



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Université de Nancy I

Thèse présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Nancy I

en Génie Biologique et Médical

par

Verstraeten Luc

le 30 avril 1992

Essai de conservation des polynucléaires neutrophiles.

Membres du Jury:

Pr.C.Vigneron, Directeur de Thèse.

Pr.M.Roberfroid, Rapporteur.

Dr.Saint Blancard, Rapporteur.

Pr.A.Hassoun.

Dr.M.Marchand-Arvier.

Dr.F.Schooneman.

Remerciements.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à l'Université Catholique de Louvain, à l'Université de Nancy et au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Nancy-Brabois, qui m'ont accueilli afin de permettre la réalisation de cette thèse.

Mes plus chaleureux remerciements vont à Monsieur le Professeur Vigneron, qui m'a fait le grand honneur d'être le promoteur de ma thèse. Son aide bienveillante, son esprit critique, la grande qualité de l'équipement de son service, son autorité scientifique et ses immenses qualités humaines m'ont permis d'effectuer ce travail.

J'adresse ma plus profonde gratitude à Madame le Docteur Marchand-Arvier, qui a supervisé l'ensemble de mes recherches et qui m'a soutenu tout au long de celles-ci. L'accueil chaleureux qui m'a été réservé dans son laboratoire a été un facteur essentiel dans la réalisation de cette thèse. De plus, elle me fait le plaisir d'être membre de mon Jury.

Que Monsieur le Docteur Schooneman recoive ici l'expression de mes remerciements les plus sincères, pour ses conseils avisés, pour l'aide constante qu'il m'a apporté dans l'obtention des prélèvements leucocytaires et sanguins, pour l'amabilité avec laquelle j'ai été reçu dans son service et pour l'honneur qu'il me fait de siéger à mon Jury.

J'adresse mes plus vifs et mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur Hassoun, qui n'a cessé de m'encourager tout au long de cette thèse. Son soutien moral sans faille et sa haute compétence scientifique furent pour moi une aide inestimable. Il me fait le plaisir d'être membre de mon Jury.

Que Monsieur le Professeur Roberfroid reçoive ici l'expression la plus sincère de ma gratitude en raison du grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de siéger à mon Jury. Son rayonnement scientifique et humain constitue pour moi un encouragement précieux pour mener à bien ce travail.

J'adresse mes plus chaleureux et sincères remerciements à Monsieur Saint Blancard pour le grand plaisir et l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être membre de mon Jury.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur Dinant pour les conseils précieux, pour l'enseignement remarquable qu'il m'a dispensé et pour l'aide qu'il m'a donnée tout au long de mes travaux.

Monsieur Vanbinst et Madame le Docteur Morin m'ont assisté avec beaucoup de compétence et de gentillesse dans la réalisation de cette thèse. Qu'ils en soient remerciés ici.

Un grand nombre de Collègues ne soupçonnent sans doute pas à quel point leurs encouragements et leur soutien moral furent importants pour réaliser cette thèse, en particulier Monsieur Pierre François, Monsieur André Bigot, Monsieur Vincent Banse, Mademoiselle Pascale Ninane, Monsieur Jean-Jacques Mollet, Mademoiselle Isabelle Piérard, Monsieur Jean-Jacques Parez, Monsieur Marc Elsen, Monsieur Philippe Dupret et Mademoiselle Véronique Cauchie.

Je remercie très sincèrement toutes les techniciennes du service de Chimie Hématologique du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Nancy-Brabois pour leur gentillesse et l'aide efficace qu'elles m'ont apportée, en particulier Mademoiselle Viviane Duval, Madame Fabienne Pauly et Madame Jacqueline Humbert.

Enfin, je remercie l'ensemble du personnel de l'Université Catholique de Louvain avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, en particulier Madame Bernadette Moos et Mademoiselle Marie-Christine Ledoux.

Je remercie Anne et Vincent pour l'amour qu'ils me donnent.

Je remercie tous les membres de ma Famille pour le soutien et l'affection qu'ils me donnent, depuis toujours.

Cette thèse est dédiée à André Verstraeten, Lucie Verstraeten, Richard Roels et Georges Roels.

Publications scientifiques et communications réalisées dans le cadre de cette thèse.

1. Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Etude expérimentale d'un modèle de conservation des polynucléaires neutrophiles.

Ann.Biol.Clin.1991, 49, 155-160.

2. Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Conservation des polynucléaires neutrophiles.

Ann.Biol.Clin.1991, 49, 161-165.

3. Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Liquid preservation of granulocytes. Effect of various additives on chemotaxis preservation.

Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.1991, 29, 717-724.

4. Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Etude de l'évolution du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles conservés in vitro durant quatre jours.

Ann.Biol.Clin.(accepté).

5. Verstraeten L.

Transfusion de globules blancs ou antibiotiques?

Ann.Pharm.Belg.1991, 5, 30.

6. Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

L'adénosine triphosphate augmente le maintien du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles.

Path.Biol (soumis pour publication).

7. Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Four days liquid preservation of polymorphonuclear leukocytes collected by cytapheresis.

Transfusion Sciences (soumis pour publication).

8.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and chemotaxis in neutrophils during storage.

Clin.Chim.Acta (en préparation).

9.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Fonctions et conservation des polynucléaires neutrophiles.

IVème Rencontre Internationale de Biologie Clinique, Centre Hospitalier St Ode, 1987.

10.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Conservation des polynucléaires neutrophiles.Proposition d'un modèle expérimental.

IXème Congrès de la Société Française d'Hématologie, Grenoble, 1987.

11.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C.

Evolution du chimiotactisme et de la 3',5'guanosine monophosphate cyclique au cours d'essais de conservation des polynucléaires neutrophiles.

Journées nationales de la Société Française de Biologie Clinique, Vittel, 1990.

12.Pitiot A., Verstraeten L., Pauly F., Marchand-Arvier M., Vigneron C.

Analyse électrophorétique de membranes de polynucléaires neutrophiles conservés in vitro.

VIIIème Colloque de la Société Française d'électrophorèse, Lyon 1990.

Essai de conservation des polynucléaires neutrophiles

Résumé.

Une conservation adéquate des polynucléaires neutrophiles (PN) permettrait une étude plus aisée de leur structure et de leurs fonctions, ainsi qu'une utilisation plus commode de ces cellules comme outil biologique (localisation des infections profondes, transfusion...).

Malheureusement, aucune solution à ce problème n'a émergé à l'heure actuelle. L'analyse de la littérature révèle toutefois plusieurs informations cruciales, en particulier l'importance du pH du milieu de conservation (proche de 7.4), de la température de conservation (20-25°C), ainsi que la nécessité d'utiliser certains additifs (glucose...).

Après avoir choisi une série de paramètres (chimiotactisme, migration spontanée, réduction du nitrobleu de tétrazolium, phagocytose, adénosine triphosphate (ATP) intragranulocytaire, pH du milieu de conservation, libération de lysozyme et de bêta-glucuronidase), l'étude expérimentale a d'abord permis de sélectionner un milieu de conservation synthétique et injectable, à base de gélatine et d'électrolytes, le Plasmion^R.

Nous avons ensuite étudié l'influence de plusieurs additifs ou conditions de conservation sur les fonctions du PN.

L'apport de bicarbonate de sodium, de glucose, d'ATP, des vitamines C et E, d'amikacine et d'ampicilline, l'obscurité et l'absence d'agitation sont des facteurs favorables à la conservation des PN.

L'apport journalier de bicarbonate de sodium est un facteur décisif pour des conservations dépassant 48 h, surtout pour le maintien du chimiotactisme, la fonction du PN la plus précocement altérée.

Nous avons également étudié l'influence des autres additifs de conservation, de la 3',5' guanine monophosphate cyclique (GMPc) et de l'acétylcholine sur le maintien du chimiotactisme.

Une analyse structurale de la membrane du PN (par électrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines) et des PN entiers (protéines), par chromatographie liquide à haute performance, a aussi été entreprise dans le cadre de cette étude.

Finalement, nous avons tenté d'adapter les conclusions de notre étude expérimentale à la conservation des PN dans des poches transfusionnelles, obtenues selon une technique de centrifugation en flux continu.

L'apport journalier de tous les additifs utiles permet une conservation relativement satisfaisante durant quatre jours, bien que le maintien du chimiotactisme demeure insuffisant dans ces conditions.

Table des matières.

1.Partie bibliographique.

1.1.La granulopoïèse (p 3).

1.1.1.Structure et fonctions de la moëlle osseuse hématopoïétique (p 3).

1.1.2.Les cellules souches hématopoïétiques et leur différenciation (p 4).

1.1.3.Régulation de la granulopoïèse (p 5).

1.1.3.1.Les stimulateurs de la granulopoïèse (p 6).

1.1.3.2.Les inhibiteurs de la granulopoïèse (p 8).

1.1.3.3.Interactions entre protéines régulatrices (p 11).

1.1.4.Aspects morphologiques de la granulopoïèse (p 11).

1.1.4.1.Vision globale de la granulopoïèse (p 11).

1.1.4.2.Le myéloblaste (p 11).

1.1.4.3.Le promyélocyte (p 13).

1.1.4.4.Le myélocyte (p 14).

1.1.4.5.Le métamyélocyte (p 16).

1.1.4.6.Le polynucléaire neutrophile (PN) (p 16).

1.1.5.Cinétique de la granulopoïèse (p 17).

1.1.6.Destin du PN et durée de vie (p 19).

1.1.7.Formule leucocytaire et composition du myélogramme (p 19).

1.2.Le polynucléaire neutrophile (PN) (p 23).

1.2.1.Structure et physiologie du PN (p 23).

1.2.1.1.Métabolisme des acides nucléiques et des nucléotides (p 23).

1.2.1.2.Le cytosol (p 24).

1.2.1.2.1.Contenu commun aux autres cellules.

1.2.1.2.2.Contenu spécialisé.

1.2.1.2.2.1.Le glycogène.

1.2.1.2.2.2.Les agents antioxydants.

1.2.1.2.2.3.Les nucléotides pyridiniques.

- 1.2.1.3. Le métabolisme glucidique (p 28).
 - 1.2.1.3.1. La glycolyse.
 - 1.2.1.3.2. Les autres voies métaboliques.
 - 1.2.1.3.2.1. La respiration et le cycle de Krebs.
 - 1.2.1.3.2.2. La voie des pentoses phosphates.
 - 1.2.1.3.2.3. Le métabolisme du glycogène.
- 1.2.1.4. Le métabolisme des lipides (p 29).
- 1.2.1.5. Les granules du PN (p 30).
 - 1.2.1.5.1. Les granules primaires.
 - 1.2.1.5.2. Les granules secondaires ou spécifiques.
 - 1.2.1.5.3. Les granules tertiaires.
 - 1.2.1.5.4. Autres structures.
 - 1.2.1.5.5. Récapitulatif.
- 1.2.1.6. La membrane du PN (p 37).
 - 1.2.1.6.1. Introduction.
 - 1.2.1.6.2. Les glycoprotéines intrinsèques.
 - 1.2.1.6.3. Les glycoprotéines extrinsèques.
 - 1.2.1.6.4. Les récepteurs de membrane.
 - 1.2.1.6.4.1. Les récepteurs pour les opsonines.
 - 1.2.1.6.4.2. Les récepteurs pour les facteurs chimiotactiques.
 - 1.2.1.6.4.3. Autres types de récepteurs.
 - 1.2.1.6.5. Les protéines d'adhésion.
 - 1.2.1.6.6. Les enzymes membranaires.
 - 1.2.1.6.7. Le cytosquelette.
 - 1.2.1.6.7.1. Les microfilaments.
 - 1.2.1.6.7.1.1. L'actine.
 - 1.2.1.6.7.1.2. La myosine.
 - 1.2.1.6.7.1.3. L'actin-binding protein.
 - 1.2.1.6.7.1.4. La gelsoline.

