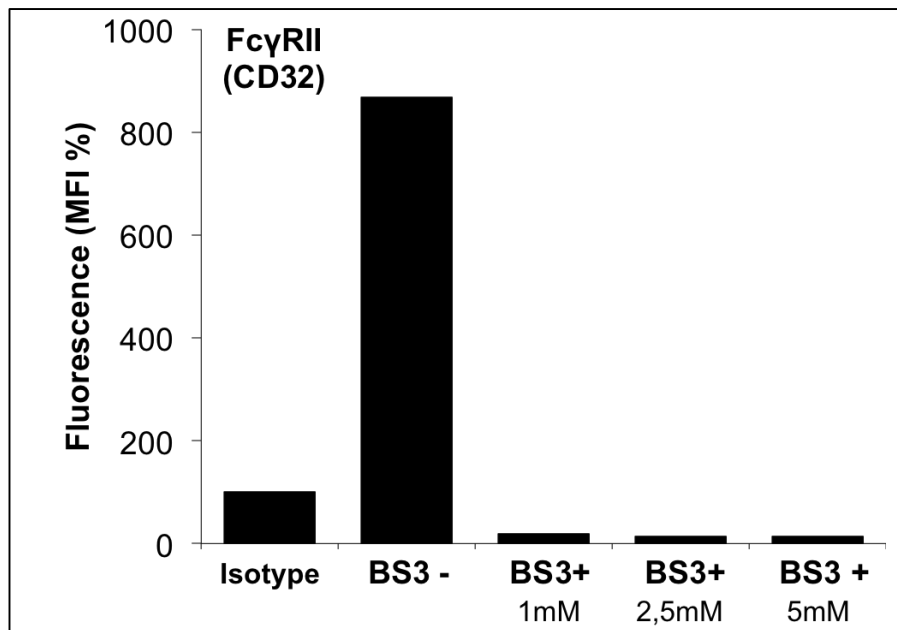
Pour pallier à cette problématique, un agent chimique, le bis-sulfosuccinimidyl-suberate, qui forme des liaisons covalentes entre un ligand et son récepteur, a été utilisé.

## **VI.2 Blocage des récepteurs Fc $\gamma$ par le couplage covalent avec des anticorps anti-récepteur Fc $\gamma$ par le Bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS<sup>3</sup>).**

Le BS<sup>3</sup> est un agent de couplage homo-bifonctionnel, hydrosoluble, non clivable et imperméable aux membranes.

Dans cette étude, le BS<sup>3</sup> est utilisé pour former des liaisons covalentes entre les anticorps dirigés spécifiquement contre les récepteurs Fc $\gamma$  afin de bloquer ces récepteurs. Dans un premier temps, nous avons analysé le blocage du récepteur Fc $\gamma$ RII en réalisant un marquage des PMN avec l'anticorps monoclonal anti-CD32 (anti-Fc $\gamma$ RII). Les anticorps sont ensuite liés de manière covalente aux récepteurs Fc $\gamma$ RII par traitement avec le BS<sup>3</sup>. Pour vérifier que tous les récepteurs Fc $\gamma$ RII sont bien bloqués, un marquage des PMN avec l'anticorps anti-CD32 est réalisé et la fluorescence est analysée par cytométrie en flux.

Aux différentes concentrations de BS<sup>3</sup> testées, la fluorescence correspondant au marquage du récepteur Fc $\gamma$ RII des PMN est nulle (Figure 72). En effet, alors que le récepteur Fc $\gamma$ RII est bien présent à la surface des PMN en absence de traitement, la MFI rapportée pour les PMN après traitement par le BS<sup>3</sup> est plus faible que la MFI du contrôle isotypique. Le blocage des récepteurs Fc $\gamma$ RII par le BS<sup>3</sup> est bien vérifié.



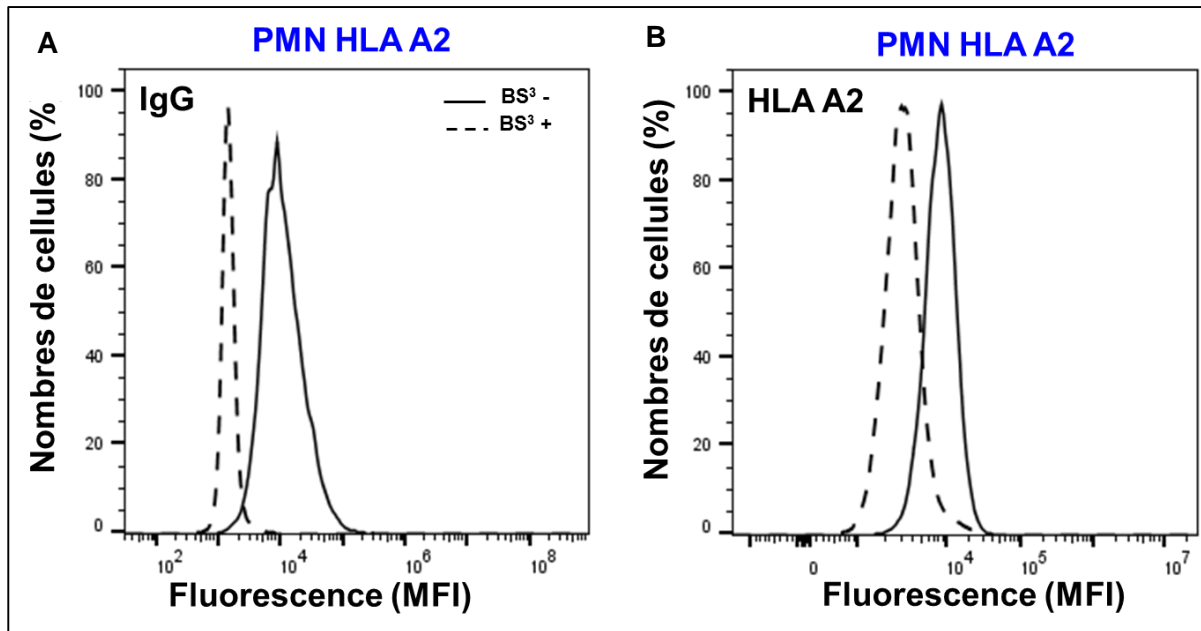
**Figure 72. Blocage du récepteur FcγRII après traitement par le Bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS<sup>3</sup>).** Les PMN ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL) sont incubés avec l'anticorps monoclonal anti-CD32 (anti-FcγRII) (clone 5G8) puis traités avec le BS3 (1mM, 2,5mM ou 5mM) pendant 30 min dans la glace. L'expression des récepteurs FcγRII libres est ensuite analysée par cytométrie en flux après le marquage de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL des PMN avec l'anticorps monoclonal anti-CD32 (anti-FcγRII) (clone 5G8) couplé à la phycoerythrine. Un contrôle de l'isotype est réalisé après l'incubation des PMN avec un anticorps anti-IgG1 puis avec un anticorps secondaire couplé à la phycoerythrine.

Pour les expériences ultérieures, la concentration de BS<sup>3</sup> a été fixée à 1 mM.

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet du traitement des PMN par le BS<sup>3</sup> seul:

- sur la fixation des IgG à la membrane plasmique des PMN (Figure 73.A)
- sur l'expression des antigènes HLA-A2 des PMN HLA-A2 (Figure 73.B)

Après traitement des PMN HLA-A2 avec le BS<sup>3</sup>, on observe un décalage vers la gauche du pic de fluorescence après marquage des cellules avec les IgG ou bien avec l'anticorps monoclonal HLA-A2 indiquant que le traitement des cellules par le BS<sup>3</sup> altère la capacité des anticorps à se lier sur les récepteurs Fcγ et sur les sites antigéniques HLA-A2.



**Figure 73. Etude du marquage des IgG et des antigènes HLA-A2 à la membrane plasmique des PMN HLA-A2 après traitement avec le BS<sup>3</sup>.** Les PMN ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL) sont préalablement incubés avec 1mM de BS3 (courbe pointillé) pendant 30 min dans la glace, puis pendant 30 min avec 5  $\mu$ g d'IgG humaines (A) ou de l'anticorps monoclonal de souris anti-HLA-A2 (clone BB7.2)(B), le marquage des IgG ou de l'anticorps monoclonal anti-HLA-A2 est analysé par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps secondaire reconnaissant spécifiquement les IgG humaines ou les IgG de souris respectivement et couplé à l'Alexa fluor. Un contrôle est réalisé dans les mêmes conditions sans traitement des PMN avec le BS3 (courbe en trait plein).

Les résultats montrent que le BS<sup>3</sup> seul peut modifier la conformation des molécules exprimées à la surface des PMN, en particulier la structure des récepteurs Fc $\gamma$  et celle des sites antigéniques HLA-A2. Cet effet non-attendu du BS<sup>3</sup> ne nous a pas permis de l'utiliser pour caractériser le rôle des récepteurs Fc $\gamma$  dans l'activation des PMN HLA-A2 par les IgG HLA-A2.



# **DISCUSSION GENERALE**



La transfusion des produits sanguins labiles représente un traitement substitutif essentiel pour de nombreux patients. En France, la première expérience de transfusion sanguine remonte à 1667 mais c'est lors de la première guerre mondiale qu'ont eu lieu les premières transfusions en masse sur les soldats blessés (Boudot 2009). A cette époque, la connaissance des groupes érythrocytaires ABO et de leur compatibilité n'étaient pas encore établies : les champs de bataille deviennent alors des champs d'expérimentation pour les médecins. C'est pendant la période de l'entre-deux-guerres que les méthodes se professionnalisent et commencent à être appliquées dans les hôpitaux (Dausset 1958). Une sécurité transfusionnelle est ensuite mise en place dans les années 1990 pour assurer la maîtrise de toutes les étapes de la chaîne transfusionnelle du donneur au receveur et pour tracer les effets indésirables survenus chez le receveur auprès de l'ANSM.

L'œdème pulmonaire lésionnel post-transfusionnel TRALI est un des effets indésirables souvent sous-évalué en nombre, mais qui demeure un accident transfusionnel grave du fait du pronostic vital engagé. Son diagnostic ambigu et ses similitudes cliniques avec le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) conduisent fréquemment à l'appellation « syndrome de détresse respiratoire aiguë post-transfusionnelle » (Toy et al. 2015). Il est également confondu avec l'œdème de surcharge (TACO) ce qui retarde son délai de prise en charge. Concernant les causes étiologiques, les trois acteurs de la transfusion sanguine sont incriminés : le receveur, le donneur et le produit sanguin labile.

Malgré les progrès dans la reconnaissance du TRALI, de nombreux travaux ont cherché à définir le facteur déclenchant présent dans le produit sanguin. Beaucoup d'études épidémiologiques évoquent à juste titre la responsabilité des anticorps anti-HLA présents dans le produit sanguin sans jamais clairement démontrer leur implication directe. Quant au mécanisme physiopathologique du TRALI, il est très équivoque et fait l'objet de travaux souvent controversés. Voici les deux points principaux qui méritent d'être mis en exergue dans la compréhension du TRALI. Les problématiques rencontrées illustrent la nécessité de comprendre les mécanismes de survenue du TRALI afin d'optimiser les critères de diagnostic et de développer des stratégies préventives adaptées.

## **DISCUSSION DES RESULTATS DE LA PARTIE I**

- **Mécanisme du TRALI en deux-étapes**

Pendant longtemps, de nombreuses équipes évoquent comme seul facteur déclenchant, l'apport du produit sanguin en dehors de tout contexte pathologique (Toy et al. 2005) puis d'autres mirent en évidence que ce même facteur ne déclenchait pas



systématiquement le TRALI et conclurent à l'existence d'une étape supplémentaire en amont de la transfusion (Silliman et al. 2006). Quel que soit le mécanisme imputé, le rôle central de l'activation des PMN dans cette complication transfusionnelle fut établi. En effet, des autopsies de poumons effectuées sur des patients décédés suite à un TRALI soulignèrent l'accumulation des PMN au contact de l'endothélium lésé des capillaires pulmonaires (Dry et al. 1999). Cette lésion endothéliale résulte de l'augmentation de sa perméabilité qui provoque une extravasation liquidienne cellulaire interstitielle et alvéolaire aboutissant à l'œdème pulmonaire (Silliman et al. 2005).

En support avec les données de la littérature, les travaux de ma thèse valident pour la première fois, le mécanisme en deux étapes de la survenue du TRALI:

- La première, inhérente à une situation pathologique ou thérapeutique du patient transfusé est responsable d'une pré-stimulation intra-pulmonaire des PMN. Dans les expériences, cette étape est mimée par le « priming » des PMN par le fMLP ou le LPS.
- La deuxième étape, dépendante de la transfusion, conduit à l'activation des PMN et une production excessive en espèces réactives de l'oxygène, les ROS. Cette libération de ROS par les PMN entraîne par la suite une augmentation de la perméabilité endothéliale.

- **Implication des anticorps anti-HLA-A2 dans l'activation des PMN HLA-A2 : effet d'un seuil déclenchant**

Il faut noter que l'implication des anticorps anti-HLA de classe II n'a pas été étudiée ici car leur cible antigénique n'est pas représentée sur les polynucléaires neutrophiles (Kopko et al. 2001 ; Varela et al. 2002 ; Sachs et al. 2011).

Les anticorps anti-HLA-A2 ont été choisis du fait de la fréquence élevée de l'expression allélique HLA-A2 : elle est supérieure à 50% dans la population caucasienne ([www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net)). De ce fait, la fréquence d'immunisation contre l'antigène HLA-A2 est élevée en France.

Les études réalisées *ex vivo* avaient pour objectif d'évaluer l'implication des anticorps anti-HLA apportés par le produit sanguin transfusé dans l'activation des PMN. Dans notre étude, l'activation des PMN a été mesurée par l'activité NADPH oxydase des PMN. En effet, la NADPH oxydase est un complexe enzymatique dont les constituants sont dissociés dans les PMN non stimulés. Au moment du « priming », certains facteurs cytosoliques du complexe oxydase, en particulier p47<sup>phox</sup>, sont phosphorylés ce qui conduit à un changement de leur conformation mais sans production significative d'ions superoxyde (El-Benna et al. 2005). Après stimulation par des molécules pro-inflammatoires, la NADPH oxydase s'assemble au niveau du cytochrome *b*<sub>558</sub> membranaire et devient active, libérant des ions superoxydes dans

le milieu extracellulaire. La mesure de l'activité NADPH oxydase *ex vivo* permet de vérifier si les cellules sont uniquement sensibilisées ou si elles sont vraiment activées.

Les résultats expérimentaux ont montré que les PMN de typage HLA-A2 sensibilisés puis soumis à la présence d'une quantité seuil d'anticorps anti-HLA-A2 sont significativement activés. Ces données s'accordent avec l'hypothèse de l'implication des anticorps anti-HLA dans le déterminisme du TRALI et mettent en avant la notion d'un seuil d'anticorps anti-HLA nécessaire pour déclencher l'activation.

En 2010, les travaux d'Hashimoto et de ses collaborateurs (Hashimoto *et al.* 2010) mettent en exergue le lien entre la quantité d'anticorps anti-HLA et la survenue du TRALI. Ils montrent que parmi les 1028 accidents transfusionnels non hémolytiques déclarés au Japon entre 1997 et 2009, 200 cas de TRALI d'imputabilité certaine ainsi que 80 cas d'imputabilité possible ont été déclarés. Par ailleurs, 125 incidents autres que le TRALI (16,6% de la totalité des accidents transfusionnels) ont été déclarés chez des patients ayant reçu au moins une unité de PSL contenant des anticorps anti-HLA : parmi ces cas, 3 patients présentaient l'homologie HLA de l'anticorps anti-HLA. Au sein des trois groupes d'accidents transfusionnels décrits (TRALI certain, TRALI possible, accidents non TRALI) la positivité des anticorps anti-HLA était significativement plus élevée dans les cas de « TRALI certain ». Les travaux d'Okazaki conduisent alors aux conclusions suivantes :

- La présence de l'anticorps anti-HLA et de l'antigène HLA correspondant chez le patient transfusé ne conduit pas systématiquement à la survenue du TRALI.
- Dans un contexte de diagnostic difficile, la certitude d'un accident transfusionnel dû au TRALI ainsi que sa sévérité sont conditionnées par le « taux » d'anticorps anti-HLA contenu dans le PSL.

Ces résultats étayent les travaux de ma thèse car ils montrent clairement que les anticorps anti-HLA retrouvés dans les produits sanguins ne suffisent pas à eux seuls pour expliquer l'apparition du TRALI. De plus, lorsque le produit sanguin contient des anticorps anti-HLA reconnaissant les PMN du patient transfusé, « une concentration-seuil » d'anticorps anti-HLA est nécessaire pour déclencher le TRALI.