- 1.2.1.6.7.1.5. La profiline.
- 1.2.1.6.7.1.6. Autres protéines régulatrices.
- 1.2.1.6.7.1.7. Phénomènes régulateurs.
- 1.2.1.6.7.2. Les microtubules.
 - 1.2.1.6.7.2.1. Structure des microtubules.
 - 1.2.1.6.7.2.2. Régulation de l'assemblage des microtubules.
 - 1.2.1.6.7.2.3. Rôle des microtubules.
- 1.2.1.7. Le processus de couplage stimulus-réponse (p 47).
 - 1.2.1.7.1. Les récepteurs.
 - 1.2.1.7.2. La protéine de couplage.
 - 1.2.1.7.3. Hydrolyse du phosphoinositide et activation des PN.
 - 1.2.1.7.4. La protéine kinase C (PKC) des PN.
 - 1.2.1.7.5. Polymérisation de l'actine et réarrangement du PN.
 - 1.2.1.7.6. Le métabolisme de l'acide arachidonique des PN
 - 1.2.1.7.6.1. Libération d'acide arachidonique.
 - 1.2.1.7.6.2. Métabolisme de l'acide arachidonique.
 - 1.2.1.7.7. Le platelet activating factor (PAF).
 - 1.2.1.7.8. Les ions Na^+ et K^+ .
 - 1.2.1.7.9. Le calcium intracellulaire.
 - 1.2.1.7.10. Les nucléotides cycliques.
- 1.2.2. Les fonctions des polynucléaires (p 63).
 - 1.2.2.1. Le chimiotactisme (p 63).
 - 1.2.2.1.1. Introduction.
 - 1.2.2.1.2. La génération des facteurs chimiotactiques.
 - 1.2.2.1.3. Reconnaissance des facteurs chimiotactiques et mobilité des PN.
 - 1.2.2.1.3.1. Mécanisme du chimiotactisme.
 - 1.2.2.1.3.1.1. Les étapes du chimiotactisme.
 - 1.2.2.1.3.1.2. La reconnaissance facteur chimiotactique-récepteur.
 - 1.2.2.1.3.2. Les effets biochimiques des seconds messagers.

1.2.2.1.3.2.1.Fusion des granules avec la membrane.

1.2.2.1.3.2.2.Interaction avec le cytosquelette.

1.2.2.1.3.2.3.Interaction avec les protéines kinases.

1.2.2.1.4.Conditions du déplacement des cellules.

1.2.2.2.La phagocytose (p 73).

1.2.2.2.1.Introduction.

1.2.2.2.2.Mécanisme du processus de phagocytose.

1.2.2.2.2.1.Mécanisme général.

1.2.2.2.2.2.Internalisation de la particule.

1.2.2.2.2.3.La dégranulation.

1.2.2.2.2.4.L'explosion respiratoire.

1.2.2.3.La bactéricidie (p 79).

1.2.2.3.1.Introduction.

1.2.2.3.2.Les mécanismes oxygène-indépendants.

1.2.2.3.2.1.Les protéines bactéricides du PN.

1.2.2.3.2.1.1.Les protéines cationiques.

1.2.2.3.2.1.2.Le facteur bactéricide azurophile.

1.2.2.3.2.1.3.Le lysozyme.

1.2.2.3.2.1.4.Les hydrolases acides.

1.2.2.3.2.2.La production d'inhibiteurs de croissance.

1.2.2.3.2.2.1.L'arginase.

1.2.2.3.2.2.2.La lactoferrine.

1.2.2.3.2.3.Variations de pH au sein du phagosome.

1.2.2.3.3.Les mécanismes oxygène-dépendants.

1.2.2.3.3.1.Introduction.

1.2.2.3.3.2.L'explosion respiratoire.

1.2.2.3.3.2.1.Les espèces oxydantes générées.

1.2.2.3.3.2.2.Activation de l'explosion respiratoire.

1.2.2.3.3.2.3.La NADPH oxydase.

- 1.2.2.3.3.2.4.Fin de l'explosion respiratoire.
- 1.2.2.3.3.2.5.Les mécanismes antioxydants.
- 1.2.2.3.3.3.Le système catalysé par la myéloperoxydase (MPO).
- 1.2.2.3.3.3.1.Localisation de la MPO.
- 1.2.2.3.3.3.2.Structure de la MPO.
- 1.2.2.3.3.3.3.Fonctions de la MPO.
- 1.2.2.4.Le rôle du PN au niveau de la réaction inflammatoire (p 101).
- 1.3.Transfusion et conservation des PN (p 102).
- 1.3.1.Indications des concentrés de PN (p 102).
- 1.3.1.1.Les neutropénies et les agranulocytoses (p 102).
- 1.3.1.2.Les pathologies fonctionnelles du PN (p 105).
- 1.3.1.3.Les utilisations comme bioréactifs (p 105).
- 1.3.1.4.Autres utilisations des concentrés de PN (p 105).
- 1.3.2.Les complications associées à la transfusion de PN (p 105).
- 1.3.2.1.Complications vis-à-vis du donneur (p 105).
- 1.3.2.1.1.Accidents liés au prélèvement.
- 1.3.2.1.1.1.Accidents locaux liés à la ponction.
- 1.3.2.1.1.2.Accidents généraux liés à la procédure.
- 1.3.2.1.2.Accidents liés aux cytophèses à répétition.
- 1.3.2.1.2.1.Perte de globules rouges.
- 1.3.2.1.2.2.Perte de plaquettes.
- 1.3.2.1.2.3.Effet sur les leucocytes.
- 1.3.2.1.2.4.Effet des cytophèses sur le système du complément.
- 1.3.2.1.2.5.Effet des cytophèses sur les facteurs de coagulation.
- 1.3.2.1.2.6.Effet sur le bilan hépatique.
- 1.3.2.1.2.7.Effet sur le métabolisme calcique.
- 1.3.2.2.Complications observées chez le receveur (p 108).
- 1.3.2.2.1.Les immunisations.
- 1.3.2.2.1.1.Les complications précoces.

- 1.3.2.2.1.2. Les complications tardives.
- 1.3.2.3. Conclusion (p 110).
- 1.3.3. La conservation des PN (p 111).
 - 1.3.3.1. Intérêt de la conservation des PN (p 111).
 - 1.3.3.2. Etapes intervenant dans la conservation des PN (p 111).
 - 1.3.3.3. La sélection des donneurs (p 112).
 - 1.3.3.4. Les méthodes de prélèvement des donneurs (p 112).
 - 1.3.3.4.1. La ponction veineuse.
 - 1.3.3.4.2. La cytaphérèse.
 - 1.3.3.4.2.1. Introduction.
 - 1.3.3.4.2.2. La prémédication aux glucocorticoïdes.
 - 1.3.3.4.2.3. Les macromolécules
 - 1.3.3.4.2.3.1. L'hydroxyéthylamidon.
 - 1.3.3.4.2.3.2. La gélatine fluide modifiée.
 - 1.3.3.4.2.4. Les anticoagulants.
 - 1.3.3.4.2.5. Les techniques de séparation par centrifugation.
 - 1.3.3.4.2.5.1. Introduction.
 - 1.3.3.4.2.5.2. Principe de la centrifugation.
 - 1.3.3.4.2.5.3. Centrifugation en flux continu et en flux discontinu.
 - 1.3.3.4.2.6. Les méthodes de séparation par filtration.
 - 1.3.3.4.2.7. Les méthodes de séparation par élutriation.
 - 1.3.3.4.2.8. Comparaison des différentes techniques de cytaphérèse.
 - 1.3.3.4.2.9. Contenu d'un concentré de PN.
 - 1.3.3.5. Les méthodes de conservation des PN (p 122).
 - 1.3.3.5.1. Introduction.
 - 1.3.3.5.2. Evaluation des capacités fonctionnelles des PN conservés.
 - 1.3.3.5.3. Les conservations en milieu liquide.
 - 1.3.3.5.3.1. Contamination érythro-plaquettaire.
 - 1.3.3.5.3.2. Concentration en PN.

- 1.3.3.5.3.3. Conteneur utilisé pour la conservation.
- 1.3.3.5.3.4. Anticoagulant utilisé.
- 1.3.3.5.3.5. Agitation du milieu de conservation.
- 1.3.3.5.3.6. pH du milieu de conservation.
- 1.3.3.5.3.7. Température de conservation.
- 1.3.3.5.3.8. Le glucose.
- 1.3.3.5.3.9. Les cations divalents.
- 1.3.3.5.3.10. Les réducteurs.
- 1.3.3.5.3.11. Les protéines.
- 1.3.3.5.3.12. Les corticostéroïdes.
- 1.3.3.5.3.13. La désoxyribonucléase.
- 1.3.3.5.3.14. Le para-amino-benzoate.
- 1.3.3.5.3.15. Principaux additifs de conservation.
- 1.3.3.5.3.16. Evolution des principales fonctions ou paramètres relatifs aux PN au cours de la conservation en milieu liquide.
 - 1.3.3.5.3.16.1. Le chimiotactisme.
 - 1.3.3.5.3.16.2. L'adénosine triphosphate.
 - 1.3.3.5.3.16.3. La chimiluminescence.
 - 1.3.3.5.3.16.4. La réduction du nitrobleu de tétrazolium, la phagocytose et la viabilité.
- 1.3.3.5.3.17. Récapitulatif.
- 1.3.3.5.4. Les cryopréservations.
- 1.4. Conclusions générales et bases théoriques d'un modèle expérimental (p 136).

2.Etude expérimentale (p 139).

2.1.Etude fonctionnelle des PN conservés(p 141).

2.1.1.Choix de la méthode de séparation des PN et du milieu de conservation (p 141).

2.1.1.1.Choix des méthodes liquides (p 141).

2.1.1.2.Choix des fonctions des PN à étudier lors de leur conservation (p 142).

2.1.1.3.Choix des méthodes de prélèvement des PN (p 143).

2.1.1.3.1.Choix des donneurs.

2.1.1.3.2.Ponction veineuse.

2.1.1.3.3.Cytaphérèse.

2.1.1.4.Choix des méthodes de séparation des PN (p 144).

2.1.1.4.1.Sédimentation sur dextran.

2.1.1.4.2.Sédimentation sur Percoll^R.

2.1.1.5.Choix de la température de conservation (p 145).

2.1.1.6.Choix du milieu de conservation (p 146).

2.1.1.6.1.Méthodologie

2.1.1.6.2.Milieu tampon phosphate/albumine.

2.1.1.6.3.Milieu Rhéoslander^R.

2.1.1.6.4.Milieu Plasmagel^R glucosé désodé.

2.1.1.6.5.Milieu Plasmion^R.

2.1.1.6.6.Analyse des résultats obtenus.

2.1.1.6.7.Plasmagel^R + bicarbonate 9 mmol/ L.

2.1.1.6.8.Plasmion^R + bicarbonate 9 mmol/ L.

2.1.1.6.9.Conclusion.

2.1.2.Influence de certains additifs de conservation (p 162).

2.1.2.1.Introduction-méthodologie (p 162).

2.1.2.2.Bicarbonate (p 164).

2.1.2.3.Glucose (p 170).

2.1.2.4.Calcium (p 174).

- 2.1.2.5. Stérilité de la séparation des PN (p 178).
- 2.1.2.6. Adénosine triphosphate (p 181).
- 2.1.2.7. Agitation (p 184).
- 2.1.2.8. Obscurité (p 189).
- 2.1.2.9. Vitamine C (p 192).
- 2.1.2.10. Milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (p 196).
- 2.1.2.11. Barbotage d'azote (p 201).
- 2.1.2.12. Barbotage d'oxygène (p 205).
- 2.1.2.13. Nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) (p 209).
- 2.1.2.14. Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) (p 212).
- 2.1.2.15. Acétate d'alpha-tocophérol (p 215).
- 2.1.2.16. Antibiotiques (p 219).
- 2.1.2.17. Corticoïdes (p 223).
- 2.1.2.18. Centrifugation à basse vitesse (p 225).
- 2.1.2.19. Composition du récipient (p 228).
- 2.1.2.20. Antiprotéases (fluorure de sulfonylphénylméthane) (p 230).
- 2.1.2.21. Désoxyribonucléase 1 (p 232).
- 2.1.2.22. Conclusion (p 233).
- 2.1.3. Modification du milieu au cours de la conservation des PN (p 236).
 - 2.1.3.1. Addition de bicarbonate au milieu de conservation au bout de 0 h et de 24 h (p 236).
 - 2.1.3.2. Ajout quotidien de tous les additifs utiles-Influence sur le chimiotactisme (p 241).
 - 2.1.3.3. Ajout quotidien de tous les additifs utiles-Influence sur les fonctions du PN (p 246).
- 2.1.4. Action de l'adénosine triphosphate sur le chimiotactisme (p 253).
- 2.1.5. Etude du métabolisme de la 3',5'guanosine monophosphate cyclique (GMPc) au cours de la conservation des PN (p 258).

2.1.6. Influence de la 3',5'guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et de l'acétylcholine sur le taux de GMPc intragranulocytaire et sur le chimiotactisme des PN conservés in vitro (p 263).

2.2. Etude électrophorétique des protéines de la membrane de PN conservés (p 269).

2.3. Analyse des protéines du PN par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) (p 274).

2.4. Essai final (p 279).

3. Conclusion (p 289).

3.1. Intérêt et limites du modèle.

3.2. Applications pratiques possibles.

3.3. Perspectives d'avenir.

4. Annexes techniques (p 295).

Annexe 1: Migration par chimiotactisme et migration spontanée des polynucléaires (p 297).

Annexe 2: Test cytochimique de réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) et de phagocytose (p 300).

Annexe 3: Mesure de la chimiluminescence (p 302).

Annexe 4: Adénosine triphosphate (ATP) intragranulocytaire et extragranulocytaire (p 305).

Annexe 5: Dosage de la bêta-glucuronidase libérée dans le milieu de conservation (p 308).

Annexe 6: Dosage du lysozyme libéré dans le milieu de conservation (p 312).

Annexe 7: Séparation des PN par cytophérèse (p 314).

Annexe 8: Sédimentation accélérée sur Dextran (p 316).

Annexe 9: Dosage de la 3',5'guanosine monophosphate cyclique (GMPC)
(p 318).

Annexe 10: Analyse électrophorétique des protéines de membrane de
polynucléaires neutrophiles conservés in vitro (p 322).

Annexe 11: Analyse des protéines du PN par chromatographie liquide à haute
performance en phase inverse (RP-HPLC) (p 329).

5. Références bibliographiques (p 331).

1.Etude bibliographique.

1.1.La granulopoïèse.

1.1.1.Structure et fonctions de la moelle osseuse hématopoïétique.

La moelle osseuse hématopoïétique, source des cellules sanguines est un organe de taille importante (proche de celle du foie) mais qui est dispersé dans plusieurs os (1).

Structurellement, la moelle osseuse peut être subdivisée en deux compartiments: un secteur extravasculaire qui est le siège de l'hématopoïèse et un secteur vasculaire constitué principalement de sinus (1).

L'hématopoïèse, le processus de formation des cellules sanguines, commence au niveau extra-embryonnaire (îlots de Wolff et Pander, situés dans le placenta) au cours de la 3ème ou 4ème semaine de gestation, avec la différenciation de cellules mésoblastiques en cellules souches hématopoïétiques (2). Ces cellules donneront naissance aux érythroblastes, les précurseurs des globules rouges. L'activité hématopoïétique placentaire décline rapidement, pour devenir négligeable au milieu du troisième mois de gestation (3).

Ce déclin s'accompagne d'une nette croissance de l'hématopoïèse hépatique (3). A la différence de l'hématopoïèse placentaire, la phase hépatique est caractérisée par la génération de toutes les cellules sanguines : les érythrocytes (érythropoïèse), les leucocytes (leucopoïèse) et les thrombocytes (thrombocytopoïèse) (1,2).

L'activité hématopoïétique durant la phase hépatique est majorée par les contributions de la rate et de la moelle osseuse, qui produisent toutes les cellules sanguines, bien que la rate soit plus volontiers productrice de lymphocytes (lymphocytopoïèse) (1,4). La contribution de la rate est courte, du troisième au sixième mois de la gestation (1).

La moelle osseuse commence à produire des cellules sanguines à partir du 5ème mois de la gestation et son activité hématopoïétique va croître continuellement par la suite, pour atteindre un maximum à la naissance (4). Elle devient alors le siège quasi exclusif de l'hématopoïèse et de la production de cellules souches hématopoïétiques, durant toute la vie (à l'état normal) (4). La seule contribution hématopoïétique extérieure provient alors du tissu lymphoïde, qui assure une production de lymphocytes et de plasmocytes tout au cours de la vie (3). A la naissance, les phases hépatiques et spléniques sont pratiquement négligeables, mais maintiennent leur capacité potentielle d'hématopoïèse (1,2,4).

1.1.2. Les cellules-souches hématopoïétiques et leur différenciation.

Nous nous limiterons ici essentiellement à la granulopoïèse.

Toutes les cellules médullaires, soit les séries érythrocytaires, granulomonocytaires, lymphocytaires et mégacaryocytaires, proviennent d'une population cellulaire: les cellules souches totipotentes (*totipotent stem cells*), qui vont se différencier en cellules souches pluripotentes (*pluripotent stem cells* ou PSC) (4-7).

Non reconnaissables morphologiquement, les PSC ont été reconnues fonctionnellement par Till et Mac Cullock comme CFU-S (*colony-forming unit, spleen*) (3-7). Les PSC sont capables d'autorenouvellement, de prolifération et de différenciation (3,5,6). Sous l'influence de facteurs humoraux et facteurs de microenvironnement, les PSC se différencient en 2 types de *committed stem cells* (CSC) ou cellules souches engagées dans une voie de différenciation: les CFU-GEMM (*colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage and megacaryocyte*) et les cellules-souches lymphoïdes (CFU-L) (4-7). Ces 2 types cellulaires ne sont pas reconnaissables morphologiquement (5-7). En ce qui concerne les facteurs de

microenvironnement, il faut noter que les hormones stimulatrices de type CSF (colony stimulating factor) , indépendamment de leur action générale liée à leur passage dans la circulation sanguine, peuvent aussi exercer un effet local sur les cellules hématopoïétiques (7). Les cellules stromales médullaires semblent également exercer un effet stimulateur sur la granulopoïèse (7). De plus, le tissu adipeux paraît être capable d'interactions actives avec le tissu hématopoïétique (7).

La différenciation ultérieure des CFU-GEMM va donner naissance aux myéloblastes et aux monoblastes, cellules morphologiquement reconnaissables (5-7). Le myéloblaste va se différencier en promyélocyte, qui va lui-même se transformer en myélocyte neutrophile, éosinophile et basophile (3). Ces lignées neutrophiles, éosinophiles et basophiles passent alors par les stades de maturation suivants : métamyélocyte (band cells) et polynucléaires mûrs (3,4). Les polynucléaires neutrophiles sont désignés par l'abréviation PN. Ces données sont résumées par la figure 1.

Les cellules-souches hématopoïétiques et leurs "descendants" peuvent être caractérisés fonctionnellement par des systèmes de culture cellulaire et également par l'identification d'antigènes (Ag) de membranes (par l'utilisation d'anticorps monoclonaux et par cytométrie de flux) (5-8). L'identification des antigènes de membrane permet de reconnaître les précurseurs au stade cellule souche pluripotente (Ag CD 34), CFU-GEMM (Ag CD 33 et 34) et CFU-GM (CD 33) (8). Les cellules granulocytaires morphologiquement reconnaissables possèdent également des antigènes de surface reconnaissables de la même façon (figure 1).

1.1.3.Régulation de la granulopoïèse.

La régulation de la granulopoïèse reste relativement mal connue à l'heure actuelle (3). Néanmoins, plusieurs facteurs de régulation, aussi appelés cytokines, facteurs humoraux, facteurs de croissance ou granulopoïétines ont

été identifiés, purifiés, clonés et caractérisés au niveau fonctionnel (9). L'ensemble des données relatives à ce sujet forme un domaine très complexe, qui sera résumé ici dans 2 paragraphes: les stimulateurs et les inhibiteurs de la lignée granulopoïétique (3,9).

1.1.3.1. Les stimulateurs de la granulopoïèse.

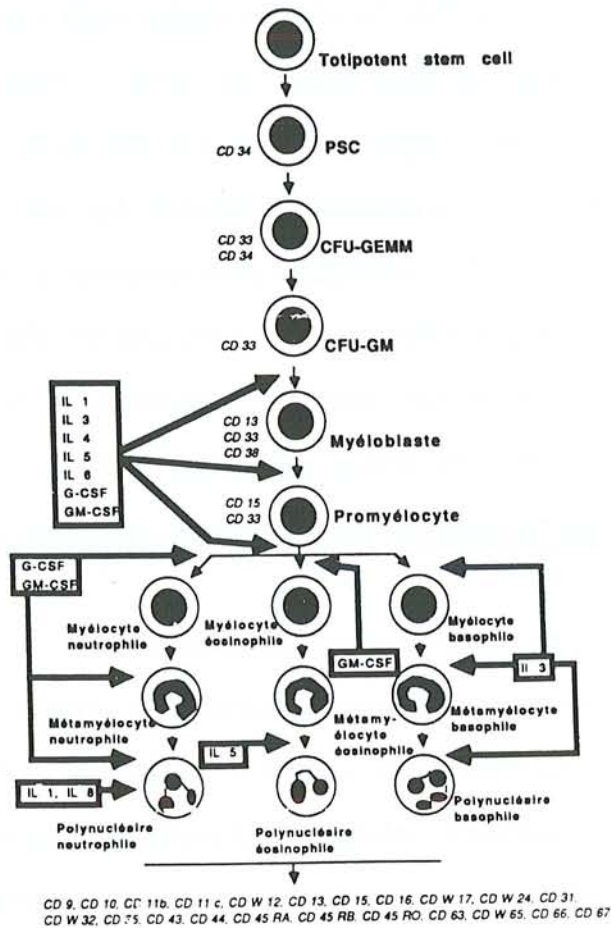
Les stimulateurs les mieux connus sont les CSF (*colony-stimulating factor*) (3). Ils peuvent agir à 3 niveaux, au moins: 1) prolifération des cellules souches; 2) différenciation de la lignée granulocytaire; 3) activation des PN mûrs, notamment au niveau du chimiotactisme, de la phagocytose, du métabolisme oxydatif et de l'expression d'antigènes membranaires (9). Nous détaillerons ici brièvement les principaux stimulateurs de la granulopoïèse.