Actuellement, la prévention du TRALI repose sur l'éviction de tous les dons provenant de donneurs présentant des anticorps anti-HLA ce qui diminue fortement le nombre de produits sanguins disponibles à la transfusion, pour des besoins qui ne cessent d'augmenter. En effet, puisque la transfusion concerne en majorité les personnes âgées (Rapport de l'hémovigilance. 2014), l'allongement de l'espérance de vie a pour conséquence un accroissement du nombre de patients transfusés. D'autre part, les progrès de la médecine et le développement de nouveaux médicaments tels que des molécules utilisées en

chimiothérapie entraînent souvent une aplasie médullaire chez le patient traité. Ces traitements nécessitent donc une grande disponibilité des produits sanguins. La problématique actuelle s'inscrit dans la difficulté à maintenir une réserve optimale en PSL pour satisfaire les besoins de tous les patients. Les mesures d'éviction des dons à risque dans la prévention du TRALI permettent d'apprécier le bien-fondé et les contreparties de ces stratégies. Par exemple, les donneuses ayant eu une ou plusieurs grossesses sont plus à risque de présenter des anticorps anti-HLA et leur dépistage est réalisé de manière systématique. Cela permet d'exclure la majorité des donneurs à risque mais il exclut également un large panel de donneurs « sains » (Peters et al. 2015). Or, l'exclusion de leurs dons joue un rôle considérable dans l'approvisionnement en PSL car cela amène à reconsidérer l'utilisation de leur don pour les plaquettes et le plasma, là où le besoin se fait plus sentir (Eder et al. 2010). Il est aussi intéressant de noter que la proportion des donneurs femmes est légèrement plus élevée que celle des hommes (Rapport d'hémovigilance 2014).

En prenant compte de l'existence d'un seuil de déclenchement du TRALI, l'éviction de tous les PSL présentant des anticorps anti-HLA ne semble pas la meilleure stratégie à adopter. Un groupe d'étude (LAPS « *Leukocyte Antibody Prevalence Study* ») a été mis en place pour reconsidérer la stratégie d'exclusion de ces donneuses (Kleinman et al. 2011). Ils ont tenté d'évaluer « un seuil consensus » d'exclusion (Carrick et al. 2011) mais la difficulté de cette évaluation demeure dans la variabilité du test de dépistage entre les fournisseurs et les différents lots (du même fournisseur) au sein de la même technique (Gandhi et al. 2013).

- **Dialogue entre le polynucléaire neutrophile et la cellule endothéliale**

Quels liens existent-t-ils entre le neutrophile et la cellule endothéliale dans la survenue du TRALI ? L'interaction entre le neutrophile activé et la cellule endothéliale méritait bien entendu d'être étudiée. Pour déterminer la relation entre la lésion endothéliale et l'activation des PMN, des cellules endothéliales ont été cultivées en système Transwell sur une membrane microporeuse. Cette membrane délimite ainsi un compartiment supérieur et un compartiment inférieur. La perméabilité de l'endothélium a été mesurée par un traceur (BSA (Bovine Serum Albumin) couplé au FITC) ajouté dans le milieu de culture cellulaire endothéliale du compartiment supérieur. L'addition de neutrophiles activés par le PMA dans ce milieu de culture entraînait une fuite de la BSA dans le compartiment inférieur suggérant une augmentation de la perméabilité endothéliale. Le dialogue entre ces deux acteurs cellulaires a également été évalué quand les cellules endothéliales se trouvent au contact des PMN activés par les anticorps anti-HLA. La VE-cadhérine est considérée comme le principal marqueur de la perméabilité endothéliale puisqu'il s'agit d'une protéine de liaison caractéristique des jonctions serrées endothéliales et responsable de leur stabilité. A ce titre, nous avons étudié la présence de la VE-cadhérine clivée dans le milieu de co-culture entre les

cellules endothéliales et les PMN HLA-A2 primés puis activés par les anticorps. Les résultats ont montré une augmentation de la VE-cadhérine clivée dans le milieu de culture quand les PMN étaient activés par les IgG HLA-A2 (en comparaison avec l'activation des PMN HLA-A2 par les IgG HLA (-)). Il s'agit d'une preuve que l'activation des PMN HLA-A2 par les anticorps anti-HLA-A2 conduit à une augmentation de la perméabilité endothéliale. Dans la prévention du TRALI, le dosage sanguin de la VE -cadherine serait une bonne piste pour identifier des patients à risque. Cette piste sera détaillée dans les perspectives de l'étude.

En outre, nous avons montré le rôle direct de Nox2 et des ROS dans l'augmentation de la perméabilité membranaire en utilisant un système acellulaire producteur d'ions superoxydes (le système Xanthine/Xanthine oxydase) ou encore en utilisant des cellules déficientes en Nox2. L'impact des ROS dans la dysfonction endothéliale avait été étudié par l'équipe de Nwariaku (Nwariaku et al. 2004). Nwariaku et ses collaborateurs suggéraient dans ces travaux, que l'exposition des cellules endothéliales au TNF $\alpha$  aboutissait à une l'activation de la NADPH oxydase endothéliale. L'activité des Nox entraînait à leur tour la phosphorylation et le clivage de la VE -cadherine.

En outre, les cellules endothéliales sont également capables de produire des ROS. Contrairement aux PMN qui expriment exclusivement Nox2 (Figure 62), les cellules endothéliales ont la capacité d'exprimer plusieurs Nox : Nox2 et Nox4 (Figures 50 et 51). Nox4 présente une activité oxydase constitutive observée dans les cellules non-stimulées mais génère une faible quantité basale de ROS (Figures 53 et 54).

Sous l'effet du TNF $\alpha$ , l'activité NADPH oxydase des cellules endothéliales augmentent vraisemblablement *via* l'activation de Nox2, ce qui conduit à la libération d'une quantité significative de ROS (Figure 54) (Gao et al.2008). Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire qui est sécrétée en masse par les neutrophiles (Lapinet et al. 2000). La libération du TNF $\alpha$  entraîne l'expression de molécules d'adhésion de l'endothélium conduisant à une augmentation de son adhérence avec les neutrophiles (Kolaczowska et al. 2013). Elle permet alors d'initier une cascade d'évènements entraînant le maintien et l'amplification du phénomène inflammatoire au niveau de l'endothélium. L'activation des neutrophiles entraîne une augmentation de la perméabilité endothéliale mais leur sécrétion de TNF $\alpha$  conduit également, dans un second temps, à la libération de ROS par les cellules endothéliales. Si nous avons évalué l'interaction des PMN activés avec les cellules endothéliales dans des conditions de co-culture, nous n'aurions pas pu discriminer les ROS produits par chacun des deux types cellulaires. L'effet direct du TNF $\alpha$  sur les cellules endothéliales nous a ainsi permis d'évaluer l'impact des ROS produits dans la survenue du TRALI. Au vu du délai d'activation des cellules endothéliales retardé de 3 heures après stimulation par le TNF $\alpha$  (Figure 54), les ROS produits par les cellules endothéliales ne semblent pas avoir un fort impact dans la

survenue du TRALI quand on sait que cet accident survient très rapidement, de l'ordre de la demi-heure, suivant la transfusion. Néanmoins, l'activation des Nox endothéliales en réponse à la libération, par les PMN activés, de cytokines pro-inflammatoires suggère une activation en cascade des protagonistes cellulaires, conduisant ainsi à une amplification de l'inflammation au niveau de l'endothélium.

Enfin, l'impact direct des anticorps anti-HLA dans l'activation de l'endothélium pulmonaire est suggéré, puisqu'il fait partie des cibles de reconnaissance des anticorps anti-HLA. Cet impact n'a malheureusement pas pu être étudié : au laboratoire, nous utilisons une lignée de cellules endothéliales, les EA.hy926, issue de la fusion des cellules endothéliales primaires (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cell*) avec des cellules d'adénocarcinome de poumon. Le typage HLA réalisé par technique de PCR-SSO (résultats non montrés ici) avait montré que cette lignée endothéliale avait un phénotype HLA-A\*24, \*25, non compatible avec nos expériences.

## **DISCUSSION DES RESULTATS DE LA PARTIE II**

Dans la deuxième partie du travail, nous avons cherché à déterminer par quel mécanisme les anticorps HLA-A2 activaient les PMN HLA-A2.

### **• Mécanismes d'activation des neutrophiles par les anticorps anti-HLA**

L'activation des PMN par les anticorps anti-HLA résulte de leur fixation à la cellule par deux mécanismes distincts :

- Le premier est inhérent au processus de complémentarité entre le paratope de l'anticorps anti-HLA et l'épitope de l'antigène HLA et forme un complexe antigène-anticorps.
- Le deuxième fait appel aux récepteurs Fc $\gamma$  des neutrophiles qui fixent spécifiquement les IgG.

La structure multivalente d'une immunoglobuline contribue au fait que chaque IgG HLA-A2 peut interagir avec l'antigène HLA-A2, par ses fragments F'ab, et le complexe immun ainsi formé peut être reconnu par le récepteur Fc $\gamma$ , *via* le fragment Fc des IgG. Cette double interaction est spécifique des IgG anti-HLA-A2 en présence des PMN HLA-A2. Elle peut avoir lieu au sein d'un même PMN ou entre deux PMN. Les IgG HLA-A2 peuvent ainsi assurer un pontage entre plusieurs neutrophiles (ou à la surface d'un même PMN) permettant un recrutement plus grand des PMN dans la zone d'inflammation et amplifiant l'activation des neutrophiles.

- **Expression membranaire des sites antigéniques HLA-A2 et des récepteurs Fc $\gamma$  des PMN HLA-A2.**

L'équipe de Siliman (Silliman et al. 2014) a analysé l'effet du « *priming* » par les anticorps anti-HLA-A2 des PMN purifiés à partir d'individus hétérozygotes ou homozygotes pour les 2 allèles du locus A (HLA-A2). Les auteurs ont comparé la production de ROS produits par ces deux types de PMN. L'activation par le fMLP des PMN, provenant de donneurs homozygotes et préalablement « primés » par les anticorps anti-HLA-A2, était plus élevée que celle des PMN provenant de donneurs hétérozygotes et traités de manière identique. Ils en ont conclu que le « *priming* » par les anticorps anti-HLA-A2 était plus efficace pour les PMN provenant de donneurs homozygotes et que ce résultat était lié au niveau d'expression antigénique à la surface des cellules (Creamer et al. 1992). Dans cette étude, le délai rapide entre le priming des PMN par les anticorps monoclonaux anti-HLA-A2 et l'augmentation des protéines membranaires HLA des PMN ne semble pas compatible avec le délai d'apparition du TRALI (la majorité des cas survient dans les 30 minutes suivant la transfusion).

Dans notre étude, nous nous sommes demandés si le priming par le fMLP ou le LPS modifiait l'expression des sites antigéniques HLA à la surface des PMN ce qui pourrait expliquer l'effet des anticorps anti-HLA-A2 dans l'activation des neutrophiles. Les expériences de marquage analysées par cytométrie en flux ont permis de conclure qu'il n'existe pas d'augmentation de la densité antigénique HLA-A2 des PMN HLA-A2 sensibilisées (fMLP, LPS) par rapport aux cellules au repos. De plus, nos expériences ont fait appel à l'utilisation de PMN purifiés à partir d'individus sains de typage HLA-A2, hétérozygotes ou homozygotes pour les deux allèles du locus A. Ces conditions n'ont pas été prises en compte dans notre appréciation car les résultats obtenus avec les deux types de PMN HLA-A2 n'étaient pas significativement différents.

Dans nos travaux, nous n'avons pas vu de modification de l'expression des récepteurs Fc $\gamma$  à la surface des PMN suivant l'état de « priming » ou d'activation des PMN. Or, les fonctions de ces récepteurs sont essentielles dans la reconnaissance des complexes immuns et dans la défense de l'hôte contre les microorganismes. Les récepteurs Fc $\gamma$  activateurs jouent un rôle clé dans la phagocytose et la sécrétion de médiateurs inflammatoires (Cassatella et al. 1995). L'activation de ces récepteurs induit des voies de signalisation qui modulent la réponse immunitaire telles que l'activation de la NADPH oxydase. Ces récepteurs jouent un rôle majeur dans la survenue du TRALI. L'équipe de Looney a développé un modèle murin déficient en récepteur Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) et a montré que ces souris étaient résistantes au développement du TRALI mais que le transfert adoptif de neutrophiles de souris sauvages vers ce modèle murin rétablit l'apparition de l'œdème lésionnel (Looney et al. 2006b). Dans ce modèle animal, le mécanisme du TRALI est dépendant de la présence de neutrophiles et

de leurs récepteurs aux immunoglobulines G. De ce fait, le blocage des récepteurs Fc était un bon moyen de déterminer s'il existe d'autres voies aboutissant à l'activation du neutrophile par les anticorps anti-HLA. Malheureusement, le blocage de ces récepteurs Fc $\gamma$  par deux approches différentes ne nous a pas permis de conclure sur cette problématique.

- **Les radeaux lipidiques potentialisent l'effet des anticorps anti-HLA dans l'activation des PMN**

Dans ce travail, nous montrons un lien entre la présence des radeaux lipidiques membranaires et l'activation des PMN HLA-A2 par les anticorps anti-HLA-A2. Les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane plasmique riches en glycosphingolipides et en cholestérol. Ce sont des structures rigides dans la membrane qui constituent des zones privilégiées pour l'activité de certaines protéines qui y sont intégrées (Simons et al. 2000). Les radeaux lipidiques semblent jouer un rôle central dans l'initiation des cascades de transduction du signal et tout particulièrement dans les voies de signalisation de la réponse immunitaire *via* les récepteurs Fc $\gamma$  (Varshney et al. 2016). Nous montrons que la déplétion des rafts lipidiques ne modifie pas l'expression membranaire des antigènes HLA-A2 mais abaisse celle des récepteurs Fc $\gamma$ . Cette déplétion a pour conséquence une diminution de la liaison des IgG HLA-A2 aux PMN HLA ce qui conduit à une baisse de l'activité oxydase des PMN par les anticorps anti-HLA. Le lien entre la déplétion des radeaux lipidiques et la diminution de marquage des récepteurs Fc $\gamma$  suggère fortement leur colocalisation au niveau des radeaux lipidiques membranaires des PMN quand ceux-ci sont activés par les anticorps. De précédentes études soulignaient déjà le rôle majeur des radeaux lipidiques dans la signalisation cellulaire en montrant que la translocation du récepteur Fc $\gamma$ RIIa (CD32a) au niveau des radeaux lipidiques potentialise leur liaison aux IgG (Bournazos et al. 2009). Les radeaux lipidiques membranaires sont un lieu de recrutement et de concentration des récepteurs, facilitant les interactions avec leurs effecteurs en évitant les interférences avec d'autres voies. L'oligomérisation des récepteurs suite à une stimulation par un ligand augmente leur affinité pour les radeaux. Les récepteurs sont alors recrutés par ces radeaux, qui eux-mêmes se regroupent en larges domaines de 300 nm. Ce phénomène a pour conséquence de placer les récepteurs dans un micro-environnement différent et de modifier la répartition des protéines entre les radeaux et le reste de la membrane (Figure 74).

L'étude de la localisation du complexe de la NADPH oxydase dans les phagocytes souligne également le fait que leur translocation dans les radeaux lipidiques potentialise son activation. L'hétérodimère membranaire de Nox2 est présent dans le compartiment lipidique des PMN. La signalisation cellulaire induite par la mobilisation des récepteurs Fc $\gamma$  actifs conduit au recrutement du complexe NADPH oxydase complet au sein des rafts et optimise l'activation de la NADPH oxydase (Shao et al. 2003).

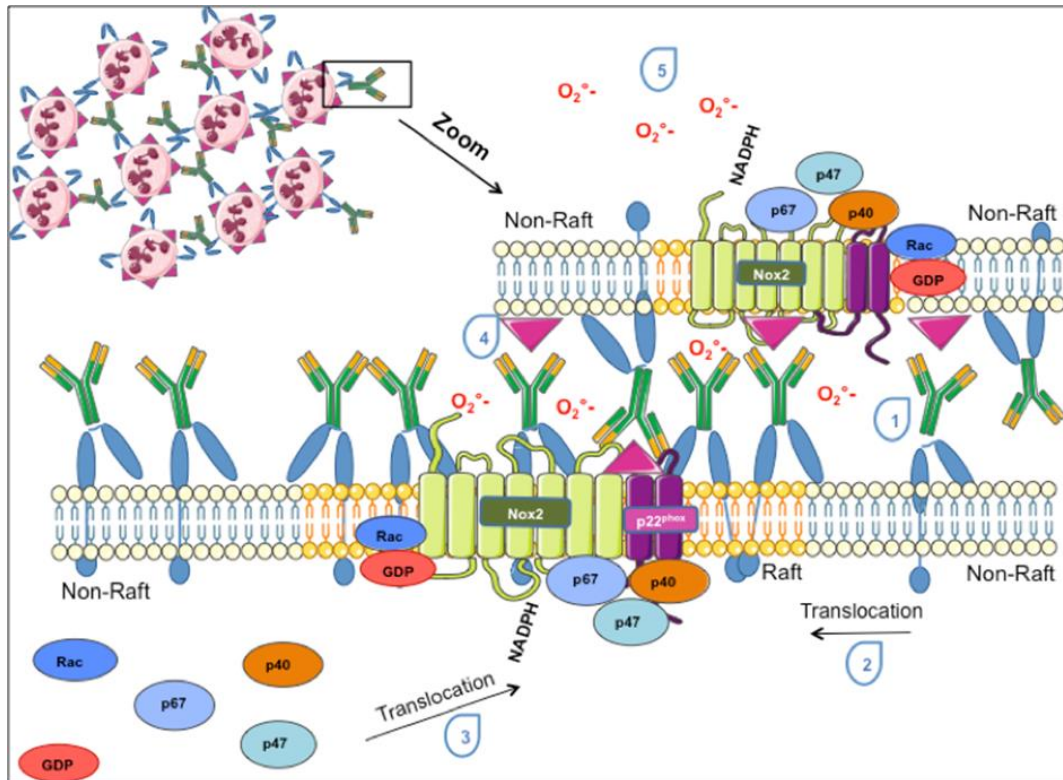
### ***Conclusion et perspectives***

Au terme de ce travail, nous confirmons l'implication des anticorps anti-HLA dans la survenue du TRALI en validant le modèle en deux étapes proposé par Silliman et ses collaborateurs (Silliman CC et al, 2006). Nous montrons en plus que, dans ce modèle en deux étapes, qu'un seuil d'anticorps anti-HLA est nécessaire pour déclencher une forte activation des PMN. L'existence de ce seuil, qu'il reste à définir, soulève la question d'une redéfinition de la stratégie d'exclusion moins drastique en vue de bénéficier d'une réserve optimale en PSL tout en minimisant le risque du TRALI.

Nos résultats constituent un rationnel scientifique solide pour proposer une étude plus approfondie des mécanismes d'activation des PMN par les anticorps anti-HLA à partir du modèle que nous présentons ci-dessous (Figure 74) :

- Le modèle de l'activation des PMN HLA-A2 par les anticorps anti-HLA-A2 fait intervenir la formation de complexes immuns antigène – anticorps à la surface des PMN préalablement « primés ».
- Ces complexes immuns sont reconnus avec une affinité plus grande que les IgG seules par les récepteurs Fc activateurs présents à la surface des PMN.
- Cette double interaction IgG HLA-A2/antigène HLA-A2 et complexe immun/récepteur Fc au sein d'un même PMN pourrait favoriser la formation de cluster de récepteurs Fc activés au niveau de radeaux lipidiques, ce qui induirait une activation optimisée de ces récepteurs, entraînant une cascade de signalisation aboutissant entre autre à l'activation de la NADPH oxydase des PMN.





**Figure 74. Modèle de l'activation de la NADPH oxydase des PMN par les anticorps anti-HLA-A2 dans les radeaux lipidiques.** (1) La liaison de l'anticorps anti-HLA sur l'antigène HLA-A2 forme un complexe immunitaire reconnu par les récepteurs Fc du PMN concerné ou d'un PMN voisin. (2) L'interaction du complexe immunitaire avec les récepteurs Fc favorise la « clusterisation » des récepteurs Fc activés au niveau des radeaux lipidiques membranaires. (3) Cette liaison conduit à une cascade de signalisation cellulaire qui permet la translocation des facteurs cytosoliques au niveau du cytochrome  $b_{558}$  membranaire, une augmentation de fixation des IgG aux PMN (4) et l'activation du complexe NADPH oxydase. (5) Les PMN sont activés et génèrent des ions superoxydes dans le milieu extracellulaire.

Le rôle du « priming » dans l'activation des PMN médiés par les anticorps anti-HLA-A2 est également un point essentiel à étudier, notamment au niveau de la NADPH oxydase avec la relocalisation de Nox2 au niveau de la membrane plasmique, la phosphorylation partielle de p47<sup>phox</sup> (El-Benna *et al.* 2016), ou encore au niveau de la translocation des récepteurs Fc $\gamma$  dans les radeaux lipidiques.

Il serait intéressant de confirmer si, *in vitro*, en isolant les microdomaines lipidiques membranaires, le « priming » des PMN et/ou l'activation des PMN par les anticorps anti-HLA conduit au recrutement du complexe NADPH oxydase et des récepteurs Fc $\gamma$  au niveau des radeaux lipidiques membranaires des PMN.

Ce modèle d'activation des neutrophiles par les anticorps anti-HLA proposé est très semblable au processus pathologique des vascularites associées aux ANCA (Kettritz 2012). Il s'agit de vascularites systémiques inflammatoires nécrosantes qui sont des maladies auto-immunes typiques. Les ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies) sont des auto-

anticorps dont les cibles antigéniques correspondent aux granules cytoplasmiques des neutrophiles : la protéinase 3 (PR3) ou la myéloperoxydase (MPO). Les ANCA IgG se lient à la membrane des neutrophiles par leur fragment F'(ab)<sub>2</sub> *via* leur cible cellulaire et initie une cascade de signalisation intracellulaire. La coopération des fragments Fc $\gamma$  des ANCA qui se fixent aux récepteurs Fc $\gamma$  améliorent le pontage des neutrophiles entre eux et optimisent les fonctions d'activation des neutrophiles (dégranulation, la migration transendothéliale, la génération d'anions superoxyde etc.).

Enfin, chez le patient transfusé, les situations favorisant la survenue du TRALI sont par définition des situations dans lesquelles le malade présente des facteurs de « pré-stimulation » de ses neutrophiles mais qui sont, *a priori*, incapables à elles seules d'aboutir à un œdème lésionnel pulmonaire puisqu'elles ne fournissent pas le stimulus activant les neutrophiles. Les facteurs de risque cités dans la revue générale de la littérature nous donnent une idée des situations pathologiques et thérapeutiques des patients à risque mais cette liste n'est pas exhaustive. Au vu des résultats déjà acquis, l'identification de marqueurs de susceptibilité en faveur de la survenue du TRALI suggère l'existence de paramètres stratégiques pour le dépistage d'une population dite « à risque ». Une des pistes pourrait être d'évaluer la proportion de la VE-cadhérine clivée (fragment soluble de la VE-cadhérine) dans le sang entre une cohorte de patients « à risque » par rapport à une cohorte de patients « non à risque ». La recherche de cette protéine sanguine est motivée par des travaux publiés récemment portant sur l'étude de la VE-cadhérine soluble comme marqueur de suivi de la polyarthrite rhumatoïde, pathologie rhumatismale inflammatoire (Sidibé et al. 2012 ; Vilgrain et al. 2013). Dans le sang de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, ils ont identifié la présence du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine dont le taux était corrélé aux critères d'activité de la maladie. Dans le TRALI, l'identification d'un biomarqueur sanguin, tel que la VE-cadhérine clivée, pourrait permettre de mettre en place un test prédictif pour identifier les patients « à risque » afin de leur proposer un traitement à visée préventive. La proposition d'un traitement prophylactique ciblerait les intervenants cellulaires reconnus comme critiques, en particulier l'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale. Les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhérence : les sélectines. Il s'agit d'une famille de glycoprotéines qui assure l'adhérence des leucocytes à l'endothélium : stimulées par une inflammation locale, les cellules endothéliales exposent leur sélectine-P puis leur sélectine-E à leurs ligands leucocytaires. Il a été décrit que C1 Inhibiteur, glycoprotéine circulante à activité serpine (« *serine protease inhibitor* »), pouvait se lier aux sélectines des cellules endothéliales et contrarier l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Cai et al. 2003). Plus récemment, une équipe de chercheurs néerlandais constata que l'injection rapide de C1 inhibiteur chez des souris pour lesquelles le TRALI a été induit, diminuait l'atteinte pulmonaire (Müller et al. 2014).

Si elle est validée expérimentalement, cette option thérapeutique pourrait constituer un traitement ayant pour objet la réduction de l'adhérence cellulaire et du déclenchement du processus pathologique avec l'application de concentré de C1 Inhibiteur thérapeutique (Berinert®, Cinryze®).

Ce travail de thèse contribue à la compréhension des phénomènes physiopathologiques conduisant au TRALI et souligne le rôle central du neutrophile dans ce processus. Le neutrophile est une cellule essentielle de l'immunité innée. Il possède des propriétés fonctionnelles opposées puisqu'il participe à la défense de l'organisme contre les agents pathogènes mais peut également engendrer de graves dommages tissulaires par le relargage non-contrôlé de protéases et de dérivés réactifs de l'oxygène. Les hypothèses physiopathologiques citées tout au long de ce travail ont aussi mis en avant le rôle majeur du neutrophile en s'appuyant sur plusieurs modèles expérimentaux allant des tests sur volontaires sains (Brittingham et al. 1957) à des modèles animaux en passant par des modèles *ex vivo* d'organes isolés ou *in vitro* de cellules vasculaires endothéliales humaines en culture. En accord avec les résultats expérimentaux du travail de ma thèse, l'ensemble de ces modèles ont apporté des informations précieuses dans la compréhension du mécanisme. Enfin, mon travail pose des bases stratégiques expérimentales avec un rationnel pour la prévention du TRALI et l'amélioration de la connaissance de ce syndrome dans le but de réduire son incidence.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

### A

**Abo A.**, Pick E., Hall A., Totty N., Teahan C.G., Segal A.W. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353:668-670.

**Abo A.**, Boyhan A., West I., Thrasher A.J., Segal A.W. (1992) Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: p67-phox, p47-phox, p21rac1, and cytochrome b-245. *J Biol Chem* 267:16767-70.

**Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (anciennement Afssaps)**, Analyse descriptive des incidents transfusionnels: TRALI. *Bulletin Afssaps*, 2004: p. 6

**Ahmed S.**, Prigmore E., Govind S., Veyard C., Kozma R., Wientjes F.B., Segal A.W., Lim L. (1998) Cryptic Rac-binding and p21(Cdc42Hs/Rac)-activated kinase phosphorylation sites of NADPH oxidase component p67(phox). *J Biol Chem* 273 :5693-701.

**Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (ANSM)**. Rapport annuel Hémovigilance 2014. Saint-Denis : ANSM ; 2014. [en ligne].  
[http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/4ee5a6f35365ab8b2ab1ad5eaccb5bd6.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/4ee5a6f35365ab8b2ab1ad5eaccb5bd6.pdf).

**Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (ANSM)**. Rapport annuel Hémovigilance 2009. Saint-Denis : ANSM ; 2009. [en ligne].  
[http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/0dd2cd67b2710f0ca2a1baff80d5e7ad.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/0dd2cd67b2710f0ca2a1baff80d5e7ad.pdf)

**Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)** en collaboration avec la Haute Autorité de Santé (HAS). Transfusion de plasma thérapeutique: Produits, indications – Actualisation 2012 des recommandations. Paris : 2012.

**Alam A.**, Lin Y, Lima A, Hansen M, Callum JL. (2013) The prevention of transfusion-associated circulatory overload. *Transfus Med Rev.* 27:105-112.

**Almkvist J.**, Fäldt J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. (2001) Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. *Infect Immun.* 69:832–837.

**Amaya Y.**, Yamazaki K., Sato M, Noda K., Nishino T., Nishino T. (1990) Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O<sub>2</sub>-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem* 265:14170-14175.

**Andriopoulou P.**, Navarro P., Zanetti A., Lampugnani M. G. and Dejana E. (1999) Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2286-97.

**Androutsos G.** (2004) Paul Ehrlich (1854-1915): founder of chemotherapy and pioneer of haematology, immunology and oncology. *9:485-91.*

**Aplin A.E.**, Howe A., Alaharl S.K., Juliano R.I. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews* 50:197-263.

**Ashbaugh D.G.**, Bigelow D.B., Petty T.L., Levine B.E. (1967) Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2:319-323.

**B**

- Babior** B.M., Kipnes R.S., Curnutte J.T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52 :741-4.
- Babior**, B.M. (1997) Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res.* 30:141-55.
- Badou** G, Bantmann B, Cardin H, Casteret AM, Malaurie G, Mazzolini A, Moliere H, Noel AP, Nothias JL, Parinaud F. (1995), French journalism defended. *Nature* 375:444.
- Baggiolini** M., Dewald B., Moser B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 55: 97-179.
- Banfi** B., Molnar G., Maturana A., Steger K., Hegedus B., Demaurex N., and Krause K.H. (2001) A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276:37594-601.
- Barnard** R.D (1951) Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *N Y State J Med.* 51:2399-2402.
- Bartsch** C, Bekhite MM, Wolheim A, Richter M, Ruhe C et al. (2011) NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic acid treatment. *Free radical biology & medicine* 51: 432-443.
- Basuroy** S., Bhattacharya S., Leffler C.W., Parfenova H. (2009) Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *American journal of physiology* 296: C422-432.
- Bedard** K., Krause K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87:245-313.
- Belcher** J.D., Chen C., Nguyen J., Milbauer L., Abdulla F., Alayash A.I., Smith A., Nath K.A., Hebbel R.P., Vercellotti G.M. (2014) Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* 123:377-90.
- Bernard** GR, Artigas A, Brighan KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R.(1994) Report of the American-european consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus committee. *J Crit Care.* 9:72-81.
- Betbèze** V., Cottureau A., Bourreille G., Bignon J.D., Masseur A., Muller J.Y., Hamidou M. (2007) Post-transfusion acute lung injury (Trali) after plasma infusion in a patient having a constitutional thrombotic microangiopathy. *Rev Med Interne* 28:498-500.
- Bian** H., Reed E.F. (1999) Alloantibody-mediated class I signal transduction in endothelial cells and smooth muscle cells: enhancement by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol.* 163:1010-1018.
- Biberstine-Kinkade** K.J., DeLeo F.R., Epstein R.I., LeRoy B.A., Nauseef W.M., Dinuer M.C. (2001) Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem.* 276:31105-31112.
- Bjorkman** P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 329:506-512.
- Bokoch** G.M., Quilliam L.A., Bohl B.P., Jesaitis A.J., Quinn M.T. (1991) Inhibition of Rap1A binding to cytochrome b558 of NADPH oxidase by phosphorylation of Rap1A. *Science* 254:1794-6.
- Boneu** B., Cazenave J. (1997) Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 2ème éd. Boehringer Ingelheim France, pp8- 15.

- Bonnefont-Rousselot D.** (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5:561-8.
- Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA.** (1983) Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol.* 97:52-61
- Borregaard N.** (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33:657-670.
- Boudot O.** Transfusion sanguine une grande aventure humaine. Paris : Mémoires d'Hommes, Histoires d'Entreprises, 2009, 175p.
- Boulat C.** (2013), Transfusion and sickle cell disease. *Transfus Clin Biol.* 20:68-71.
- Boulay F., Tardif M., Brouchon L., Vignais P.** (1990) The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 29:11123-33.
- Bournazos S., Hart S.P., Chamberlain L.H, Glennie M.J., Dransfeld I.** (2009) Association of Fcγ3a (CD32a) with lipid rafts regulates ligand binding activity. *Immunol* 182:8026-8036.
- Boussetta T., Gougerot-Pocidallo M.A., Hayem G., Ciappelloni S., Raad H., Arabi Derkawi R., Bournier O., Kroviarski Y., Zhou X.Z., Malter J.S., Lu P.K., Bartegi A., Dang P.M., El Benna J.** (2010) The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-α-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* 116:5795-802.
- Böyum A.** (1997) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Introduction Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 97:97
- Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT.** (2002) An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *American journal of physiology* 282:1212-1224.
- Brechard S., Tschirhart E.J.** (2008) Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J Leukoc Biol* 84:1223-37.
- Brechard S., Brunello A., Bueb J.L., and Tschirhart E.J.** (2006) Modulation by cADPr of Ca<sup>2+</sup> mobilization and oxidative response in dimethylsulfoxide- or retinoic acid-differentiated HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1763:129-36.
- Brent L.** (1997) A history of transplantation immunology. San Diego: Academic Press
- Brittingham T.E., Chaplin H. Jr.** (1957) Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets. *J Am Med Assoc.* 165:819-825.
- Broman MT, Kouklis P, Gao X, Ramchandran R, Neamu RF, Minshall RD, Malik AB.** (2006) Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing α-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circ Res* 98:73-80;
- Buckle A.M, Hogg N.** (1989) The effect of IFN-γ and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol.* 143:2295-2301.
- Bux J.** (1999) Nomenclature of granulocyte alloantigens. ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, Granulocyte Antigen Working Party. *International Society of Blood Transfusion. Transfusion* 39:662-3.
- Bux J.** (2005) Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang.* 89:1-10.



**Bux J**, Becker F, Seeger W, Kilpatrick D, Chapman J, Waters A. (1996) Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br J Haematol.* 93:707-713.

**Bux J**, Sachs U.J. (2007) The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol.* 136:788-799.

## C

**Cadenas E**, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine* 29: 222-230.

**Cai S.**, Davis A.E. (2003) Complement Regulatory Protein C1 Inhibitor Binds to Selectins and Interferes with Endothelial-Leukocyte Adhesion. *J Immunology* 171:4786-4791.

**Campion Y.**, Paclet M.H., Jesaitis A.J., Marques B., Grichine A., Berthier S., Lenormand J.L., Lardy B., Stasia M.J., Morel F. (2007) New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. *Biochimie* 89:1145-58.