Le GM-CSF (*granulocyte/monocyte, megacaryocyte-colony stimulating factor*) est sécrété par les lymphocytes T activés et les cellules stromales médullaires (cellules endothéliales et fibroblastes) (3,5). Il stimule la production des granulocytes par un accroissement de la prolifération et de la différenciation des CFU-GEMM, CFU-GM et des myéloblastes (figure 1). En outre, il contrôle toutes les étapes de différenciation de la lignée neutrophile (et la plupart des étapes des éosinophiles) à partir du stade promyélocyte (3,5,7). Il intervient également au niveau de la différenciation de la lignée monocyttaire (3,5,7).

Le G-CSF ou *granulocyte-colony stimulating factor* est sécrété par les monocytes et les fibroblastes (3,5,7). Il favorise la production des granulocytes par un mécanisme proche du GM-CSF, mais il n'agit pas au niveau de la lignée monocyttaire (figure 1) (3,5,7).

L'IL1 est une protéine sécrétée par les lymphocytes T et B, les macrophages, les cellules endothéliales et d'autres types de cellules nucléées (6). Elle agit au niveau de la granulopoïèse en stimulant la différenciation et la prolifération des

Figure 1 : Différenciation de la lignée granulocytaire (1-7).



PSC : pluripotent stem cell; CFU-GEMM : colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage and megacaryocyte; CFU-GM : colony-forming unit-granulocyte, monocyte; G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF : granulocyte, monocyte-colony stimulating factor; IL : interleukine; CD : cluster de différenciation.

cellules souches CFU-GEMM, CFU-GM et des myéloblastes (6) (figure 1). Elle active également les PN mûrs (6).

L'IL3, aussi connue sous le nom de multi-CSF, est une glycoprotéine produite par les lymphocytes T activés (6). Elle possède une action stimulatrice sur la prolifération et la différenciation des cellules-souches totipotentes, des CFU-GEMM ainsi que sur les descendants de celles-ci pour les lignées granulocytaire, monocyttaire, mégacaryocytaire et érythrocytaire (6) (figure 1).

L'IL3 contrôle la différenciation de tous les stades de la lignée basophile (6).

Les interleukines 4, 5 et 6 interviennent principalement au niveau de la différenciation et de la prolifération des cellules souches (figure 1) (5-7).

L'interleukine 8 et l'interféron gamma interviennent à des stades de différenciation ultimes (PN, mastocytes...) (figure 1) (5-7).

1.1.3.2. Les inhibiteurs de la granulopoïèse.

Ils sont nettement moins bien connus que les stimulateurs.

Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'existence de peptides associés aux granulocytes mûrs, qui inhibent la production des cellules granulocytaires : *pluripotent stem cell inhibitor*, *inhibitory endopeptide*, *granulocyte chalone*, *hemoregulatory peptide...* (tableau I) (9). Certains de ces peptides agissent à des niveaux précoces de différenciation (CFU-S, CFU-GM...) (9). D'autres types d'inhibiteurs ont également été décrits (9). Certains d'entre eux, comme la lactoferrine, les isoferritines acides et la prostaglandine E, semblent agir en inhibant la production par les macrophages et les monocytes de CSF régulant la granulopoïèse (figure 2) (3,9).

L'interféron gamma (interféron immun) inhibe la croissance de nombreuses cellules (tumorales ou non) par une activation des T suppresseurs et des *natural killers* (3,9).

Tableau I : Les inhibiteurs de la granulopoïèse, d'après Benestad et Laerum (9).

Protéines et peptides

Lactoferrine

Interférons

Tumor necrosing factor alpha

Leukemia associated inhibitor

Colony -forming unit,spleen inhibitor

Pluripotent stem cell inhibitor

Inhibitory endopeptide

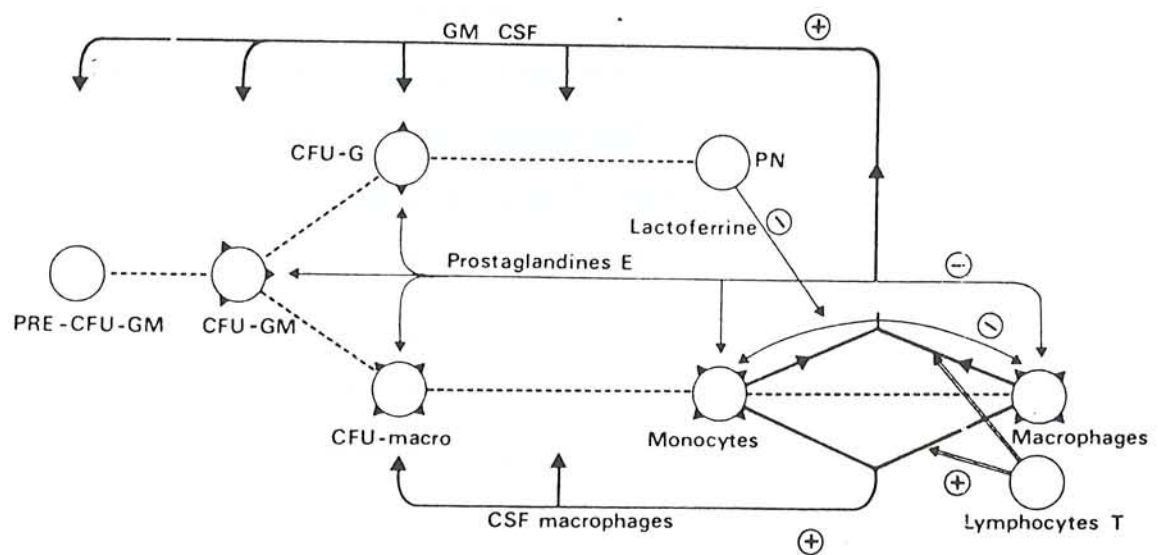
Granulocyte chalone

Hemoregulatory peptide

Autre nature

Prostaglandine E

Figure 2 : Régulation de la lignée granulomonocytaire, d'après Dreyfus (3).



- CFU-GM : Précurseur bipotent (neutrophile, monocyte).
 CFU-G : Précurseur déterminé vers les granuleux.
 CFU-Macro : Précurseur déterminé vers la lignée monocytaire/
 GM-CSF : Stimulant agissant sur la différenciation de la CFU-GM et de toute la lignée neutrophile.
 ▲ : I a

La lymphotoxine (LT) agit synergiquement avec les interférons pour inhiber la croissance cellulaire (9).

Enfin, d'autres inhibiteurs ont été mis en évidence récemment: TNF alpha (*tumor necrosing factor*), LAI (*leukemia associated inhibitor*), CFU-S *inhibitor*...(9).

1.1.3.3.Interactions entre protéines régulatrices.

De nombreuses interactions ont été démontrées en ce qui concerne ces différentes protéines régulatrices. Nous ne citerons que quelques exemples. L'IL1, produite par les monocytes, est requise pour la production d'interleukine 2 (IL2) par les lymphocytes T *helpers* (9).

L'IL2 stimule les lymphocytes pour la production d'interféron gamma et stimule également les lymphocytes T à produire plus d'IL2 (9).

L'interféron gamma à faible concentration peut augmenter la production de GM-CSF à partir des monocytes (9).

1.1.4.Aspects morphologiques de la granulopoïèse.

1.1.4.1.Vision globale de la granulopoïèse.

La granulopoïèse des cellules morphologiquement reconnaissables commencera par la prolifération et la différenciation du myéloblaste en 2 promyélocytes (7,8). Ceux-ci vont produire à leur tour 2 myélocytes (7,8).

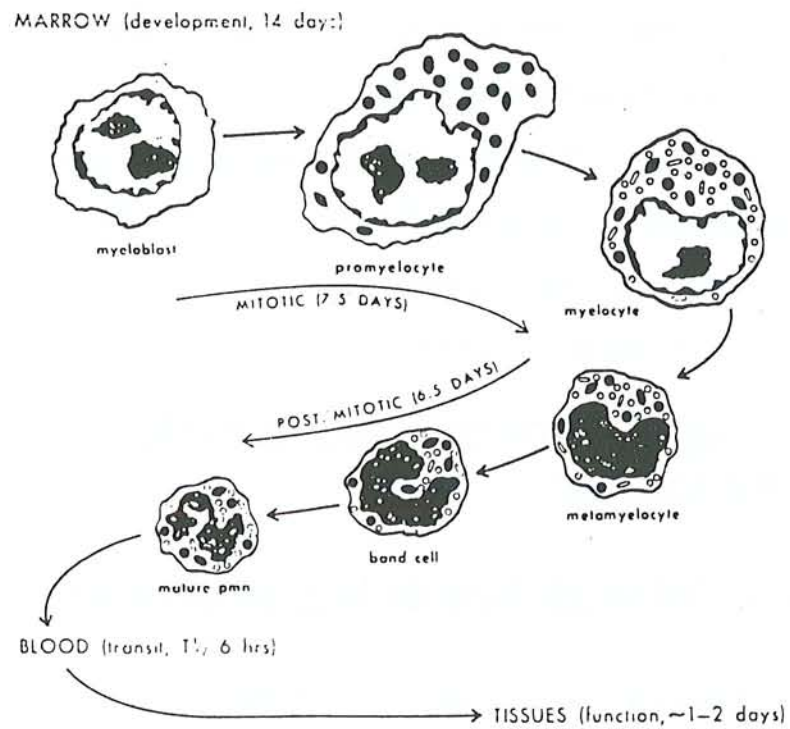
L'ensemble du phénomène est résumé par la figure 3 (7).

Nous traiterons ici uniquement la différenciation de la lignée neutrophile

1.1.4.2.Le myéloblaste.

Il s'agit d'une cellule peu fréquente au niveau du myélogramme (0.5 à 2 %) (10). Sa taille est d'environ 20 à 25 µm (10). Elle est le plus souvent de forme ovale, parfois arrondie et son rapport nucléo-cytoplasmique est élevé (8). Le

Figure 3 : Les étapes de la granulopoïèse, d'après Golde (7).



noyau possède une chromatine à trame fine et les nucléoles sont au nombre de 2 à 5 (3). L'examen de la cellule après coloration au May-Grunwald-Giemsa (MGG) montre que le cytoplasme, basophile, contient des granulations azurophiles ou primaires, petites et rares dans la cellule jeune et qui, peu à peu, deviennent de plus en plus nombreuses (10).

L'observation en microscopie électronique révèle que l'apparition des citernes ergastoplasmiques et le développement de la zone de Golgi précèdent l'apparition des granulations (10). Ces deux organites ont en effet un rôle capital dans l'élaboration de l'emballage des protéines contenues à l'intérieur des granulations (7,8). Les enzymes synthétisées dans les ribosomes sont stockées dans les sacs d'ergastoplasme, puis véhiculées dans les canalicules de l'appareil de Golgi où elles sont concentrées, entourées de membranes; ainsi naissent les vacuoles au contenu dense qui par fusion donnent les granulations (10).