**Campion Y.**, Jesaitis A.J., Nguyen M.V., Grichine A., Herenger Y., Baillet A., Berthier S., Morel F., Paclet M.H. (2009) New p22-phox monoclonal antibodies: identification of a conformational probe for cytochrome b 558. *J Innate Immun.* 1:556-69.

**Carlos T.M.**, Harlan L.M (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84 :2068-2101.

**Carman C. V.**, Sage P. T., Sciuto T. E., de la Fuente M. A., Geha R. S., Ochs H. D., Dvorak H. F., Dvorak, A. M., Springer T. A. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 26 :784-97.

**Carmeliet P**, Collen, D. (1999). Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 237 :133-58

**Carr A. C.**, McCall M.R., Frei B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1716-1723.

**Carrick D.M.**, Johnson B., Kleinman S.H., Vorhaben R., Chance S.C., Lee J.H., Roback J.D., Pandey S., Sun Y., Busch M.P., Norris P.J. :Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II). (2011) Agreement among HLA antibody detection assays is higher in ever-pregnant donors and improved using a consensus cutoff. *Transfusion* 51:1105-16.

**Carroll M.C.**, Campbell R.D., Bentley DR, Porter RR. (1984) A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* 307:237-41.

**Cassatella MA.** (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16 : 21-6.

**Cassatella M.A.** (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.* 73 : 369-509.

**Castellon X.**, Bogdanova V. (2016) Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction. *Aging Dis.* 7:81-9.

**Chanock SJ**, El-Benna J, Smith RM, Babior BM. (1994) The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 269:24519–24522.

**Chamulitrat W.**, Stremmel W., Kawahara T., Rokutan K., Fujii H. (2004) A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 122: 1000-1009.

- Chapman CE**, Stainsby D, Jones H, Love E, Massey E, Win N, Navarrete C, Lucas G, Soni N, Morgan C, Choo L, Cohen H, Williamson LM; (2009) Serious Hazards of Transfusion Steering Group. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion* 49:440-452
- Chen F.**, Haigh S., Barman S., Fulton DJ (2012) From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol* 3: 412.
- Cheng G.**, Cao Z., Xu X., van Meir E.G., Lambeth J.D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269:131-140.
- Chertov O.**, Yang D., Howard O.M., Oppenheim J.J. (2000) Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev.*177:68-78.
- Chessa T.A.**, Anderson K.E., Hu Y., Xu Q., Rausch O., Stephens L.R., and Hawkins P.T. (2010), Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood* 116:6027-36.
- Choi K**, Ryu SW, Song S, Choi H, Kang SW. (2009) Caspase-dependent generation of reactive oxygen species in human astrocytoma cells contributes to resistance to TRAIL-mediated apoptosis. *Cell death and differentiation* 17: 833-845.
- Chu HT**, Lin H, Tsao TT, Chang CF, Hsiao WW, Yeh TJ, Chang CM, Liu YW, Wang TY, Yang KC, Chen TJ, Chen JC, Chen KC, Kao CY. (2013) Genotyping of human neutrophil antigens (HNA) from whole genome sequencing data. *BMC Med Genomics* 2:31-39.
- Code de la Santé Publique.** Loi n° 93-5 du 4 janvier 1993, relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament. Paris : Dalloz, 1993. p.1412 Code de la Santé Publique. Loi n° 93-5 du 4 janvier 1993, relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament. Paris : Dalloz, 1993. p.1412 Code de la Santé Publique. Loi n° 93-5 du 4 janvier 1993, relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament. Paris : Dalloz, 1993. p.1412
- Coffin J**, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P. (1986) What to call the AIDS virus? *Nature* 321:10.
- Cohn Z.A.**, Hirsch, J.G. (1960) The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 112 :983-1004.
- Cowland J.B.**, Borregaard N. (2016) Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev.* 273:11-28.
- Creamer P**, Edmonds J, Sullivan J, Matthews S. (1992) Measurement of HLA class I expression in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 51:1138-1142.
- Crespin R**, Danic B. (2013) La sélection médicale des candidats au don : représentations et pratiques du risque et de son traitement. *Transfus Clin Biol* 20 :261-284.
- Cross A.R** (2000) p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem J.* 349:113-117.
- Cross A.R.**, Segal A.W. (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657 :1-22.

**D**

**Daëron M** (1997). Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 15:203.

**Dang P.M., Dewas C., Gaudry M., Fay M., Pedruzzi E., Gougerot-Pocidallo M.A., and El Benna J.** (1999) Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *J Biol Chem* 274:20704-8.

**Dang P.M., Morel F., Gougerot-Pocidallo M.A., El Benna J.** (2003) Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry* 42:4520-6.

**Dausset J.** (1958) Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol.* 20:156-166.

**DeLeo F.R., Burritt J.B., Yu L., Jesaitis A.J., Dinauer M.C., Nauseef W.M.** (2000) Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 275:13986-93.

**De Clippel D., Baeten M., Torfs A., Emonds M.P., Feys H.B., Compennolle V., Vandekerckhove P.**(2014) Screening for HLA antibodies in plateletpheresis donors with a history of transfusion or pregnancy 54:3036-3042.

**De Deken X., Wang D., Dumont J.E., Miot F.** (2002) Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H(2)O(2)-generating system. *Exp Cell Res* 273:187-196.

**Dejana E., Bazzoni G., Lampugnani M.G.** (1999). The role of endothelial cell-to-cell junctions in vascular morphogenesis. *Thrombosis and Haemostasis* 82 :755-761.

**Dejana E.** (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:261-70.

**Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG.** (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.*121:2115-22.

**Dejana E., Tournier-Lasserre E., Weinstein B. M.** (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell* 16 :209-21.

**Dekker L.V., Leitges M., Altschuler G., Mistry N., McDermott A., Roes J., and Segal A.W.** (2000) Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J* 347:285-9.

**Dieterlen-Lievre F., Le Douarin N. M.** (2004). From the hemangioblast to selftolerance:a series of innovations gained from studies on the avian embryo. *Mech Dev* 121 :1117-28.

**Diez-Fraile A., Meyer E., and Burvenich C.** (2002), Regulation of adhesion molecules on circulating neutrophils during coliform mastitis and their possible immunomodulation with drugs. *Vet Immunol Immunopathol* 86:1-10.

**Dinarello C.A.** (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118 : 503-8.

**Dinauer M.C., Pierce E.A., Bruns G.A., Curnutte J.T., Orkin S.H.** (1990) Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 86:1729-1737.

**Dooren M.C., Ouwehand W.H., Verhoeven A.J., von dem Borne A.E., Kuijpers R.W.** (1998) Adult respiratory distress syndrome after experimental intravenous gamma-globulin concentrate and monocyte-reactive IgG antibodies. *Lancet* 352:1601-1602.

**Dresch C., Najean Y., Bauchet J., and Bernard J.** (1972) [Hematologic abnormalities in evolutive chronic polyarthritis. Radioisotopic investigation]. *Nouv Presse Med* 1:163-70.

**Dry S.M.,** Bechard K.M., Milford E.L., Churchill W.H., Benjamin R.J. (1999) The pathology of transfusion-related acute lung injury. *Am J Clin Pathol* 112:216-21.

## E

**Ebnet K.,** Iden S., Gerke V., Suzuki A. (2008). Regulation of epithelial and endothelial junctions by PAR proteins. *Front Biosci* 13,:6520-36.

**Eder A.F.,** Herron R.M. Jr, Strupp A. (2010) Effective reduction of transfusion-related acute lung injury risk with malepredominant plasma strategy in the American Red Cross (2006-2008). *Transfusion* 50:1732-42.

**EI-Benna J.,** Dang PM, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C. (2005) Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53:199-206.s

**EI-Benna J.,** Dang PM, Gougerot-Pocidal MA. (2008) Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 30:279–289.

**EI-Benna J.,** Dang P.M., Gougerot-Pocidal M.A., Marie J.C., Braut-Boucher F. (2009) p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med*.41:217-25.

**EI Benna J.,** Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Marie J.C., Gougerot-Pocidal M.A., Dang P.M. (2016) Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev.*;273:180-93.

**Elbim C.,** Bailly S., Chollet-Martin S., Hakim J., and Gougerot-Pocidal M.A. (1994) Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial Nformyl peptides. *Infect Immun.* 62:2195-201.

**Elliott HL.** (1998) Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: risk factor, risk marker, or surrogate end point? *J Cardiovasc Pharmacol.* 32 Suppl 3:S74-7.

**Endres R.O.,** Kleinman S.H., Carrick D.M., Steele W.R., Wright D.J., Norris P.J., Triulzi D., Kakaiya R., Busch M.P. (2010) National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II. Identification of specificities of antibodies against human leukocyte antigens in blood donors. *Transfusion* 50:1749-1760.

**Engelhardt B.,** Wolburg H. (2004). Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 34:2955- 63.

**Erlich HA,** Opelz G, Hansen J. (2001) HLA DNA typing and transplantation. *Immunity* 14:347-356.

**Esser S.,** Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E. and Risau, W. (1998) Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* 111:853-65.

## F

**Feldmann M.,** Brennan F.M., Chantry D., Haworth C., Turner M., Katsikis P., Londei M., Abney E., Buchan G., Barrett K. (1991) Cytokine assays: role in evaluation of the pathogenesis of autoimmunity. *Immunol Rev.*119:105-23.

**Féléto M.,** Vanhoutte P.M. (2006) Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291:H985-1002.

**Feng X.** and Chen H. (1999). [Activation of neutrophil and its relation to neutrophil-endothelial cell adherence]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 30:8-11.

**Ferguson** E, Farrell K, Lawrence C. (2008), Blood donation is an act of benevolence rather than altruism. *Health Psychology* 27 :327-336.

**US Food and Drug Administration**, Center for Biologics Evaluation & Research. Fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion: annual summary for fiscal year 2012. FDA ;2012. [en ligne].

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/ucm346639.htm#B>.

**Ford-Hutchinson** A.W., Bray M.A., Doig M.V., Shipley M.E., Smith M.J. (1980) Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-265.

**Fuchs** T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.*176:231-241.

**Furchgott** R.F., Vanhoutte PM. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3:2007-18.

## G

**Gabig** T.G., Crean C.D., Mantel P.L., Rosli R. (1995) Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. *Blood* 85:804-11.

**Gajic** O., Rana R., Winters J.L., Yilmaz M., Mendez J.L., Rickman O.B., O'Byrne M.M., Evenson L.K., Malinchoc M., DeGoey S.R., Afessa B., Hubmayr R.D., Moore S.B. (2007) Transfusion-related acute lung injury in the critically ill: prospective nested case-control study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176:886-891.

**Gandhi** MJ, Carrick DM, Jenkins S, De Goey S, Ploeger NA, Wilson GA, Lee JH, Winters JL, Stubbs JR, Toy P, Norris PJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Specialized Center of Clinically Oriented Research TRALI Study and Retrovirus Epidemiology Donor Study-II. (2013) Lot-to-lot variability in HLA antibody screening using a multiplexed bead-based assay. *Transfusion* 53:1940-7.

**Gao** X., Kouklis P., Xu N., Minshall R. D., Sandoval R., Vogel S. M., Malik A. B. (2000). Reversibility of increased microvessel permeability in response to VEcadherin disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:1218-25.

**Gavard** J., Gutkind J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* :1223-34.

**Geiszt** M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8010-8014.

**Geiszt** M., Dagher M.C., Molnar G., Havasi A., Faure J., Paclet M.H., Morel F., and Ligeti E. (2001), Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *Biochem J* 355:851-8.

**Gibson** T., Medawar P.B. (1943) The fate of skin homografts in man. *J Anat.* 77:299-310.

**Gimbrone** M.A. Jr. (1995) Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 75: 67B-70B

**Ginsel** L.A., Onderwater J.J., Fransen J.A., Verhoeven A.J., Roos D. (1990) Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood* 76:2105-16.

**Goldstein** I.M., Malmsten C.L., Kindahl H., Kaplan H.B., Rådmark O., Samuelsson B., Weissmann G. (1978) Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 148:787-792.

**Gottlieb MS**, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. (1981), Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305:1425-31.

**Grange L.**, Nguyen M.V., Lardy B., Derouazi M., Champion Y. (2006) NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxidants & redox signaling* 8: 1485-1496.

**Griendling K.K.**, FitzGerald G.A. (2003a) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108:1912-6.

**Griendling K.K.**, FitzGerald G.A (2003b). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108(:2034-40.

**Groemping Y.**, Rittinger K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J.* 386:401-16.

**Guichard C.**, Pedruzzi E., Fay M., Ben Mkaddem S., Coant N., Daniel F., Ogier-Denis E. (2006) The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases. *Med Sci (Paris)* 22:953-959.

**Gumbiner B. M.** (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 :622-34.

## H

**Haefliger J.A.**, Nicod P., Meda P. (2004) Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res.* 62:345-56.

**Halloran P.F.**, Schlaut J., Solez K., Srinivasa N.S. (1992) The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 53:550-555.

**Ham E.A.**, Soderman D.D., Zanetti M.E. (1983) Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4 release from activated neutrophils. *Proc Natl Acad Sci.* 80:4349-53.

**Han C.H.**, Nisimoto Y., Lee S.H., Kim E.T., Lambeth J.D. (2001) Characterization of the flavoprotein domain of gp91phox which has NADPH diaphorase activity. *J Biochem* 129:513-20.

**Hashimoto S.**, Nakajima F., Kamada H., Kawamura K., Satake M., Tadokoro K., Okazaki H. (2010) Relationship of donor HLA antibody strength to the development of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 50:2582-2591.

**Hazan-Halevy I.**, Levy R. (2000) Activation of cytosolic phospholipase A2 by opsonized zymosan in human neutrophils requires both ERK and p38 MAP-kinase. *Adv Exp Med Biol* 479:115-23.

**Hébert PC**, Carson JL. (2014) Transfusion threshold of 7 g per deciliter - the new normal. *N Engl J* 371:1459–61.

**Henson P. M.** (1969). The adherence of leucocytes and platelets induced by fixed IgG antibody or complement. *Immunology* 16:107-121.

**Hentunen T. A.**, Jackson S. H., Chung H, Reddy S. V. , Lorenzo J., Choi S. J. ,Roodman, G. D. (1999). Characterization of immortalized osteoclast precursors developed from mice transgenic for both bcl-X(L) and simian virus 40 large T antigen. *Endocrinology* 140 :2954-2961.

**Hermant B.**, Bibert S., Concord E., Dublet B., Weidenhaupt M., Vernet T., Gulino-Debrac D. (2003) Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *The Journal of biological chemistry* 278 :14002-12.

**Herren B.**, Levkau B., Raines E. W. and Ross R. (1998). Cleavage of betacatenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Molecular biology of the cell* 9 :1589-601

**Hii C.S.**, Ferrante A. (2007) Regulation of the NADPH oxidase activity and anti-microbial function of neutrophils by arachidonic acid. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 55 :99-110.

**Hicks A.**, Monkarsh S.P., Hoffman A.F. (2007) Leukotriene B4 receptor antagonists as therapeutics for inflammatory disease: preclinical and clinical developments. *Expert Opin Investig Drugs* 16:1909-20.

**Hopkins K.A.** (2001) The basic lymphocyte microcytotoxicity tests: standard and AHG enhancement. 4e ed. Lenexa: ASHI Laboratory Manual.

**Hu G.**, Ye R.D., Dinauer M.C., Malik A.B., and Minshall R.D. (2008) Neutrophil caveolin-1 expression contributes to mechanism of lung inflammation and injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:178-86.

## I

**Ichinose Y.**, Hara N., Ohta M., Aso H., Chikama H., Kawasaki M., Kubota I., Shimizu T., Yagawa K. (1990) Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide maintain the phenotype of and superoxide anion generation by neutrophils. *Infect Immun.* 58:1647-1652.

**Indik Z. K.**, Park J.G., Hunter S., Schreiber A.D. (1995). The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86:4389-4399.

**Insunza A.**, Romon I., Gonzalez-Ponte M.L., Hoyos A., Pastor J.M., Iriondo A., Hermosa V. (2004) Implementation of a strategy to prevent TRALI in a regional blood centre. *Transfus Med.* 14:157-64.

**Ito T.**, Matsui Y., Ago T., Ota K., Sumimoto H. (2001) Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *Embo J* 20:3938-46.

## K

**Kanai F.**, Liu H., Field S.J., Akbary H., Matsuo T., Brown G.E., Cantley L.C., Yaffe M.B. (2001) The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 3 :675-8.

**Kang E.M.**, Malech H.L. (2009) Advances in treatment for chronic granulomatous disease. *Immunol Res.* 43:77-84.

**Kao G.S.**, Wood I.G., Dorfman D.M., Milford E.L., Benjamin R.J. (2003) Investigations into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI. *Transfusion* 43:185-191.

**Katsuyama M.** (2010) NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. *Journal of pharmacologicalsciences* 114:134-146.

**Khan S.Y.**, Kelher M.R., Heal J.M., Blumberg N., Boshkov L.K., Phipps R., Gettings K.F., McLaughlin N.J., Silliman C.C. (2006) Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* 108:2455-2462.

**Kelher M.R.**, Masuno T., Moore E.E., Damle S., Meng X., Song Y., Liang X., Niedzinski J., Geier S.S., Khan S.Y., Gamboni-Robertson F., Silliman CC. (2013) Plasma from stored packed red blood cells and MHC class I antibodies causes acute lung injury in a 2-event in vivo rat model. *Blood* 113:2079-2087.

**Keller-Stanislawski B.**, Reil A., Günay S., Funk M.B.(2010) Frequency and severity of transfusion-related acute lung injury-German haemovigilance data (2006-2007).*Vox Sang.* 98:70-77.

- Kelher MR**, Masuno T, Moore EE, Damle S, Meng X, Song Y, Liang X, Niedzinski J, Geier SS, Khan SY, Gamboni-Robertson F, Silliman CC (2009). Plasma from stored packed red blood cells and MHC class I antibodies causes acute lung injury in a 2-event in vivo rat model. *Blood* 113:2079-2087.
- Kettritz R.** (2012) How anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies activate neutrophils. *Clinical and Experimental Immunology*, 169: 220–228
- Kim KS**, Choi HW, Yoon HE, Kim IY (2010) Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry* 285: 40294-40302.
- Kissmeyer-Nielsen F.**, Svejgaard A., Hauge M (1968). Genetics of the human HLA transplantation system. *Nature* 219:1116-9.
- Klein J**, Sato A. (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 343:702-9.
- Klein H.G**, Spahn D.R, Carson J.L. (2007), Red blood cell transfusion in clinical practice 370 : 415-426.
- Kleinman S**, Caulfield T, Chan P, Davenport R, McFarland J, McPhedran S, Meade M, Morrison D, Pinsent T, Robillard P, Slinger P. (2004) Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 4: 1774-1789.
- Kleinman S.H.**, Triulzi D.J., Murphy E.L., Carey P.M., Gottschall J.L., Roback J.D., Carrick D., Mathew S., Wright D.J., Cable R., Ness P., Gajic O., Hubmayr R.D., Looney M.R., Kakaiya R.M.; National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II. (2011) The Leukocyte Antibody Prevalence Study-II (LAPS-II): a retrospective cohort study of transfusion-related acute lung injury in recipients of high-plasma-volume human leukocyte antigen antibody-positive or -negative components. *Transfusion* 51:2078-91.
- Kleinschnitz C**, Grund H, Wingler K, Armitage ME, Jones E et al. (2010) Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS biology* 8.
- Knaus U.G.**, Heyworth P.G., Evans T., Curnutte J.T., Bokoch GM.(1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254:1512-5.
- Koga H.**, Terasawa H., Nunoi H., Takeshige K., Inagaki F., and H. Sumimoto H. (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274:25051-25060.
- Kolaczkowska E.**, Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 13:159-75.
- Kopko PM**, Popovsky MA, MacKenzie MR, Paglieroni TG, Muto KN, Holland PV. (2001) HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 41:1244-1248
- Kopko P.M.**, Marshall C.S., MacKenzie M.R., Holland P.V., Popovsky M.A. (2002) Transfusion-related acute lung injury: report of a clinical look-back investigation. *JAMA* 287:1968-1971.
- Kopko PM**, Paglieroni TG, Popovsky MA, Muto KN, MacKenzie MR, Holland PV. (2003) TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion* 43:177-184.
- Kopko P.M.** (2004) Leukocyte antibodies and biologically active mediators in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury. *Curr Hematol Rep* 3:456-461.
- Kuhns D.B.**, Alvord W.G., Heller T., Feld J.J., Pike K.M., Marciano B.E. (2010) Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 363:2600-2610.



**Khwaja A.**, Carver J.E., and Linch D.C. (1992) Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor alpha in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood* 79:745-53.

## L

**Labadia M.E.**, Bokoch G.M., Huang C.K. (1993) The Rap1A protein enhances protein kinase C activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 195 :1321-8.

**Lampugnani M.G.**, Orsenigo F., Gagliani M.C., Tacchetti C., Dejana E. (2006) Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol.*174:593-604.

**Lapinet J.A.**, Scapini P., Calzetti F., Pérez O., Cassatella M.A. (2000) Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun.* 68:6917-6923.

**Lapouge K.**, Smith S.J., Groemping Y., Rittinger K. (2002) Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 277 :10121-8.

**Lassegue B.**, San Martin A., Griendling K.K. (2012) Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation research* 110: 1364-1390.

**Lay W. H.**, Nussenzweig V. (1969) Ca<sup>++</sup>-dependent binding of antigen-19 S antibody complexes to macrophages. *Immunol* 102:1172-1178.

**Leach M**, Vora AJ, Jones DA, Lucas G. (1998) Transfusion-related acute lung injury (TRALI) following autologous stem cell transplant for relapsed acute myeloid leukaemia: a case report and review of the literature. *Transfus Med.* 8:333-7.

**Legrand Y.** (1987) *Le Sang et les vaisseaux*. Ed. Hermann, France, pp3-29

**Lee I.T.**, Shih R.H., Lin C.C., Chen J.T., Yang C.M. (2012) Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell Commun Signal.*10:33.

**Lemaitre B.**, Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-83.

**Lener B.**, Koziel R., Pircher H., Hutter E., Greussing R. (2009) The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *The Biochemical journal* 423: 363-374.

**Leveton LB**, Sox HC Jr, Stoto MA. (1996), HIV and the blood supply: an analysis of crisis decision making. Executive summary. The Institute of Medicine, National Academy of Sciences Committee to Study HIV Transmission Through Blood and Blood Products. *Transfusion* 36:919-27.

**Li Z.**, Jiang H., Xie W., Zhang Z., Smrcka A.V., Wu D. (2000) Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287:046-9.

**Lin L.L.**, Wartmann, M., Lin A.Y., Knopf J.L., Seth A., Davis R.J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72:269-78.

**Llewelyn C.A.**, Hewitt P.E, Knight R.S, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will R.G. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet.* 363:417-21.

**Lögberg L.E.**, Vikulina T., Zimring J.C., Hillyer C.D. (2009) Animal models of transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev.* 23:13-24.

**Looney MR**, Gropper MA, Matthay M.A (2004). Transfusion-related acute lung injury: a review. *Chest* 126:249-258.

**Looney M.R.**, Matthay M.A. (2006a) Animal models of transfusion-related acute lung injury *Crit Care Med.* 34:132-136.

**Looney M.R.**, Su X, Van Ziffle J.A., Lowell C.A., Matthay M.A. (2006b) Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 116:1615-1623

**Lloyd P.G.**, and Hardin C.D. (2001) Caveolae and the organization of carbohydrate metabolism in vascular smooth muscle. *J Cell Biochem* 82:399-408.

**Luplertlop N.**, Misse D., Bray D., Deleuze V., Gonzalez J. P., Leardkamolkarn V., Yssel H. and Veas F. (2006). Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep* 7:1176-81.

## M

**Madden D.R.** (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol.* 13:587-622.

**Maly F.E.**, Quilliam L.A., Dorseuil O., Der C.J., Bokoch G.M. (1994) Activated or dominant inhibitory mutants of Rap1A decrease the oxidative burst of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Biol Chem* 269:18743-6.

**Marasco W.A.**, Phan S.H., Krutzsch H., Showell H.J., Feltner D.E., Nairn R., Becker E.L., Ward, P.A. (1984) Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 259:5430-9.

**Marsh SG**; WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System (2016). Nomenclature for factors of the HLA system, update May 2016. *Hum Immunol.* S0198-8859(16)30455-4. [Epub ahead of print]

**Maślanka K.**, Smoleńska-Sym G., Michur H., Wróbel A., Lachert E., Brojer E. (2012) Lysophosphatidylcholines: bioactive lipids generated during storage of blood components. *Arch Immunol Ther Exp.*60:55-60.

**Masson E.**, Vidal C., Deschamps M., Bongain S., Thevenin C., Dupont I., Rietmulher D., Pouthier F., Mongaillard G., Chabod J., Ferrand C., Tiberghien P., Rebibou J.M. (2013) Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum Immunol.* 74:946-951.

**Matute J.D.**, Arias A.A., Wright N.A.M., Wrobel I., Waterhouse C.C.M., Li X.J. (2009) A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* 114:3309-3315.

**McColl S.R.**, Beauseigle D., Gilbert C., and Naccache P.H. (1990) Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha involves regulation at a post-cell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins. *J Immunol* 145:3047-53.

**McPhail L.C.**, Shirley P.S., Clayton C.C., Snyderman R. (1985) Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. *J Clin Invest* 75:1735-9.

**McKallip RJ**, Jia W, Schlomer J, Warren JW, Nagarkatti PS. (2006) Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Molecular pharmacology* 70: 897-908.

**Medzhitov R.**, Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-7.

**Messner R. P.**, Jelinek J. (1970) Receptors for human gamma G globulin on human neutrophils. *J Clin Invest* 49:2165-2171.

**Middelburg R.A.**, van der Bom J.G.(2015). Transfusion-related acute lung injury not a two-hit, but a multicausal model. *Transfusion* 55:953-60.

**Millan J.**, Hewlett L., Glyn M., Toomre D., Clark P., Ridley A. J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* 8:113-23.

**Miyazaki T.**, Taketomi Y., Takimoto M., Lei X.F., Arita S., Kim-Kaneyama J.R., Arata S., Ohata H., Ota H., Murakami M., Miyazaki A. (2011) m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation* 124:2522-32.

**Morel F.**, Doussiere J., Stasia M.J., Vignais, P.V. (1985) The respiratory burst of bovine neutrophils. Role of a b type cytochrome and coenzyme specificity. *Eur J Biochem* 152 :669-79.

**Mouche S.**, Mkaddem SB, Wang W, Katic M, Tseng YH. (2007) Reduced expression of the NADPH oxidase NOX4 is a hallmark of adipocyte differentiation. *Biochimica et biophysica acta* 1773:1015-1027.

**Moulding D.A.**, Akgul C., Derouet M., White M.R., and Edwards S.W. (2001) , BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol* 70:783-92.

**Mousavi S. A.**, Sporstol M., Fladeby C., Kjekken R., Barois N., Berg, T. (2007) Receptor-mediated endocytosis of immune complexes in rat liver sinusoidal endothelial cells is mediated by FcγR2b. *Hepatology*, 46 :871-884.

**Mukherjea D.**, Jajoo S, Kaur T, Sheehan KE, Ramkumar V et al. (2010) Transtympanic administration of short interfering (si)RNA for the NOX3 isoform of NADPH oxidase protects against cisplatin induced hearing loss in the rat. *Antioxidants & redox signaling* 13: 589-598.

**Müller M.C.**, Stroo I., Wouters D., Zeerleder S.S., Roelofs J.J., Boon L., Vroom M.B., Juffermans N.P. (2014) The effect of C1-inhibitor in a murine model of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang.* 107:71-5.

**Muller M.C.**, van Stein, D., Binnekade J.M., van Rhenen, D.J., Vlaar, A.P. (2015) Low-risk transfusion-related acute lung injury donor strategies and the impact on the onset of transfusion-related acute lung injury: a meta-analysis. *Transfusion* 55 :164–175.

## N

**Nakamura R.**, Sumimoto H., Mizuki K., Hata K., Ago T., Kitajima S., Takeshige K., Sakaki Y., Ito, T. (1998) The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Biochem* 251:583-9.

**Nebi T.**, Pestonjamas K.N., Leszyk J.D., Crowley J.L., Oh S.W., and Luna E.J. (2002) Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J Biol Chem* 277:43399-409.

**Nauseef W.M.**, Borregaard N. (2014) Neutrophils at work. *Nat Immunol.*15:602-611.

**Nieminen M.**, Henttinen T., Merinen M., Marttila-Ichihara F., Eriksson J. E. Jalkanen S. (2006). Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* 8:56-62.

- Nimmerjahn F.**, Ravetch J.V (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol.* 96:179-204.
- Nisimoto Y.**, Freeman J.L., Motalebi S.A., Hirshberg M., Lambeth J.D. (1997) Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 272:18834-41.
- Nisimoto Y.**, Motalebi S., Han CH., Lambeth JD. (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem.* 274:22999-3005.
- Nisimoto Y.**, Ogawa H., Miyano K., Tamura M. (2004) Activation of the flavoprotein domain of gp91phox upon interaction with N-terminal p67phox (1-210) and the Rac complex. *Biochemistry* 43:9567-75.
- Nishino T.**, Nishino T. (1997) The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem* 272:29859-29864.
- Noda K**, Zhang J, Fukuhara S, Kunimoto S, Yoshimura M, Mochizuki N. (2010) Vascular endothelial cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. *Mol Biol Cell* 21:584- 96.
- Nordhagen R**, Conradi M, Drömtorp SM. (1986) Pulmonary reaction associated with transfusion of plasma containing anti-5b. *Vox Sang.* 51:102-107.
- Nwariaku F.E.**, Liu Z., Zhu X, Nahari D, Ingle C., Wu R.F., Gu Y., Sarosi G., Terada L.S. (2004) NADPH oxidase mediates vascular endothelial cadherin phosphorylation and endothelial dysfunction. *Blood* 104:3214-3220.
- O**
- Olerup O**, Zetterquist H. (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39:225-235.
- Otsuka F.**, Finn A.V., Yazdani S.K., Nakano M., Kolodgie F.D., Virmani R. (2012) The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting. *Nat Rev Cardiol.* 9:439-53.
- P**
- Directive 2002/98/CE du **Parlement européen** et du Conseil du 27 janvier 2003 établissant des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain, et des composants sanguins, et modifiant la directive 2001/83/CE. *JOCE*,2003, N°L30 :33-40.
- Paffenholz R**, Bergstrom RA, Pasutto F. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev.*18 : 486-91.
- Payne R.** (1962) The development and persistence of leukoagglutinins in parous women. *Blood* 19:411-424.
- Peters AL**, Van Stein D, Vlaar AP. (2015) Antibody-mediated transfusion-related acute lung injury; from discovery to prevention. *Br J Haematol.* 170:597-614.
- Peters A.L.**, Vlaar A.P. (2016) Redefining transfusion-related acute lung injury: don't throw the baby out with the bathwater. *Transfusion* 56:2384-8.
- Piccoli C**, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A et al. (2005) Characterization of mitochondria and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *The Journal of biological chemistry* 280: 26467-26476.

- Piwkowska** A, Rogacka D, Audzeyenka I, Jankowski M, Angielski S (2011) High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes. *Journal of cellular biochemistry* 112: 1661-1672.
- Pham** C.T.N. (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature Reviews Immunology* 6:541-550.
- Phipps** R.P., Kaufman J., Blumberg N. (2001) Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet* 35:2023-2024.
- Phillips-Quagliata** J. M., Levine B.B., Uhr J.W. (1969) Studies on the mechanism of binding of immune complexes to phagocytes. *Nature* 222:1290-1291.
- Politis** C., Wiersum J.C., Richardson C., Robillard P., Jorgensen J., Renaudier P., Faber J.C., Wood E.M. (2016) The International Haemovigilance Network Database for the Surveillance of Adverse Reactions and Events in Donors and Recipients of Blood Components: technical issues and results. *Vox Sang.* [Epub ahead of print].
- Porter** R. R. (1972). Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. *Scand J Immunol* 34:381-389.
- Popovsky** M.A., Abel M.D., Moore S.B. (1985a) Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis.* 128:185-189
- Popovsky** M.A., Moore S.B. (1985b) Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 25:573-577
- Popovsky** M.A. (2000) Transfusion-related acute lung injury. *Curr Opin Hematol.* 7:402-407.
- Popovsky** MA. (2001) Transfusion and lung injury. *Transfus Clin Biol.* 8:272-277.
- Popovsky** M.A (2006) Pulmonary consequences of transfusion: TRALI and TACO. *Transfus Apher Sci.* 34:243-244.
- Powers** A, Stowell CP, Dzik WH, Saidman SL, Lee H, Makar RS (2008) Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion* 48:2549-2558.
- Pries** A.R., Kuebler W.M. (2006) Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 176 :1-40.

## R

- Raad** H., Paclet M. H., Bousseta T., Kroviarski Y., Morel F., Quinn M. T., Gougerot-Pocidallo M. A., Dang P. M. C. El-Benna J. (2009) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: Phosphorylation of gp91phox /NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox and p47phox. *FASEB J.* 23:1011-22.
- Raess** M., Fröhlich G., Roos M., Rüsi B., Wilhelm M.J., Noll G., Ruschitzka F., Fehr T., Enseleit F. (2013) Donor-specific anti-HLA antibodies detected by Luminex: predictive for short-term but not long-term survival after heart transplantation. *Transpl Int.* 26:1097-1107.
- Rebibo** D, Hauser L, Slimani A, Herve P, Andreu G (2003) The French Haemovigilance System: organization and results for 2003. *Transfus Apher Sci.* 31:145-153.
- Reinherz** E.L., Tan K., Tang L., Kern P., Liu J., Xiong Y., Hussey R.E., Smolyar A., Hare B., Zhang R., Joachimiak A., Chang H.C., Wagner G., Wang J. (1999) The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 286:1913-21.