Plusieurs enzymes présentes dans les granulations (en particulier la peroxydase) ont été mises en évidence dans l'ergastoplasme et la zone de Golgi pendant la période de formation de ces granulations (3,8).

1.1.4.3. Le promyélocyte.

D'une taille d'une vingtaine de μm , cette cellule qui représente 2 à 8 % des cellules du myélogramme possède un noyau volumineux, souvent excentré (8). Par endroit, la chromatine commence à se condenser et les nucléoles deviennent moins visibles (8). Le cytoplasme, abondant, est moins basophile que dans le stade précédent; une zone claire dépourvue de granulations déprime souvent le noyau; c'est l'emplacement de la zone de Golgi (8).

L'examen après coloration au MGG révèle que les granulations, nombreuses, sont de 2 types: les granulations azurophiles (ou primaires) qui sont colorées en rouge vif, et les granulations neutrophiles (ou spécifiques ou secondaires) qui sont de couleur marron clair (8,10).

Au moins 2 catégories de granulations azurophiles sont identifiées par l'examen au microscope électronique: les unes sont denses, sphériques, les autres allongées et contenant une inclusion cristalline (8). Les 2 types sont riches en peroxydase (3). La diversité de leur équipement en protéines basiques et enzymes hydrolytiques suggérée par les premières études biochimiques demande à être confirmée (3).

Durant la dernière phase du stade promyélocytaire, la production des granulations primaires riches en peroxydase cesse et l'activité enzymatique disparaît de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi (8). Une nouvelle catégorie de granulations apparaît, correspondant aux granulations spécifiques (10). Le terme de granulations secondaires leur est donné en raison de leur synthèse plus tardive dans le développement cellulaire (10). Elles sont plus petites, moins denses, dépourvues d'enzymes lysosomiales et de peroxydases (8). Elles contiennent des protéines basiques, de la lactoferrine et probablement de la collagénase (8,10).

La figure 4 reprend l'ultrastructure schématique du promyélocyte (10).

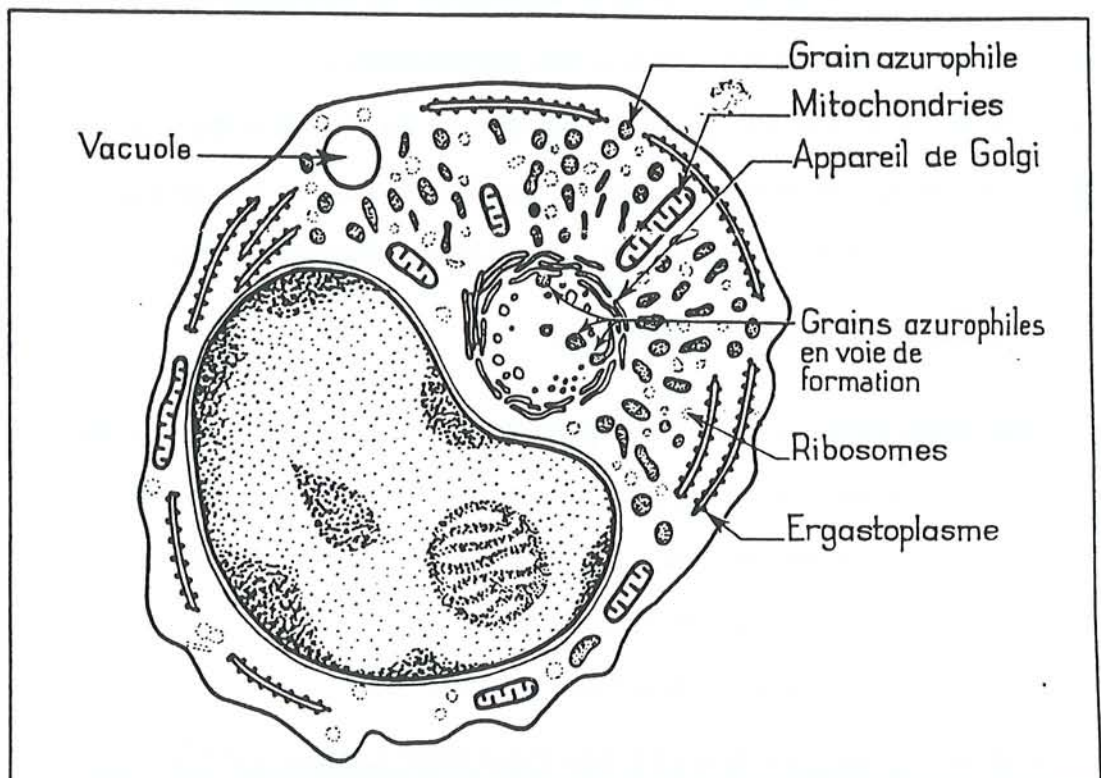
1.1.4.4. Le myélocyte.

Sa taille est d'environ 15 μm (3). Le noyau arrondi présente des masses chromatinienne (3). Le cytoplasme, acidophile, est parsemé de granulations neutrophiles de teinte marron ou beige, au MGG (8).

Les granulations spécifiques continuent à se former (10).

Dans un premier temps, l'avis que les granulations azurophiles (primaires) se transforment en granulations spécifiques a prévalu (8). Cependant, les expérimentations récentes en microscopie électronique menées chez de nombreuses espèces animales démontrent que ces 2 catégories de granules sont tout à fait séparées (8,10). Elles se forment à des moments différents du développement cellulaire, prennent naissance à partir de faces différentes des

Figure 4 : Ultrastructure schématique du promyélocyte, d'après Bernard et coll.(10).



lamelles golgiennes et renferment des enzymes différentes (8,10).

Les analyses biochimiques de granulations isolées à partir de PN humains, puis séparées par gradient, montrent que les granulations les plus grandes et les plus denses contiennent des phosphatases acides, bêta-galactosidase et bêta-glucuronidase, tandis que les granulations les plus petites et les plus légères renferment 50 % du lysozyme et de la lactoferrine, les phosphatases alcalines semblant être contenues dans des vésicules indépendantes (8).

Le nombre de granulations primaires diminue au cours de la maturation des granulocytes pour deux raisons: division cellulaire et arrêt de leur production (10). Celle-ci est alors remplacée par celle des granulations secondaires (10).

1.1.4.5.Le métamyélocyte.

Ce stade est caractérisé par un allongement du noyau qui s'incurve sans être encore, comme dans la cellule mûre, séparé en plusieurs lobes réunis par un filament (8). La chromatine forme des blocs très denses, bien délimités (8). Le cytoplasme est le même que celui du myélocyte (10).

Les petites granulations continuent à être produites (10).

1.1.4.6.Le granulocyte ou polynucléaire (PN).

C'est une cellule de 2 à 14 μm (8). Le noyau est segmenté en plusieurs lobes (deux à cinq) (8). Le cytoplasme, coloré en beige clair ou rosé, est rempli de nombreuses granulations neutrophiles marron ou beige (8). Il faut noter qu'un troisième type de granules (granules tertiaires) a été décrit récemment (7,10).

L'examen en microscopie électronique montre que dans les granulocytes du sang, les granulations primaires, riches en peroxydases, subsistent en petit nombre (10). Leur affinité pour les colorants ou la perméabilité de leur membrane s'est modifiée au cours de la maturation puisqu'il n'est pas possible de distinguer des granulations azurophiles dans un granulocyte mûr (8).

La figure 5 reprend ces données de façon schématique (10).

1.1.5. Cinétique de la granulopoïèse.

Les cellules de la lignée sont aptes à la mitose jusqu'au stade myélocyte (10). On appelle l'ensemble des cellules qui se divisent secteur ou *pool* de multiplication (7,10). Ce sont les myélocytes qui constituent la partie la plus importante et la plus efficace de ce secteur (10). A l'état normal, ce secteur se maintient constant en quantité absolue, les cellules qui mûrissent et quittent ce secteur étant remplacées par la division d'autres cellules du secteur (10). Avec une demi-vie de 6 à 7 heures, le *turnover* et le taux de production des granulocytes est prodigieux : $16.3.10^8 / \text{kg} / 24 \text{ h}$ (10).

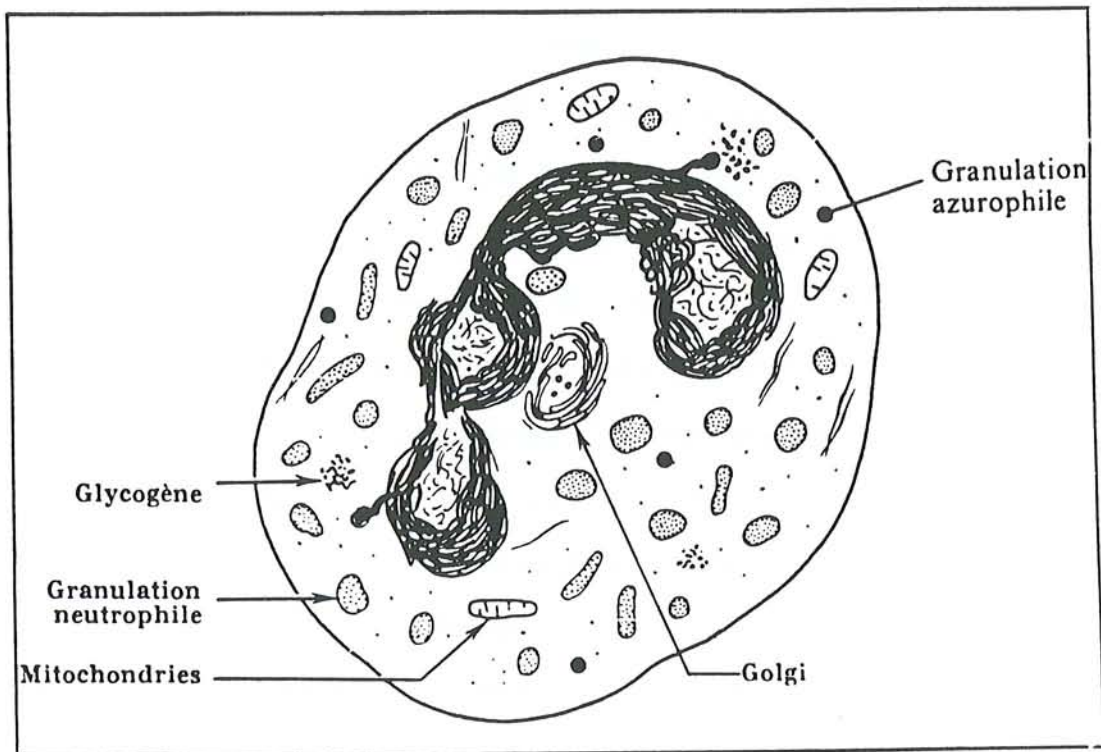
Les cellules qui ne se divisent plus, c'est-à-dire certains myélocytes, les métamyélocytes et les PN restent dans la moelle encore 4 à 5 jours au total pour achever d'y mûrir avant de passer dans le sang (1,7,10). C'est le secteur ou *pool* de maturation (10). La réserve médullaire de PN est considérable, plusieurs fois supérieure à celle qui circule dans le sang (2).

Dans le sang, les PN ne sont pas tous en circulation; ils sont divisés en 2 secteurs approximativement égaux: le secteur circulant et le secteur marginal, fait de PN collés aux parois vasculaires qui repassent immédiatement en circulation en fonction des besoins (3). En cas de stress, d'exercice, d'augmentation du taux d'adrénaline et de corticostéroïdes, d'infection (pyrogènes), l'équilibre est déplacé vers le secteur circulant (10).

En cas de besoins accrus de PN, l'organisme dispose de deux ressources. D'une part, immédiatement, faire passer plus vite dans le sang les PN qui achevaient leur maturation dans la moelle et qui ont pour caractéristique d'avoir un noyau encore peu segmenté (moins de 3 lobes) (7). En cas de grands besoins, des métamyélocytes ou même des myélocytes peuvent passer dans le sang (notamment en cas d'infection ou de régénération médullaire) (7).

D'autre part, si le besoin se prolonge, le secteur de multiplication va s'accroître par mitoses supplémentaires pour fabriquer un plus grand nombre de cellules:

Figure 5 : Ultrastructure schématique du polynucléaire neutrophile, d'après Bernard et coll. (10).



la moelle possède alors un aspect d'hyperplasie granuleuse, dû à l'augmentation de la lignée granulocytaire (7). On ignore par quel mécanisme se fait cette régulation (10).

La figure 6 résume la dynamique de la granulopoïèse (10).

La différenciation et la maturation de la lignée granulocytaire depuis le myéloblaste jusqu'au PN mûr prend de 7 à 11 jours (10).

1.1.6.Destin du PN et durée de vie.

Le PN ne séjourne que très peu de temps dans le sang, qui n'est qu'un lieu de passage pour lui (3,10). En 12 h, environ 50 % des PN du sang l'ont déjà quitté en traversant l'endothélium vasculaire par le processus de diapédèse, pour passer dans les tissus (10). De là, les PN ne retournent jamais vers le sang; ils effectuent leurs fonctions de phagocytose et sont détruits par les macrophages, sur place ou dans les ganglions (3,10).

1.1.7.Formule leucocytaire et composition du myélogramme.

Elles sont résumées par les tableaux II et III (10).

Figure 6 : Dynamique de la granulopoïèse, d'après Bernard et coll. (10).

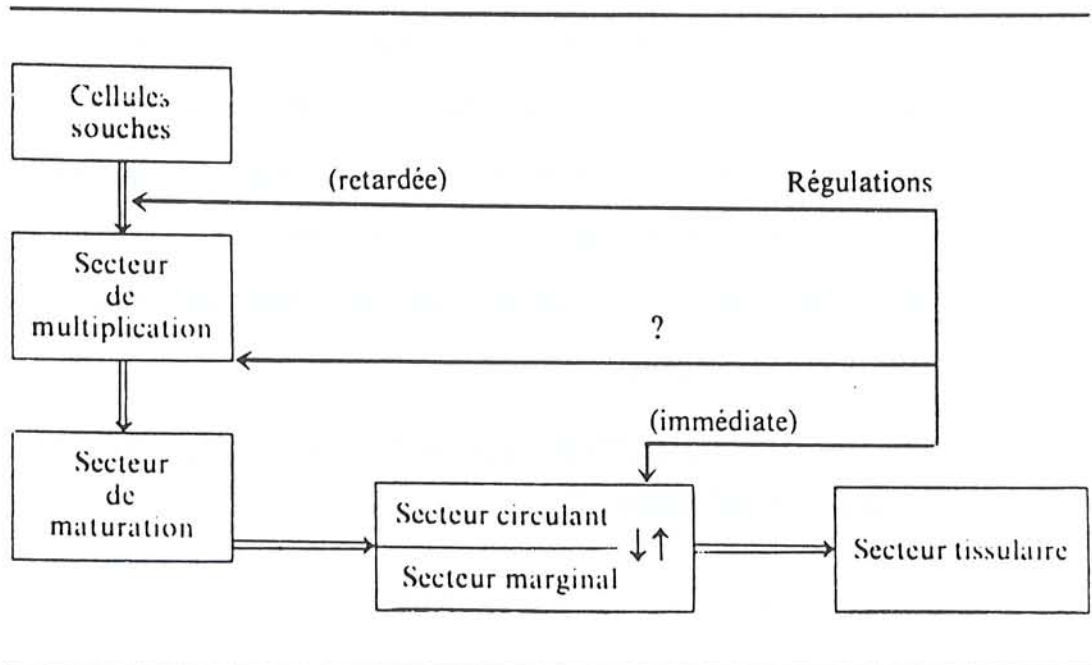


Tableau II : Formule sanguine leucocytaire, d'après Bernard et coll. (10).

<i>Types de leucocytes</i>	<i>Formule (%)</i>	<i>Nombres absolus (par mm³)</i>
Polynucléaires neutrophiles (P.N.)	45 à 70	1 700 à 7 000
Polynucléaires éosinophiles (P.E.)	1 à 5	50 à 500
Polynucléaires basophiles (P.B.)	0 à 0,5	10 à 50
Lymphocytes	20 à 40	1 500 à 4 000
Monocytes	3 à 10	100 à 1 000

Tableau III : Composition du myélogramme normal, d'après Bernard et coll. (10).

I.	<i>Lignée du globule rouge ou érythroblastique</i> (Proérythroblastes, érythroblastes, basophile, polychromatophile, et acidophile).	8 à 30 %
II.	<i>Lignée du polynucléaire neutrophile ou granulocytaire .</i> (Myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte et P.N.).	50 à 70 %
III.	<i>Lignées éosinophiles et basophiles</i>	2 à 4 %
IV.	<i>Lignée plaquettaire : les mégacaryocytes</i>	présents
V.	<i>Lignée monocyttaire</i>	2 à 3 %
VI.	<i>Cellules souches (dites « indifférenciées ») ou hémoblastes.</i>	1 à 2 %
VII.	<i>Éléments « non myéloïdes »</i> (Lymphocytes, plasmocytes).	moins de 20 %

1.2.Le polynucléaire neutrophile (PN).

1.2.1.Structure et physiologie du PN.

1.2.1.1.Métabolisme des acides nucléiques et des nucléotides.

Le noyau contient tous les types d'ARN (acide ribonucléique) nécessaires à la synthèse des protéines : ARN de transfert, ARN ribosomal et ARN messager (11). La quantité d'ARN décroît au cours de la maturation du PN (11).

Le contenu en ADN (acide désoxyribonucléique) des PN et de leurs précurseurs correspond à 0.7 pg d'ADN (exprimé sous forme de phosphore) par cellule (11).

L'ADN polymérase est plus active dans les précurseurs de la lignée granulocytaire que dans les PN (11). Ce fait est en rapport avec l'arrêt des mitoses au stade myélocyte (11). La présence de ribonucléase et de désoxyribonucléase au niveau des lysosomes des PN suggère que ces organites sont impliqués dans la dégradation des acides nucléiques (11). L'activité de la ribonucléase est 10 fois plus élevée au niveau des PN que des myéloblastes (3,11).

D'autres enzymes susceptibles d'intervenir au niveau des acides nucléiques ont été décrites: nucléotidases, phosphatases acides et une nucléotide déaminase (11). Les PN mûrs ne contiennent qu'une très faible activité en 5'-nucléotidase et en adénosine déaminase (2,3,11).

La phosphatase alcaline des PN est mieux connue. Elle est capable d'hydrolyser à pH 10 une grande variété de substrats phosphorylés (11). L'activité de cette enzyme semble inductible, notamment en cas d'infection bactérienne (11).

Les PN sont doués de la capacité de synthèse *de novo* des pyrimidines; ils possèdent les enzymes nécessaires pour effectuer cette tâche (aspartate transcarbamoylase, dihydroorotase, orotate réductase...) (11).

Au contraire, la synthèse *de novo* des purines semble impossible dans ces cellules (3,11).

La voie de récupération (*salvage pathway*) pour les ribo et désoxyribonucléotides est fonctionnelle chez le PN (11).

L'enzyme catalysant l'interconversion des ribonucléosides en désoxyribonucléosides n'a pas été détectée dans les PN normaux (11).

1.2.1.2.Le cytosol.

1.2.1.2.1.Contenu commun aux autres cellules.

Comme dans les autres cellules, le cytoplasme des PN contient les enzymes "ménagères" nécessaires à la production et au maintien de l'état énergétique correspondant à un fonctionnement cellulaire correct (3). Ceci inclut les enzymes de la glycolyse et les enzymes de la voie des pentoses phosphates (figure 7), ainsi que les enzymes nécessaires à la synthèse des lipides et des protéines (12). La synthèse des protéines est plus faible pour le PN que pour la plupart des autres cellules (3).

1.2.1.2.2.Contenu spécialisé.

Le PN contient certains composants plus particuliers, nécessaires aux fonctions remplies par cette cellule très spécialisée.

1.2.1.2.2.1.Le glycogène.

Les PN, de par leurs fonctions liées au phénomène inflammatoire, sont souvent amenés à travailler dans des conditions d'hypoxie et de faible concentration en glucose extracellulaire (11). Dans ces circonstances défavorables, c'est le

glycogène qui constitue alors la principale source d'énergie des PN (11). Le contenu en glycogène des PN est comparable à celui des cellules hépatiques et musculaires (12).

1.2.1.2.2.2. Les agents antioxydants.

Les agents antioxydants comprennent des enzymes et des composés de faible poids moléculaire (7,11,13).

Les principales enzymes impliquées sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (qui fonctionne principalement durant les stress oxydatifs de forte intensité), la glutathion réductase et la glutathion peroxydase. Cette dernière est une enzyme contenant du sélénium et qui détruit des concentrations faibles d'eau oxygénée (H_2O_2) et d'hydroperoxydes organiques formés durant la peroxydation des lipides (1,3,11-13). Ces données sont résumées dans la figure 7 (12).

Les antioxydants de faible poids moléculaire sont l'acide ascorbique (vitamine C), la taurine et l'alpha-tocophérol (vitamine E) (13).

1.2.1.2.2.3. Nucléotides pyridiniques.

Le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) réduit constitue la source d'électrons nécessaire à la production d'agents microbicides (anion superoxyde) générés par les PN activés (3). Le tableau IV résume les concentrations intragranulocytaires des nucléotides pyridiniques (12). Le NADPH est régénéré par l'action de 2 enzymes du cycle des pentoses phosphates : la G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase) et la 6PGD (6-phosphogluconate déshydrogénase) (3).

Figure 7 : Voies métaboliques principales, produits bactéricides et mécanismes antioxydants du polynucléaire neutrophile, d'après Babior et coll.(12).