**Renaudier P**, Rebibo D, Waller C, Schlanger S, Vo Mai MP, Ounnoughene N, Breton P, Cheze S, Girard A, Hauser L, Legras JF, Saillol A, Willaert B, Caldani C. (2009) Pulmonary complications of transfusion (TACO-TRALI). *Transfus Clin Biol*.16:218-232.

**République française**. Arrêté du 05 avril 2016 fixant les critères de sélection des donneurs de sang. JORF n°0085 du 10 avril 2016. p.1067.  
<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2016/4/5/AFSP1608360A/jo/texte>

**Revillard JP**. (2001) Immunologie. 4e ed. Bruxelles : DeBoeck.

**Ronot X**, Grunwald D, Mayol JF, Boutonnat J. (2010) La cytométrie en Flux. Editions : Tec & Doc – Lavoisier. Paris

**Roos D**. (1994) The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev*. 138:121-157.

**Rossi F.**, Zatti M. (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 20 :21-3.

**Royer-Pokora B.**, Kunkel L.M., Monaco A.P., Goff S.C., Newburger P.E., Baehner R.L., Cole F.S., Curnutte J.T., Orkin S.H. (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322:32-38.

## S

**Sabin F.R**. (2002) Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. 1917. *J Hematother Stem Cell Res*.11:5-7.

**Sachs U.J.**, Hattar K., Weissmann N., Bohle R.M., Weiss T., Sibelius U., Bux J. (2006) Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood* 107:1217-1219.

**Sachs U.J.**, Wasel W., Bayat B., Bohle R.M., Hattar K., Berghöfer H., Reil A., Bux J., Bein G., Santos S., Weissmann N. (2011) Mechanism of transfusion-related acute lung injury induced by HLA class II antibodies. *Blood* 117:669-677.

**Sakagawa H.**, Miyazaki T., Fujihara M., Sato S., Yamaguchi M., Fukai K., Morioka M., Kato T., Azuma H., Ikeda H. (2007) Generation of inflammatory cytokines and chemokines from peripheral blood mononuclear cells by HLA Class II antibody-containing plasma unit that was associated with severe nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 47:154-161.

**Sancho P.**, Bertran E., Caja L., Carmona-Cuenca I., Murillo M.M. (2009) The inhibition of the epidermal growth factor (EGF) pathway enhances TGF-beta-induced apoptosis in rat hepatoma cells through inducing oxidative stress coincident with a change in the expression pattern of the NADPH oxidases (NOX) isoforms. *Biochimica et biophysica acta* 1793: 253-263.

**Sanders S. A.**, Eisenthal R., Harrison R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *Eur J Biochem* 245:541-548.

**Saw C.L.**, Hannach B., Petrazsko T., Nickerson P. (2013) Blood donors implicated in transfusion-related acute lung injury with patient-specific HLA antibodies are more broadly sensitized to HLA antigens compared to other blood donors. *Transfusion* 53:518-525.

**Scharf S.J.**, Griffith R.L., Erlich H.A. (1991) Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum Immunol*.30:190-201.

**Schieber M.**, Chandel N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 24:453-462.

- Segal A.W., Jones O.T. (1978)** Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276:515-527.
- Segal A.W. (1987)** Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature* 326:88-91.
- Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. (2000)** Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 79:170-200.
- Seeger W., Schneider U., Kreusler B., von Witzleben E., Walmrath D., Grimminger F., Neppert J.(1990)** Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood* 76:1438-1444.
- Selvaraj P., Rosse W. R., Silber R., Springe T. A. (1988)** The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature*, 333, 565-567.
- Shao D., Segal A.W., and Dekker L.V. (2003)** Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett* 550:101-6.
- Sheppard C.A., Lögdberg L.E., Zimring J.C., Hillyer C.D. (2007)** Transfusion-related acute lung injury. *Hematol Oncol Clin North Am.* 21:163-176.
- Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K., Owada M.K., Nakaike R., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nagao T., Egashira K., Fujishima M., Takeshita A. (1996)** The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 28:703-11.
- Sidibé A., Mannic T., Arboleas M., Subileau M., Gulino-Debrac D. Bouillet L, Jan M., Vandhuick T., Le Loët X., Vittecoq O., Vilgrain I. (2012)** Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum.* 64:77-87.
- Silliman C.C., Clay K.L., Thurman G.W., Johnson C.A., Ambruso D.R. (1994)** Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase. *J Lab Clin Med.*124:684-694.
- Silliman C.C, Paterson AJ, Dickey WO, Stroneck DF, Popovsky MA, Caldwell SA (1997) The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion* 37:719–726.
- Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, Elzi DJ, Tuder RM, Johnson JL, Ambruso DR (1998)** Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *J Clin Invest.*101:1458-1467.
- Silliman CC. (1999)** Transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev* 13:177-186.
- Silliman C.C., Bjornsen A.J., Wyman T.H., Kelher M., Allard J., Bieber S., Voelkel N.F. (2003a)** Plasma and lipids from stored platelets cause acute lung injury in an animal model. *Transfusion* 43:633-640.
- Silliman C.C., Boshkov L.K., Mehdizadehkashi Z., Elzi D.J., Dickey W.O., Podlosky L., Ambruso D.R. (2003b)** Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood* 101:454-462.
- Silliman C.C., Ambruso D.R., Boshkov L.K. (2005)** Transfusion-related acute lung injury. *Blood* 105:2266-73.
- Silliman C.C., McLaughlin N.J. (2006a)** Transfusion-related acute lung injury. *Blood Rev.* 20:139-159.
- Silliman CC (2006b). The two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Med.* 34:124-131.

**Silliman** CC, Bercovitz RS, Khan SY, Kelher MR, LaSarre M, Land KJ, Sowemimo-Coker S. (2014) Antibodies to the HLA-A2 antigen prime neutrophils and serve as the second event in an in vitro model of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang.* 107:76-82.

**Silvestri** G. (2010) Memories of Jean Dausset. A pioneering scientist in medical ethics. *Blood Transfus.* 8:130-1.

**Simons** K., Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:31-9.

**Smith** CW. (1993) Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol.* 30:45-53.

**Söhl** G., Willecke K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 62:228-32.

**Springer** T. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76 :301-314.

**Squarrito** D., Emmi G., Silvestri E., Ciucciarelli L., D'Elia M.M., Prisco D., Emmi L. (2014) Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. *Auto Immun Highlights.* 5:33-45.

**St-Onge** M., Flamand N., Biarc J. (2007). Characterization of prostaglandin E2 generation through the cyclooxygenase (COX)-2 pathway in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1771 : 1235-45.

**Staudt** A., Eichler P., Trimpert C, Felix S. B., Greinacher A. (2007). Fc(gamma) receptors Da on cardiomyocytes and their potential functional relevance in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 49 :1684-1692.

**Strait** R.T., Hicks W., Barasa N., Mahler A., Khodoun M., Köhl J., Stringer K., Witte D., Van Rooijen N., Susskind B.M., Finkelman F.D. (2008) MHC class I-specific antibody binding to nonhematopoietic cells drives complement activation to induce transfusion-related acute lung injury in mice. *J Exp Med.* 208:2525-2544.

**Suh** Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., and Lambeth J.D.(1999), Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401:79-82.

**Summers** C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31:318–324.

**Sumimoto** H., Kage Y., Nunoi H., Sasaki H., Nose T., Fukumaki Y., Ohno M., Minakami S., Takeshige K. (1994) Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:5345-9.

**Suzuki** T., Hazeki O., Hazeki K., Ui M., Katada T. (1996) Involvement of the beta gamma subunits of inhibitory GTP-binding protein in chemoattractant receptor-mediated potentiation of cyclic AMP formation in guinea pig neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1313:72-8.

**Syrbu** S.I., Waterman W.H., Molski T.F., Nagarkatti D., Hajjar J.J., Sha'afi R.I. (1999) Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in human neutrophils. *J Immunol* 162:2334-40.

## T

**Takeda** K., Kaisho T., Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-76.

**Takenawa** T., Ishitoya J., Homma Y., Kato M., Nagai Y. (1985) Role of enhanced inositol phospholipid metabolism in neutrophil activation. *Biochem Pharmacol* 34:1931-5.



**Tamura M.**, Shiozaki I., Ono S., Miyano K., Kunihiro S., Sasaki T. (2007) p40phox as an alternative organizer to p47phox in Nox2 activation: a new mechanism involving an interaction with p22phox. *FEBS Lett* 581:4533-8.

**Taylor W.R.**, Jones D.T., Segal A.W. (1993) A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2:1675-1685.

**Terasaki pi**, McClelland J.D. (1964) Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204:998-1000.

**Toy P**, Popovsky MA, Abraham E, Ambruso DR, Holness LG, Kopko PM, McFarland JG, Nathens AB, Silliman CC, Stroncek D (2005) National Heart, Lung and Blood Institute Working Group on TRALI. Transfusion-related acute lung injury: definition and review *Crit Care Med.* 33:721-726.

**Toy P.**, Bacchetti P., Grimes B., Gajic O., Murphy E.L., Winters J.L., Gropper M.A., Hubmayr R.D., Matthay M.A., Wilson G., Koenigsberg M., Lee D.C., Hirschler N.V., Lowell C.A., Schuller R.M., Gandhi M.J., Norris P.J., Mair D.C., Sanchez Rosen R., Looney M.R. (2015) Recipient clinical risk factors predominate in possible transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 55:947-52.

**Towbin H.**, Staehelin T., Gordon J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24:145-149.

**Triantafilou M.**, Triantafilou K. (2002) Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.*23: 301-4.

**Triulzi D.J.**, Kleinman S., Kakaiya R.M., Busch M.P., Norris P.J., Steele W.R., Glynn S.A., Hillyer C.D., Carey P., Gottschall J.L., Murphy E.L., Rios J.A., Ness P.M., Wright D.J., Carrick D., Schreiber G.B. (2009) The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion.*49:1825-35.

**Tsuboi N.**, Asano K, Lauterbach M, Mayadas T.N. (2008) Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity* 28:833-846.

## U

**Urwin P.J.**, Mackenzie J.M, Llewelyn C.A, Will R.G, Hewitt P.E. (2016) Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: updated results of the UK Transfusion Medicine Epidemiology Review Study. *Vox Sang* 110:310-6.

## V

**Vallet P.**, Charnay Y., Steger K., Ogier-Denis E., Kovari E. (2005) Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* 132: 233-238.

**Vamvakas EC**, Blajchman MA. Transfusion-related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood.* 9 avr 2009;113(15):3406-3417.

**Van den Berg J.M.**, van Koppen E., Ahlin A., Belohradsky B.H., Bernatowska E., Corbeel L. (2009) Chronic granulomatous disease: the European experience. *PloS One* 4:e5234.

**Van Leeuwen A**, Winchester RJ, van Rood JJ. (1975) Serotyping for MLC. II. Technical aspects. *Ann N Y Acad Sci.* 254:289-295.

**Vanhoutte P.M.**, Shimokawa H. (1989) Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation* 80:1-9.

**Vaquero E.C.**, Edderkaoui M., Pandol S.J., Gukovsky I., Gukovskaya A.S. (2004) Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 279: 34643-34654.

Varshney P., Yadav V., Saini N. (2016) Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology* 149:13-24.

**Varela** M, Mas A, Nogués N, Escorsell A, Mazzara R, Lozano M. (2002) TRALI associated with HLA class II antibodies. *Transfusion* 42:1102.

**Vilgrain** I., Sidibé A., Polena H., Cand F., Mannic T., Arboleas M., Boccard S., Baudet A., Gulino-Debrac D., Bouillet L., Quesada J.L., Mendoza C4, Lebas J.F., Pelletier L., Berger F. (2013) Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PLoS One* 16;8(12)

**Vilhardt** F., and van Deurs B. (2004) The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *Embo J* 23:739-48.

**Vlaar** A.P., Juffermans N.P. (2013) Transfusion-related acute lung injury: a clinical review. *Lancet* 382:984-94.

**Vogelpoel** L.T., Baeten D.L., de Jong E.C., den Dunnen J. (2015) Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front Immunol.* 6:79.

**Volpp** B.D., Nauseef, W.M., Clark, R.A. (1988) Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242, 1295-7.

**Volpp** B.D., Nauseef W.M., Donelson J.E., Moser D.R., Clark R.A. (1989) Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci US A.* 86:7195-7199.

## W

**Wagner** H. (2012) Innate immunity's path to the Nobel Prize 2011 and beyond. *Eur J Immunol.* 42:1089-92.

**Wallis** JP. (2003) Transfusion-related acute lung injury (TRALI)--under-diagnosed and under-reported. *Br J Anaesth.* 90:573-657.

**Ward** P.A. (1996) Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. *Ann N Y Acad Sci.* ;796:104-112.

**Ward** R.A., Nakamura M., and McLeish K.R. (2000), Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *J Biol Chem* 275:36713-9.

**Warkentin** T.E., Greinacher A., Bux J. (2015) The transfusion-related acute lung injury controversy: lessons from heparin-induced thrombocytopenia. *Transfusion* 55:1128-34.

**Weber** L.L., Roberts L.D., Sweeney J.D. (2014) Residual plasma in red blood cells and transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 54:2425-30.

**West** C., West D., Kumar S., Moore J. (1990) A comparison of the sensitivity to photodynamic treatment of endothelial and tumour cells in different proliferative states. *Radial. Biol.* 58:145-56.

**Wientjes** F.B., Hsuan J.J., Totty N.F., Segal A.W. (1993) p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296:557-61.

**Wiersum-Osselton** J.C., Middelburg R.A., Beckers E.A.M., Van Tilborgh A.J.W., Zijlker-Jansen P.Y., Brand A (2011) Male-only fresh frozen plasma for transfusion-related acute lung injury prevention: before and after comparative cohort study. *Transfusion* 51:1278–83.

Williams P., Warwick R., Dyson M., Bannister L., Werneck H. (1995) *Gray's Anatomy*, thirty-eighth ed. Churchill Livingstone, Great Britain, pp14511459

**Winkelstein** J.A., Marino M.C., Johnston R.B. Jr, Boyle J., Curnutte J., Gallin J.I. (2000) Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 79:155-169.

**Wolf** C.F., Canale V.C. (1976) Fatal pulmonary hypersensitivity reaction to HL-A incompatible blood transfusion: report of a case and review of the literature. *Transfusion* 16:135-140.

**Wyman** T.H., Bjornsen A.J., Elzi D.J., Smith C.W., England K.M., Kelher M., Silliman C.C. (2002) A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:1592-1603.

## X

**Xiao** K., Allison D. F., Kottke M. D., Summers S., Sorescu G. P., Faundez V., Kowalczyk A. P. (2003) Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 278 :19199-208.

## Y

**Yamaura** M, Mitsushita J, Furuta S, Kiniwa Y, Ashida A. (2009) NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. *Cancer research* 69: 2647-2654.

**Yancey P.G.**, Rodrigueza W.V., Kilsdonk E.P., Stoudt G.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H. (1996) *J Biol Chem.* 1996 Jul 5;271:16026-34. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux.

**Yang** YS, Hughes TE (2001) Cre stoplight: a red/green fluorescent reporter of Cre recombinase expression in living cells. *Biotechniques* 31: 1036, 1038, 1031-1040.

**Yu** L., Zhen L., Dinauer M.C. (1997) Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *J Biol Chem* 272 :27288-94.

**Yu** L., Cross A.R., Zhen L., Dinauer M.C. (1999) Functional analysis of NADPH oxidase in granulocytic cells expressing a delta488-497 gp91(phox) deletion mutant. *Blood* 94, 2497-504.

**Yuzawa** S., Ogura K., Horiuchi M., Suzuki N.N., Fujioka Y., Kataoka M., Sumimoto H., Inagaki F. (2004) Solution structure of the tandem Src homology 3 domains of p47phox in an autoinhibited form. *J Biol Chem* 279 :29752-60.

## Z

**Zallen** G, Offner PJ, Moore EE, Blackwell J, Ciesla DJ, Gabriel J, Denny C, Silliman CC. (1999) Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Am J Surg.*178:570-572.

**Zhang** L., Nguyen M.V., Lardy B., Jesaitis A.J., Grichine A., Rousset F., Talbot M., Paclet M.H., Qian G., Morel F. (2011) New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4. *Biochimie* 93:457-68.

**Zhang** T., Lu X., Beier F., Feng Q-J. (2011) Rac1 activation induces tumour necrosis factor- $\alpha$  expression and cardiac dysfunction in endotoxemia. *Cell. Mol. Med.*15:1109-21

**Zhang** B., Liu Z., Hu X. (2013) Inhibiting cancer metastasis via targeting NADPH oxidase 4. *Biochemical pharmacology* 86: 253-266.

**Zhou M.**, Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P. (1997) Stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem.* 253:162-8.

**Zurier R.B.** (1976) Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res.* 2:815-818.



# **ANNEXES**





Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
  
 www.em-consulte.com



## SÉANCE ÉDUCATIONNELLE

## Le conflit immunologique dans l'œdème pulmonaire lésionnel aigu post-transfusionnel ou trali

### The immunological conflict in the transfusion-related acute lung injury or TRALI

C. Drouet<sup>a,b,c,\*</sup>, K. Khoy<sup>c</sup>, D. Masson<sup>c</sup>, B. Bardy<sup>c</sup>,  
 C. Giannoli<sup>d</sup>, V. Dubois<sup>d</sup>

<sup>a</sup> GREPI/AGIM CNRS FRE 3405, CHU de Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble, France

<sup>b</sup> Université Joseph-Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

<sup>c</sup> EFS Rhône-Alpes, site de Grenoble, BP 35, 38700 La Tronche, France

<sup>d</sup> EFS Rhône-Alpes, site de Lyon, 1–3, rue du Vercors, 69007 Lyon, France

## MOTS CLÉS

Transfusion sanguine ;  
 Anticorps anti-HLA ;  
 Évènement  
 indésirable receveur ;  
 Œdème pulmonaire ;  
 Syndrome de  
 détresse respiratoire  
 aiguë ;  
 Stress endothélial ;  
 Trali

**Résumé** Le *transfusion-related acute lung Injury* (trali), œdème pulmonaire lésionnel aigu post-transfusionnel, bien que son incidence soit probablement mésestimée, apparaît toujours comme l'une des premières causes résiduelles de mortalité transfusionnelle. Il s'agit d'un véritable œdème lésionnel pulmonaire survenant au décours de la transfusion de produits d'aphérèse ou de concentrés érythrocytaires. Son mécanisme physiopathologique résulte d'un conflit immunologique par infusion d'anticorps du donneur dirigés vis-à-vis des leucocytes. Il peut s'agir aussi de la transfusion passive de métabolites accumulés dans le produit transfusé, tels des lipides activateurs des neutrophiles et des cellules endothéliales. Les interventions de l'immunité innée et de l'inflammation par les kinines vasoactives sont prédominantes. La connaissance de son étiopathogénie doit faire accéder à l'amélioration de la prévention, à son meilleur diagnostic et à la prise en charge du patient adaptée.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

## KEYWORDS

Blood transfusion;  
 Anti-HLA antibodies;  
 Adverse effect;  
 Pulmonary edema;

**Summary** Despite its underrated incidence, transfusion-related acute lung injury (TRALI) is the leading cause of transfusion-related morbidity and mortality worldwide. The pulmonary edema in TRALI occurs in the course of the transfusion of apheresis products or erythrocyte concentrates. Its pathogenesis is attributed to the infusion of donor antibodies that recognize leucocyte antigens in the transfused host, with subsequent sequestration of leucocytes in the pulmonary vessels. It is also associated with the passive transfer of lipids and other biological response modifiers that accumulate during the storage or processing of blood components.



Respiratory distress syndrome;  
Endothelial stress;  
Trali

The Innate immunity and inflammatory kinins are key components. The knowledge of its etio-pathogenesis must come into play for improving prevention and diagnosis and for application of adapted care of the patient.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Introduction

En 1983 à la Mayo Clinic, des syndromes de détresse respiratoire aiguë survenant dans un contexte transfusionnel ont été décrits pour la première fois chez cinq sujets [1]. Ce syndrome est caractérisé par un œdème inflammatoire pulmonaire survenant dans les six heures suivant la mise en œuvre de la transfusion d'un produit sanguin labile; il a été dénommé *transfusion-related acute lung injury* (trali), œdème pulmonaire lésionnel aigu post-transfusionnel. Les premières données ont rapidement fait reconnaître l'étiologie possible d'un conflit immunitaire par les anticorps du produit transfusé. Ce qui pour première conséquence a permis l'amélioration de sa prévention. C'est par la preuve de la responsabilité des anticorps anti-HLA des donneurs féminins multigestes que l'utilisation de produits sanguins issus exclusivement de donneurs masculins a réduit de près de 80% l'incidence du trali [2]. En 2009 en France, 42 accidents par trali ont été enregistrés pour plus de 500 000 transfusions, représentant 0,7% des accidents transfusionnels [3]. De diagnostic difficile pour les réanimateurs, il doit être distingué du *transfusion associated circulatory overload* (taco), correspondant à un œdème de surcharge volémique. Le trali est la forme inflammatoire, exsudative, tandis que le taco est la forme hydrostatique, transsudative, de l'œdème aigu pulmonaire induit par la transfusion [4]. Le trali survient avec la fréquence d'un cas sur 5000 transfusions. Le trali reste l'accident transfusionnel le plus sévère, son incidence est sous-inventoriée, il se développe sur des sujets en situation clinique critique [5].

## Physiopathologie du trali

Le trali est le fait d'un œdème pulmonaire inflammatoire majeur avec lésion de la membrane alvéolaire secondaire à une activation des neutrophiles au contact de l'endothélium des capillaires pulmonaires. Cette lésion provoque une augmentation de la perméabilité des capillaires pulmonaires et l'exsudation dans les alvéoles d'un liquide séreux riche en protéines. Les mécanismes étiopathologiques conduisant à cette lésion sont encore mal connus.

Pour se déclencher le trali nécessite la survenue séquentielle de deux stimuli. Le premier est amorcé (*priming*) par une situation pathologique ou thérapeutique, avec sensibilisation de l'endothélium vasculaire favorable à la stimulation des neutrophiles. Plusieurs circonstances pathologiques favorisantes ont été identifiées, notamment les chimiothérapies intensives utilisées dans les hémopathies malignes, les pathologies ou les chirurgies cardiovasculaires (en particulier avec circulation extra-corporelle) et plus généralement les situations chirurgicales, les syndromes

infectieux aigus, les transfusions massives et les traitements cytokiniques. Le deuxième stimulus est un activateur déclenché par la transfusion sanguine elle-même. Apportés par la transfusion, les anticorps ou des lipides activateurs provoquent l'activation des neutrophiles. Se produit alors l'œdème inflammatoire avec exsudation, caractéristique de l'œdème pulmonaire lésionnel (Fig. 1):

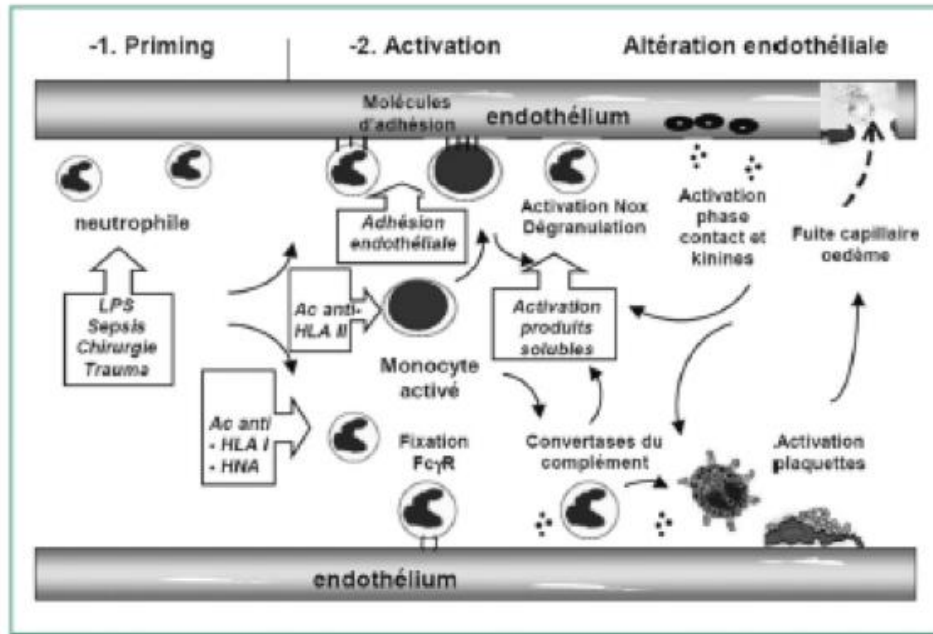
- les anticorps en cause peuvent être spécifiques de neutrophiles (antigène spécifique des neutrophiles: HNA) ou dirigés contre les produits HLA de classe I ou II;
- les mécanismes activateurs non immunologiques pourraient être en relation avec l'accumulation durant le stockage des produits sanguins de lipides activateurs des neutrophiles, notamment de type lysophosphatidylcholine [6].

Selon cette hypothèse les deux étapes d'amorce et d'activation se succèdent et sont indépendantes; le patient se trouve dans des conditions cliniques favorisantes, tels le sepsis ou le choc chirurgical pouvant sensibiliser l'endothélium pulmonaire. Expérimentalement le peptide formylé fMLP a été montré comme un élément sensibilisant majeur en préalable au déclenchement par les anticorps [7]. Ce qui a pour effet de favoriser l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium et aux plaquettes, et la séquestration des neutrophiles dans les capillaires pulmonaires. Du fait du produit transfusé, l'apport secondaire de l'anticorps ou du lipide activateur intervient sur le neutrophile sensibilisé [8]. De l'activation du neutrophile, s'ensuivent la production locale des espèces réactives de l'oxygène et l'exocytose granulaire. Le contenu des granules riche en protéases est directement agressif sur l'endothélium; l'intervention des protéases sur le kininogène a pour conséquence la production des kinines et la perméabilité endothéliale. Cet environnement protéolytique est favorable à l'établissement des convertases du complément et à l'activation des plaquettes. Comme déjà objectivé dans le modèle animal, il est probable que les récepteurs *Toll-like receptors* (TLR) contribuent aux phénomènes d'activation de l'endothélium, des plaquettes et des neutrophiles [9,10]. Cela pose la question du danger des transfusions de plaquettes chez un sujet septique, avec le risque d'accident transfusionnel indépendant des anticorps anti-HLA ou anti-HNA ou d'un modificateur lipidique.

L'intervention de l'immunité adaptative est suggérée par la récente démonstration *in vivo* de la protection du développement expérimental du trali par les cellules T régulatrices [11].

Même si la démonstration n'est qu'indirecte, il est admis que l'activation des neutrophiles et les lésions de l'endothélium jouent un rôle critique dans la pathogénie du trali. La responsabilité des anticorps anti-HLA ou anti-HNA dans ces processus est suggérée par les premières données





**Figure 1.** Mécanisme pathologique hypothétique du trali (d’après [24]). Les neutrophiles et les cellules endothéliales représentent les acteurs-clés dans la réaction pathologique. Il se produirait une activation mutuelle de chacune de ces cellules vis-à-vis de l’autre. **Priming :** Dans le temps d’amorçage (*priming*), le neutrophile, sensibilisé par des produits activateurs endogènes (infection chronique, stress), est piégé dans la microvasculature et soumis au contact avec l’endothélium. La cellule endothéliale activée favorise l’adhérence cellulaire (neutrophile et monocyte). **Activation :** Dans le temps d’activation, les produits activateurs (anticorps, lipides) déclenchent la réaction inflammatoire extensive et non contrôlée, avec la lésion endothéliale et sa perméabilité, responsable de l’apparition du trali.

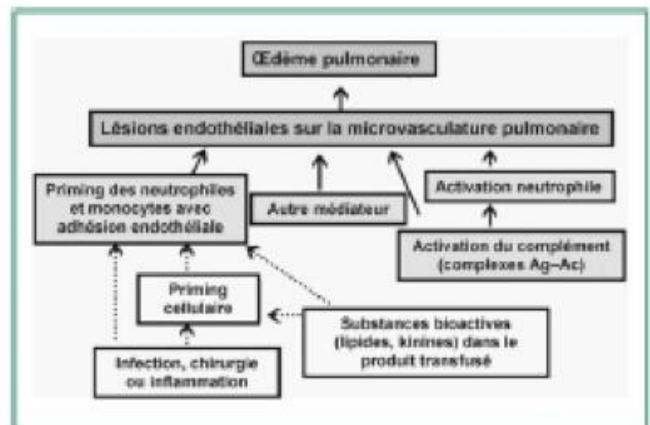
épidémiologiques et confirmée par les données expérimentales. De la connaissance de la physiopathologie, seront progressivement établis les critères de diagnostic et repérés les marqueurs appropriés pour engager des stratégies préventives adaptées.

### Stimuli initiaux sur les cellules endothéliales et les neutrophiles

L’endothélium constitue un organe multifonctionnel activement impliqué dans le contrôle de l’homéostasie vasculaire. Des stimuli de l’environnement (cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance, interactions cellulaires et contraintes biomécaniques) induisent la transition d’un état quiescent vers un état activé. En l’absence de régulation adaptative, cela conduit au dysfonctionnement identifié comme l’étape précoce et déterminante dans le développement de diverses pathologies vasculaires, dont les œdèmes lésionnels pulmonaires [12].

Plusieurs récepteurs conduisent à l’activation du neutrophile, par exemple le groupe de récepteurs de l’immunité innée TLR). Une fois activé, le neutrophile développe l’explosion respiratoire de façon puissante avec production des espèces radicalaires de l’oxygène. En amont, les mécanismes d’amorce sensibilisant le neutrophile à l’activation sont mal connus. La Fig. 2 présente l’ordre des événements. Des kinines, comme la substance P, et, pour le neutrophile aussi, des cytokines pro-inflammatoires telle le *tumour necrosis factor-α* (TNF-α) sont à l’origine de la phosphorylation de résidus tyrosine sur plusieurs protéines substrats, dont la protéine p47phox qui participe à l’assemblage du complexe NADPH oxydase. Par l’effet

dose-réponse, par la cinétique et par la dépendance de génistéine, cet événement a été repéré comme représentatif du *priming* du neutrophile [13]. D’autres produits peuvent assurer ce rôle d’amorce : phospholipides, lipopolysaccharide, peptides formylés bactériens tel fMLP et même la simple adhésion endothéliale. Le *priming* représente le mécanisme régulateur majeur de contrôle des réponses de la cellule, le *priming* développe un continuum d’états d’activation du neutrophile dont les définitions moléculaires sont en cours d’identification [14].



**Figure 2.** Déroulement des processus pathologiques pour une explication de l’étiopathogénèse du trali. Les événements initiaux apparaissent sur fond blanc, les événements biologiques déclencheurs sont identifiés sur fond gris-clair, les événements pathologiques apparaissent en gris.



## Immunogénétique HLA, anticorps anti-HLA et conflit immunologique

Il est admis que les anticorps anti-HLA représentent l'événement causal du trali. Pendant la maternité, les mères sont exposées aux produits HLA de l'allèle paternel de l'enfant. L'incidence globale des anticorps anti-HLA dans la population de donneurs féminins est de 15%. Si seulement 1,6% des femmes nullipares présentent des anticorps, la prévalence d'anticorps anti-HLA est de 11, 22,5, 27,5 et 32,2% après respectivement une, deux, trois et plus de trois grossesses [15]. Le risque d'allo-immunisation est donc très substantiel dès les premières grossesses et l'allo-anticorps persiste à distance de la maternité. Par ailleurs, il n'est pas montré qu'une grossesse interrompue augmente statistiquement le risque d'immunisation chez les nullipares par rapport aux femmes nulligestes. Dans 44% des cas, il s'agit d'anticorps anti-HLA classe I, dans 28% des cas ce sont des anticorps anti-HLA de classe II, et 28% sont des situations mixtes avec les anticorps des deux spécificités.

Le produit HLA le plus fréquemment impliqué dans le conflit immunologique du trali est l'antigène HLA-A2; il est aussi présent à la fréquence de 0,32 (fréquence génique) et de 0,46 (fréquence de l'expression phénotypique). Aussi, dans toute maternité, la probabilité que la mère non HLA-A2 porte un enfant HLA-A2 est 0,173 (une chance sur six). Une femme sur dix en Europe exprime des anticorps anti-HLA classe I à l'issue de sa maternité, donc le risque de tout donneur féminin d'exprimer des anticorps anti-HLA-A2 est de 1 sur 60. Ce qui veut dire que la chance de concordance antigène/anticorps entre un receveur HLA-A2 (fréquence 0,46) et une poche de plasma de n'importe quel donneur féminin est de 1 sur 126. En tenant compte des fréquences des allèles, le cumul des données pour les autres produits HLA fait paraître un risque global d'accident pour 1 unité transfusée sur 25 délivrées et issues de donneurs féminins.

La responsabilité des anticorps anti-HLA de classe II est bien documentée par les données épidémiologiques, et représente environ la moitié des cas de trali [16,17]. Il est suggéré en outre que les accidents associés aux anticorps anti-HLA de classe II seraient plus sévères. La question de leur cible se pose pour attribuer une signification aux anticorps repérés chez les donneurs. En effet l'expression des produits HLA de classe II est l'apanage des cellules présentatrices professionnelles, et ce n'est pas le cas du neutrophile ou de l'endothélium. C'est dans une élégante démonstration qu'a été prouvé que le monocyte est la cible des anticorps anti-HLA de classe II; ces anticorps conduisent à l'activation monocyttaire dont les produits de sécrétion sont montrés activateurs du neutrophile (LTB<sub>4</sub>, TNF $\alpha$ , IL8 et GRO $\alpha$ ), avec pour conséquence la perméabilité endothéliale [18].