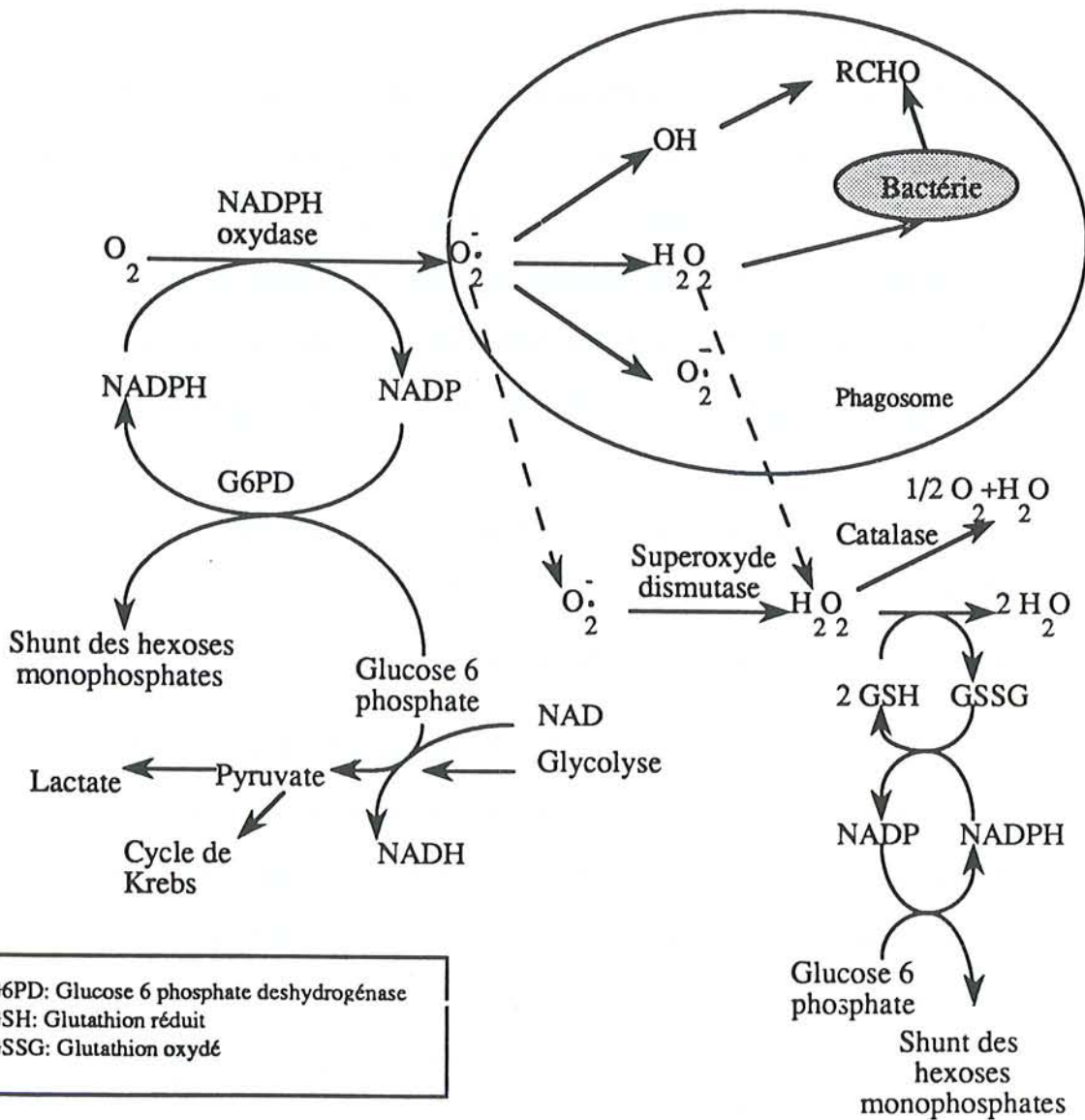


Tableau IV : Concentration des nucléotides pyridiniques dans le cytosol, d'après Babior et coll. (12).

Concentration en nucléotides pyridiniques dans le cytosol des PN

Nucléotide pyridinique	Concentration (mmol/l)	
	Cellules au repos	Cellules activées
NAD	0.56	0.58
NADH	0.079	0.076
NADP	0.041	0.084
NADPH	0.35	0.27

1.2.1.3. Le métabolisme glucidique.

1.2.1.3.1. La glycolyse.

Les PN sont de grands consommateurs d'oxygène et cette utilisation est influencée par une large variété de stimuli physiologiques et pathologiques (13). En plus de la phagocytose, ils incluent les hormones thyroïdiennes, la pression en CO_2 , la concentration en glucose, les pyrogènes, les facteurs du complément, les peptides chimiotactiques et les complexes immuns (13).

Un certain nombre de modifications métaboliques sont observées durant la phagocytose, par rapport à l'état de repos, notamment (2):

- 1) une augmentation d'activité de la glycolyse, avec augmentation de production d'acide lactique et chute du pH dans la vacuole de phagocytose;
- 2) une augmentation de la consommation d'oxygène (deux à trois fois), non inhibée par le cyanure (et donc indépendante des mitochondries);
- 3) une augmentation du taux d'oxydation du NADH d'un facteur cinq, environ;
- 4) une augmentation du taux d'oxydation du NADPH d'un facteur trente, environ.

La principale source d'énergie du PN est la glycolyse, qui transforme le glucose en lactate (3). La glycolyse métabolise environ 80 % du glucose du PN (3).

1.2.1.3.2. Les autres voies métaboliques.

1.2.1.3.2.1. La respiration et le cycle de Krebs.

Le PN mûr contient peu de mitochondries, et la respiration mitochondriale ne consomme que 5 % du glucose intragranulocytaire (10). Cependant, en raison de l'efficacité de ce processus par rapport à la glycolyse, il a été estimé que la respiration fournit environ la moitié de l'ATP du PN tout en ne consommant que 5 % du glucose intragranulocytaire (12).

1.2.1.3.2.2. La voie des pentoses phosphates.

Les PN métabolisent également le glucose par la voie des pentoses phosphates (3). Dans les PN au repos, cette voie ne représente que 2 à 3 % du glucose métabolisé, mais cette proportion augmente nettement lors de l'activation de cette cellule (3).

Il est capital de noter que la voie des pentoses phosphates est le principal fournisseur de NADPH, substrat de la NADPH oxydase (12).

1.2.1.3.2.3. Le métabolisme du glycogène.

Le PN contient de grandes quantités de glycogène (3). Le turnover du glycogène augmente en cas de déplétion en glucose (consommé par la phagocytose) (3).

Le glycogène apparaît à partir du stade myélocyte et augmente avec la maturation cellulaire (8).

1.2.1.4. Le métabolisme des lipides.

Nous décrirons essentiellement ici le métabolisme des leucotriènes et des médiateurs dérivés de l'acide arachidonique (12).

L'acide arachidonique (AA) est le précurseur d'un groupe de médiateurs lipidiques doués de propriétés biologiques importantes (12). L'AA est libéré à partir des phospholipides par l'intervention de la phospholipase A₂, ce phénomène étant initié par divers stimuli (zymosan opsonisé, ionophores calciques, facteurs chimiotactiques...) (12). Les médiateurs lipidiques sont alors oxydés selon deux voies enzymatiques: celle de la cyclo-oxygénase et celle de la lipoxigénase (12). Pour le PN, la voie de la lipoxigénase est prédominante (12).

La cyclo-oxygénase catalyse la conversion de l'AA en endoperoxydes cycliques PGG₂ et PGH₂, isomérisés à leur tour en prostaglandines PGE₂, PGD₂ et PGF₂ (12). La PGE₂ est un métabolite important du processus

inflammatoire, en particulier pour la dilatation et l'augmentation de perméabilité des petits vaisseaux, engendrant érythème et oedème (12). La PGH_2 peut aussi être transformée en thromboxane A_2 , puissant agent agrégant et vasoconstricteur (12).

L'enzyme la plus importante dans la voie des lipoxygénases est la 5-lipoxygénase, qui catalyse l'oxydation de l'acide arachidonique en acide 5-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatétraénoïque (5-HPETE) (12). Celui-ci est converti ensuite en leucotriène A_4 (LTA_4) (12). Ce dernier est le précurseur d'une série de leucotriènes impliqués dans la réaction inflammatoire (12). Le LTA_4 peut se combiner au glutathion pour former le leucotriène C_4 (LTC_4), puis les leucotriènes LTD_4 et LTE_4 (12). L'ensemble LTC_4 , LTD_4 et LTE_4 constitue la *slow reacting substance* (SRS) (12).

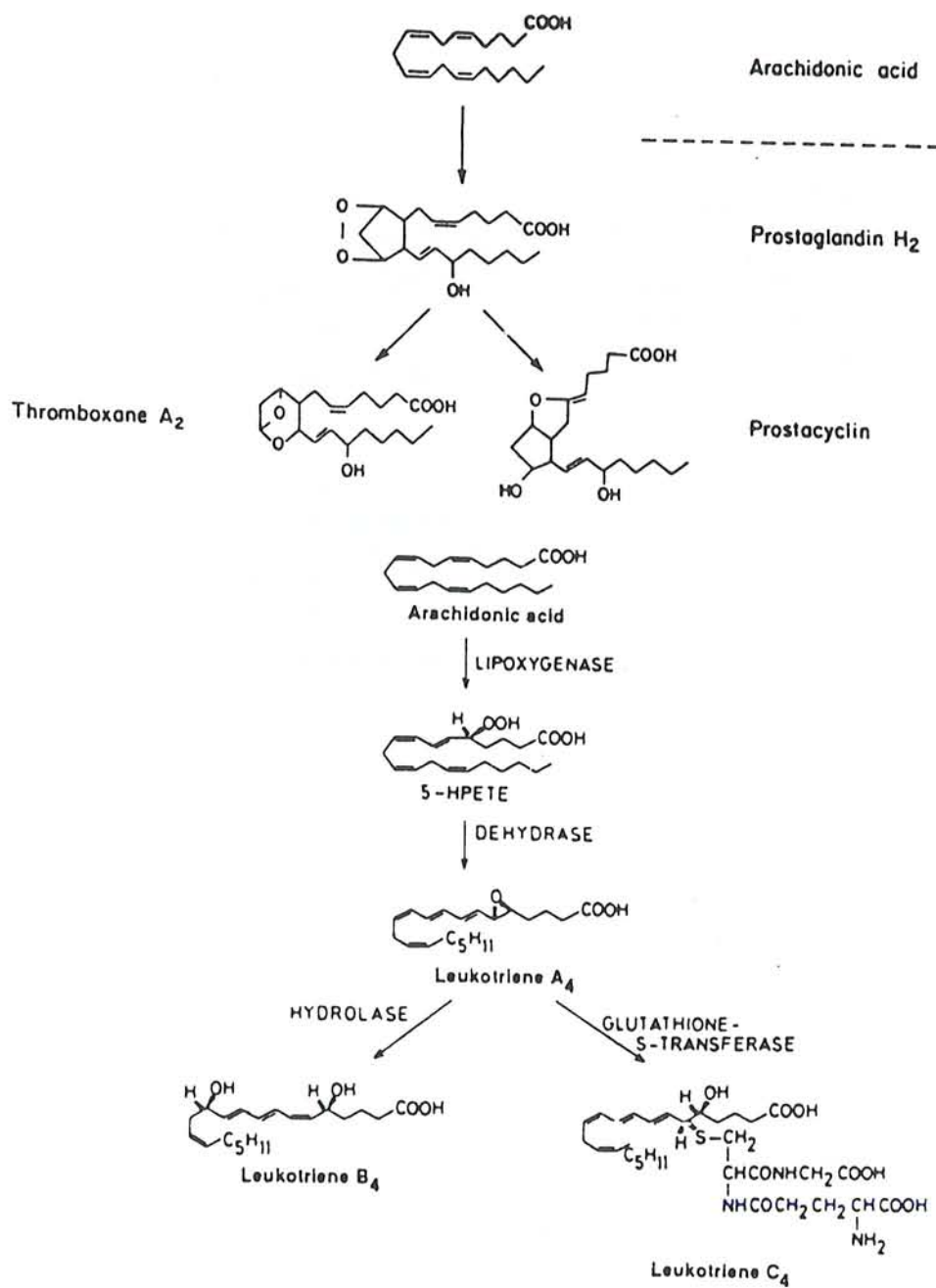
Le LTA_4 peut être métabolisé par une autre voie en LTB_4 , un puissant agent chimiotactique vis-à-vis des PN (12). La production de LTB_4 est stimulée par le GM-CSF (12). Le LTB_4 est inactivé par oxydation en 20-hydroxy- LTB_4 , puis en 20-aldéhyde LTB_4 et finalement en 20-acide carboxylique LTB_4 (12).