Les cibles antigéniques HNAs sont portées par des protéines membranaires très polymorphes. Pour exemples, les déterminants HNA-1 sont portés par le récepteur Fc $\gamma$ R11B/CD16b (ID: FCGR3B, 5 SNPs [single-nucleotide polymorphism ou polymorphisme lié à un seul nucléotide] de fréquences entre 0,3 et 0,5 pour des fréquences antigéniques de 5 à 88%), le déterminant HNA-2a est porté par CD177 (ID: CD177, six SNPs de fréquence supérieure à 0,1; un seul déterminant reconnu). L'antigène HNA-3a est porté par la protéine 2 du transporteur de choline (ID:

SLC44A2, probablement huit SNPs avec conséquences immunogéniques).

Étant données les grandes fréquences des concordances produit HLA/anticorps anti-HLA, la question se pose de savoir pourquoi le trali n'est pas plus fréquent. Les facteurs liés au donneur, au receveur et à la transfusion elle-même déterminent la présentation du trali. Le titre de l'anticorps, l'isotype et sa spécificité sont critiques. Les facteurs liés au receveur peuvent représenter un impact majeur sur la susceptibilité au trali: accident pulmonaire antérieur, caractéristiques génétiques, médicaments immunomodulateurs, présence de produit HLA soluble susceptible de neutraliser les anticorps. Le volume de plasma transfusé et le débit de la transfusion semblent avoir une influence.

## Risque du trali

L'incidence du trali est d'un accident sur 5000 transfusions, avec une mortalité estimée entre 5 et 25% [19]. Le traitement actuel est totalement favorable dans 80% des cas. Mais le diagnostic de certitude de trali n'est pas établi pour tous les cas, de nombreuses situations restent mal documentées malgré les critères du Réseau européen d'hémovigilance [20]. Plusieurs données épidémiologiques sont accessibles; une série allemande de 309 sujets suspects de trali a été documentée entre 2006 et 2008. À l'examen des critères, 20% représentent des cas de trali confirmé. Treize cas (21% des cas confirmés) ont été fatals. De ces situations fatales, 12 cas étaient le fait de transfusion de plasma, un cas était transfusé par des concentrés globulaires [16].

## Anticorps anti-HLA et anti-neutrophile, fréquence chez les donneurs de sang

Pour la sélection des donneurs, les anticorps pouvant porter la responsabilité du trali sont dépistés par les laboratoires d'immunogénétique HLA. Le dépistage vis-à-vis des cibles HLA utilise la technique Luminex<sup>®</sup>, consistant en une lecture du signal fluorescent des produits HLA purifiés fixés sur microsphères. Cette technique est reconnue pour sa sensibilité, elle est employée pour les spécificités des anticorps anti-HLA des receveurs de greffon. La réactivité anti-HNA est objectivée par cytométrie en flux ou par leucoagglutination vis-à-vis de neutrophiles typés pour les antigènes HNA-1a, HNA-1b, HNA-2 et HNA-3a. [21,22]. La recommandation ne couvre pas les réactivités vis-à-vis des antigènes HNA-1c, HNA-4a/4b et HNA-5a/5b.

On sait le polymorphisme HLA, examiné plus haut. C'est aussi par leurs polymorphismes que les protéines de membrane du neutrophile deviennent immunogéniques pour le receveur. De façon très démonstrative pour l'antigène HNA-3a, c'est le variant Gln154Arg associé à un SNP de fréquence allélique 0,79 et porté par le gène SLC44A2 qui porte la responsabilité de l'allo-antigénicité [23]. L'allo-immunisation vis-à-vis des antigènes HNA est peu documentée dans le contexte du trali. Dans la série initiale de la Croix-Rouge allemande, les anticorps anti-HNA ont été démontrés responsables de trali dans 12 cas (dont 10 pour HNA-3a). Ils représentent neuf transfusions de plasma frais congelé, deux transfusions de concentrés globulaires et une



transfusion de plaquettes [17,24]. Sur la base des observations actuelles encore dispersées, les accidents avec anti-HNA sont plus sévères.

Les séries sur les réactivités anti-HLA sont très documentées. Les anticorps anti-HLA se présentent comme décrit plus haut avec la fréquence de l'immunisation liée aux grossesses : de 0,3 % pour les nullipares à plus de 30 % pour les parités de 3 et plus et concernant les réactivités anti-HLA classe I, avec plusieurs spécificités ; pour les anticorps anti-classe II, les chiffres sont respectivement de 0,4 et de 18 % [25].

Il faut savoir que si les anticorps anti-HNA sont moins fréquents dans la population des donneurs que les anticorps anti-HLA, ils sont présents avec la même fréquence chez les donneurs féminins et masculins. Par conséquent, il devient nécessaire de considérer ces anticorps pour réduire le risque d'accident de trali [26].

### Pas besoin d'anticorps pour faire un trali

Le trali peut se développer sans anticorps repéré dans le produit sanguin transfusé. Expérimentalement chez le rat, la transfusion de plaquettes âgées peut, à elle seule, causer un début de réaction d'œdème. Si l'animal est soumis à un contexte inflammatoire préalable, le phénomène s'amplifie et s'accompagne d'une coagulopathie [27]. Le surnageant du concentré plaquettaire est en cause, soit par l'accumulation de lipides activateurs, soit par l'accumulation de kinines.

En transfusion, l'accumulation de kinines dans le produit sanguin peut avoir des conséquences pathologiques. Ainsi l'accumulation de bradykinine et de desArg<sup>9</sup>-bradykinine a été observée dans les surnageants de plaquettes âgées, avec pour conséquence le développement d'accidents anaphylactoides avec hypotension [28].

### Mesures de réduction du risque de trali

Les mesures actuelles visent à l'éviction des donneurs à risque de porter des anticorps dangereux ; il s'agit de retirer les donneurs féminins multigestes du don de produits d'aphérese. Ces mesures portent leurs fruits puisque le nombre d'accidents se réduit depuis plusieurs années (Fig. 3). Mais les causes du trali sont multiples, concernant non seulement le produit sanguin mais aussi le patient receveur.

De nombreuses situations cliniques sont mésestimées et les pratiques transfusionnelles n'ont pas atteint la qualité de standardisation attendue pour le diagnostic clinique du trali, les examens sur le donneur et la prise en charge du patient. L'attention est portée sur la difficulté de progresser sur un consensus, étant donné le peu de progrès de la connaissance sur l'étiopathogénie de la maladie [29]. Il est donc nécessaire de porter les efforts sur cette connaissance, depuis l'amorce de l'événement jusqu'au déclenchement de l'accident. Elle doit apporter le rationnel indispensable à la sélection des produits sanguins, au diagnostic de trali, à l'identification des patients à risque et à leur prise en charge.

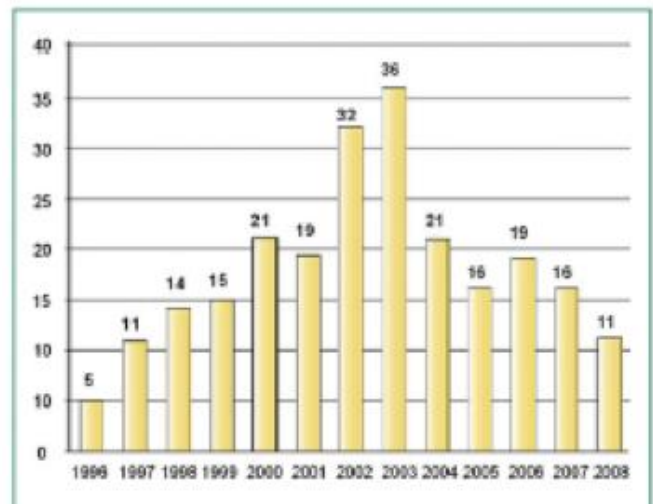


Figure 3. Distribution par année des 236 accidents trali enregistrés entre 1996 et 2008 au Royaume-Uni (données du rapport de l'étude Serious Hazard Of Transfusion, SHOT).

### Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

### Références

- [1] Popovsky MA, Abel MD, Moore SB. Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:185–9.
- [2] Eder AF, Herron R, Strupp A, Dy B, White J, Notari EP, et al. Effective reduction of transfusion-related acute lung injury risk with male-predominant plasma strategy in the American Red Cross (2006–2008). *Transfusion* 2010;50:1732–42.
- [3] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps). Rapport annuel Hémovigilance 2009. Saint-Denis: Afssaps; 2009. 76 p. Disponible sur: [http://www.afssaps.fr/var/afssaps\\_site/storage/original/application/0dd2cd67b2710f0ca2a1baff80d5e7ad.pdf](http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/0dd2cd67b2710f0ca2a1baff80d5e7ad.pdf) (accès le 15/2/2011).
- [4] Ozier Y, Mertes PM. Trali et Taco. diagnostic et prise en charge clinique des patients. *Transfus Clin Biol* 2009;16:152–8.
- [5] Vamvakas EC, Blajchman MA. Blood still kills: six strategies to further reduce allogeneic blood transfusion-related mortality. *Transfus Med Rev* 2010;24:77–124.
- [6] Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO, Stroneck DF, Popovsky MA, Caldwell SA, et al. The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: A retrospective study. *Transfusion* 1997;37:719–26.
- [7] Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, et al. Antibody induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an *ex vivo* rat lung model. *Blood* 2006;107:1217–9.
- [8] Saitenberg E, Petraszko T, Semple E, Branch DR. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a Canadian blood services research and development symposium. *Transfus Med Rev* 2010;24:305–24.
- [9] Wyman TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, Smith CW, England KM, Kelher M, et al. A two-insult *in vitro* model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: Requirements for adherence and chemokine release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C1592–603.



- [10] Gilliss BM, Looney MR. Experimental models of transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev* 2011;25:1–11.
- [11] D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, et al. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest* 2009;119:2898–913.
- [12] Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 2009;335:191–203.
- [13] Lloyds D, Brindle NP, Hallett MB. Priming of human neutrophils by tumour necrosis factor-alpha and substance P is associated with tyrosine phosphorylation. *Immunology* 1995;84:220–6.
- [14] El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol* 2008;30:279–89.
- [15] Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion* 2009;49:1825–35.
- [16] Keller-Stanislawski B, Reil A, Günay S, Funk MB. Frequency and severity of transfusion-related acute lung injury—German haemovigilance data (2006–2007). *Vox Sang* 2010;90:70–7.
- [17] Reil A, Keller-Stanislawski B, Günay S, Bux J. Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang* 2008;95:313–7.
- [18] Sachs UJ, Wasel W, Bayat B, Bohle RM, Hattar K, Berghöfer H, et al. Mechanism of transfusion-related acute injury induced by HLA class II antibodies. *Blood* 2011;117:669–77.
- [19] Wallis JP. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): presentation, epidemiology and treatment. *Intensive Care Med* 2007;33Suppl1:512–6.
- [20] Kleinman S, Caulfield T, Chan P, Davenport R, McFarland J, McPhedran S, et al. Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 2004;44:1774–89.
- [21] Curtis B, Reno C, Aster R. Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil alloantigen HNA-1c (5H): a report of five cases. *Transfusion* 2005;45:1308–13.
- [22] ISBT working party on granulocyte immunobiology, Bierling P, Bux J, Curtis B, Flesch B, Fung L, et al. Recommendations of the ISBT working party on granulocyte immunobiology for leucocyte antibody screening in the investigation and prevention of antibody-mediated transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang* 2009;96:266–9.
- [23] Greinacher A, Wesche J, Hammer E, Fürli B, Völker U, Reil A, et al. Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. *Nat Med* 2010;16:45–8.
- [24] Bux J, Sachs UJH. The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol* 2007;136:788–99.
- [25] Endres RO, Kleinman SH, Carrick DM, Steele WR, Wright DJ, Norris PJ, et al. Identification of specificities of antibodies against human leukocyte antigens in blood donors. *Transfusion* 2010;50:1749–60.
- [26] Gottschall JL, Triulzi DJ, Curtis B, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, et al. The frequency and specificity of human neutrophil antigen antibodies in a blood donor population. *Transfusion* 2011;51 [in press; doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02913.x].
- [27] Vlaar APJ, Hofstra JJ, Kulik W, van Lenthe H, Nieuwland R, Schultz MJ, et al. Supernatant of stored platelets causes lung inflammation and coagulopathy in a novel in vivo transfusion model. *Blood* 2010;116:1360–8.
- [28] Moreau ME, Thibault L, Désormeaux A, Chagnon M, Lemieux R, Robillard P, et al. Generation of kinins during preparation and storage of whole blood-derived platelet concentrates. *Transfusion* 2007;47:410–20.
- [29] Kopko P, Silva M, Shulman I, Kleinman S. AABB survey of transfusion-related acute lung injury policies and practices in the United States. *Transfusion* 2007;47:1679–85.

## **Etiopathologie du TRALI (« *Transfusion-Related Acute Lung Injury* ») : anticorps anti-HLA et NADPH oxydase phagocytaire**

Le TRALI représente un œdème pulmonaire lésionnel aigu survenant au cours d'une transfusion. Son mécanisme étiopathologique encore très imprécis conduit aujourd'hui à une sous-estimation de son incidence. Des études clinico-anatomiques ont souligné le rôle central des polynucléaires neutrophiles (PMN) en montrant que le TRALI résulte de l'accumulation de PMN au contact de l'endothélium lésé des capillaires pulmonaires. De nombreux investigateurs ont tenté de définir le facteur déclenchant présent dans le produit sanguin transfusé et évoquèrent l'existence d'un conflit immunologique par infusion d'anticorps anti-HLA. En appui avec les données de la littérature, ce travail a pour but d'apporter une meilleure connaissance du mécanisme du TRALI afin d'en améliorer son diagnostic, sa prévention et la prise en charge du patient. Tout d'abord, nous confirmons l'implication des anticorps anti-HLA dans la survenue du TRALI en validant pour la première fois l'hypothèse du modèle en deux étapes: une première étape préalable est requise chez le patient présentant une situation clinique ou thérapeutique prédisposante qui aboutit à une pré-stimulation des PMN, puis une seconde étape, dépendante de l'apport d'anticorps anti-HLA lors de la transfusion, entraîne l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire. Cela conduit à l'activation des PMN et la libération de dérivés réactifs de l'oxygène qui sont directement responsables de la lésion endothéliale pulmonaire et provoque une augmentation de la perméabilité endothéliale. Nous démontrons en plus l'existence d'un seuil d'anticorps anti-HLA nécessaire pour déclencher une forte activation des PMN. Enfin, nous avons mis en évidence un mécanisme d'activation des PMN par les anticorps anti-HLA faisant intervenir la formation de complexes immuns antigène – anticorps à la surface des PMN. Ces complexes immuns sont reconnus avec une affinité plus grande que les anticorps seuls par les récepteurs Fc des PMN. Cette double interaction au sein d'un même PMN pourrait favoriser la formation de cluster de récepteurs Fc activés au niveau de radeaux lipidiques, ce qui induirait une activation optimisée de ces récepteurs, entraînant une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de la NADPH oxydase des PMN. Nos résultats constituent un rationnel scientifique solide pour accéder à une meilleure connaissance du TRALI.

Mots-clés : Transfusion sanguine ; TRALI ; anticorps anti-HLA ; neutrophile ; NADPH oxydase ; perméabilité endothéliale

## **Etiopathological of TRALI (“*Transfusion-Related Acute Lung Injury*”): anti-HLA antibodies and phagocytic NADPH oxidase**

TRALI represents an acute non-cardiogenic pulmonary oedema following blood transfusion. The unknown etiopathological mechanism of TRALI leads to an underestimation of the incidence. Clinical and anatomical studies highlighted the major role of neutrophils (PMN) and showed that TRALI results from an increased number of neutrophils within the pulmonary capillary endothelium. Many evidence suggest that antibodies recognizing human leukocyte antigens (HLA) present in the blood transfusion are the predominant trigger leading to TRALI. Towards these findings, we investigated the precise mechanism in TRALI in order to get a better knowledge of its diagnosis, its prevention and the patient care. We confirm the major role of anti-HLA antibodies and validate for the first time the two-hit model: the first-hit related to the patient clinical condition leads to their PMN stimulation, followed in the second-hit by the infusion of blood products containing anti-HLA antibodies that activate the phagocytic NADPH oxidase. This event induces PMN activation and the release of reactive oxygen species that are directly responsible for the pulmonary endothelial damage and cause the endothelial permeability increase. We also demonstrate the cut-off of anti-HLA antibodies that raises PMN activation. Finally, we showed that both the antigen-binding and the Fc-binding systems to antibodies are needed to induce a major PMN activation. We found that the binding of anti-HLA antibodies to HLA antigens promote the formation of cluster of Fc receptors within lipid rafts. The translocation of Fc receptors into lipid rafts improve Fc receptors activation, leading to intracellular signal transduction and activation of effector functions, such as NADPH oxidase activation and release of reactive oxygen species involved in tissue damage.

Keywords : Blood transfusion ; TRALI, anti-HLA antibodies, neutrophil, NADPH oxidase, endothelial permeability.