Le groupement hydroperoxyde du 5-HPETE est parfois réduit pour donner un produit de réaction mineur: l'acide 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatétraénoïque (12-HETE); et un produit majeur: l'acide 5-hydroxytétraénoïque (5-HETE) (12). Ces 2 molécules sont douées d'effet chimiotactique et de stimulation de la dégranulation (12). Ces données sont résumées dans les figures 8 et 9 (12).

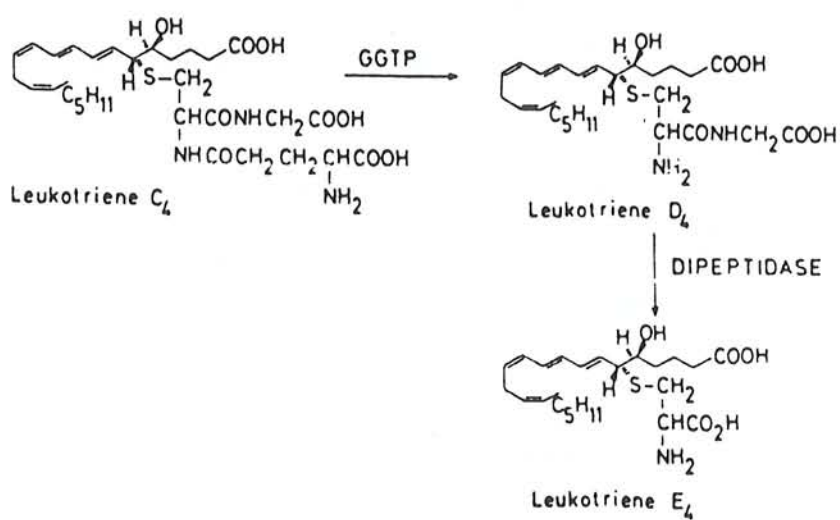
1.2.1.5. Les granules du PN.

Les PN constituent un réservoir d'enzymes douées de diverses propriétés, qui peuvent être libérées dans le phagosome (3). Sur la base de la morphologie, des propriétés biochimiques, de la densité et de l'apparition durant la

Figure 8 : Métabolisme de l'acide arachidonique, d'après Babior et coll. (12).



*Figure 9 : Métabolisme des leucotriènes,
d'après Babior et coll. (12).*



granulopoïèse, trois types de granules ont été décrits: les granules primaires ou azurophiles, les granules secondaires ou spécifiques, et les granules tertiaires(8). Il est très possible que d'autres types de granules soient découverts à l'avenir.

1.2.1.5.1.Les granules primaires.

Ils sont les premiers synthétisés au cours de la granulopoïèse (myéloblaste à grains) (10). Ils représentent environ un tiers des granules du PN mûr (10). Leur action est essentiellement intracellulaire (10). Ils contiennent la myéloperoxydase, les protéases neutres (élastase, cathepsine G, cathepsine D), les hydrolases acides (bêta-glucuronidase, phosphatase acide, alpha-mannosidase, N-acétylglucosaminidase) et les protéines cationiques (14). Deux populations de granules primaires ont été distinguées en fonction de leur contenu lysosomal (12,14).

Le contenu des granules primaires possède une activité microbicide (défensines, protéines augmentant la perméabilité de la paroi des gram négatifs, myéloperoxydase...) et peut jouer un rôle dans la destruction tissulaire observée au cours de la réaction inflammatoire (protéases : élastase, cathepsines G et D) (14). Ces protéases peuvent exacerber la réaction inflammatoire en générant des facteurs chimiotactiques (C5a) (15).

1.2.1.5.2.Les granules secondaires ou spécifiques.

Ils sont synthétisés plus tardivement au cours de la granulopoïèse (stade du myélocyte) (10). Ils sont moins denses et plus colorables que les granules primaires (14). Ils contiennent principalement du lysozyme, de la phosphatase alcaline, de la collagénase, de la *vitamin B12-binding protein*, de la lactoferrine et de l'activateur du plasminogène (14).

Comme le contenu des granules primaires, celui des granules secondaires peut contribuer à la réaction inflammatoire (15). La collagénase, en présence des

protéases neutres, hydrolyse les fibrilles de collagène; cette enzyme peut aussi être activée par le métabolisme oxydatif (15). De plus, les granules secondaires contiennent des activateurs de la cascade du complément (15). Ces granules pourraient également moduler le chimiotactisme des PN puisque leur membrane contient des récepteurs pour le FMLP (formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine, chémoattractant) et le C5a (15). Cette membrane contient également du cytochrome B et du FAD (flavine adénine dinucléotide), suggérant un rôle (au moins potentiel) dans le métabolisme oxydatif des PN (12,14).

1.2.1.5.3. Les granules tertiaires.

Leur découverte est beaucoup plus récente que celle des 2 types de granules précédemment décrits (14). Leur densité est légèrement inférieure à celle des granules secondaires (14). Ces granules tertiaires contiennent de la gélatinase et une enzyme très proche de la collagénase (12,14).

La membrane de ces granules semble intervenir de façon importante au niveau des processus d'adhésion des PN, notamment au niveau du récepteur au C3bi, essentiel à l'adhésion (15).

1.2.1.5.4. Autres structures.

Il est vraisemblable que grâce à des techniques d'investigations de plus en plus fines, d'autres structures granulaires seront mises en évidence au niveau des PN. Par exemple, les phosphasomes ou *replenishsomes*, contenant essentiellement de la phosphatase alcaline et du cytochrome b, ont été récemment découverts (14). Leur fonction reste mal connue (14). Ils pourraient jouer un rôle au niveau de la réaction inflammatoire (14).

1.2.1.5.5. Récapitulatif.

Le tableau V résume le contenu des différents types de granules du PN (14).

Tableau V : Constituants des granules des polynucléaires (classification par ordre alphabétique), d'après Sandborg et coll. (14).

Granule primaire ou azurophile	Granule secondaire ou spécifique	Granule tertiaire	Replenisosome
- α fucosidase - α mannosidase - Aryl sulfatase - β galactosidase - β glucuronidase - β glycéro phosphatase - BPI (Bactericidal/Permeability Increasing Protein) - Cathepsine B - Cathepsine D - Cathepsine G - Collagénase - "C5 inactivating factor" - Défensines - Elastase - Fucosidase - "Kinin generating enzyme" - Lysozyme - Myéloperoxydase - N acétyl β glucuronidase - 5' nucléotidase - Protéines cationiques antibactériennes	- Activateur du Complément - Activateur du plasminogène - β_2 microglobuline - Collagénase - Cytochrome b - FAD - Histaminase - Inhibiteur de la protéine kinase C - Lactoferrine - Lysozyme - "Monocyte chemoattractant" - Récepteur au C3bi - Récepteur au FMLP - "Vitamin B12 binding protein"	- Gélatinase	- Cytochrome b - FAD - flavoprotéine - Phosphatase alcaline - Récepteur au C3bi

Tableau VI : Influence de certains constituants des granules des polynucléaires sur les fonction de ceux-ci, d'après Morin (19).

Fonction des polynucléaires	Constituant granulaire intervenant
Adhésivité (Agrégation)	- Lactoferrine - Récepteur au C3bi (=CD11b/CD18)
Chimiotactisme	- Activateur du Complément générant des agents attractants - Récepteur au FMLP
Phagocytose	- Récepteur au C3bi - Activateur du Complément générant des opsonines
Bactéricidie	- Myéloperoxydase - Lysozyme - Lactoferrine - Protéines cationiques antibactériennes - Défensines - BPI (Bactericidal/ Permeability Increasing Protein)
Altérations tissulaires Cytotoxicité	- Cathepsine G - Elastase - Collagénase - Myéloperoxydase

Le tableau VI résume l'influence de certains constituants des granules des PN sur les principales fonctions de ce dernier (14).

1.2.1.6. La membrane du PN.

1.2.1.6.1. Introduction.

La mise en action des fonctions du PN est souvent initié par la fixation d'un ligand sur un récepteur membranaire spécifique, suivi d'une cascade de réactions intracellulaire. La connaissance des composants membranaires constitue donc une étape importante dans l'étude fonctionnelle des PN.

La membrane plasmique des PN est constituée d'une double couche phospholipidique, contenant des glycoprotéines membranaires dont certaines entrent dans la composition de récepteurs membranaires (12,13). L'abondance du cholestérol au niveau de la membrane du PN confère une déformabilité particulière à celle-ci (12). La membrane plasmique contient aussi des glycoprotéines intrinsèques et extrinsèques (12).

Le cytosquelette, l'organe du mouvement, est constitué des microfilaments et des microtubules (12,13).

1.2.1.6.2. Les glycoprotéines intrinsèques.

Parmi celles-ci, on distingue (9,12,13):

- 1) des Ag spécifiques des neutrophiles: NA 1, NA 2, NB 1, NB 2, NC 1, ND 1, NE 1, G-A, G-B, G-C...;
- 2) des Ag présents sur d'autres cellules: A, B, H, HLA de classe I, I, Ii, Jk^a, Jk^b,...;
- 3) des Ag membranaires non spécifiques des PN et de structure mal élucidée, reconnus par des Ac monoclonaux: CD 11, CDW 12, CD 13...;
- 4) des récepteurs pour des ligands, ce qui sera développé par la suite.

1.2.1.6.3. Les glycoprotéines extrinsèques.

Ce sont des molécules provenant du milieu environnant et qui se fixent sur des récepteurs membranaires du PN, comme les immunoglobulines, la fibrine ou le fibrinogène.

1.2.1.6.4. Les récepteurs de membrane.

Les neutrophiles possèdent de nombreux récepteurs situés au niveau de leur membrane (14,16). Nous détaillerons brièvement les plus importants d'entre-eux.

1.2.1.6.4.1. Les récepteurs pour les opsonines.

Le PN possède des récepteurs spécifiques pour le fragment Fc des IgG1 et IgG3, ainsi que pour les composants du complément C3b et C3bi (3,12,14). Ces récepteurs sont capitaux au niveau du phénomène de phagocytose (chapitre 1.2.2.1.).

1.2.1.6.4.2. Les récepteurs pour les facteurs chimiotactiques.

Des récepteurs spécifiques pour les peptides N-formylés (formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine, par exemple), l'anaphylatoxine C5a et le leucotriène B₄ ont été décrits (14). Ces récepteurs sont capitaux pour le déplacement dirigé du PN dans un gradient de concentration d'attractant (chimiotactisme) (14).

1.2.1.6.4.3. Autres types de récepteurs.

De nombreux récepteurs pour des ligands modulant les fonctions du PN ont été décrits: *platelet-activating factor* ou PAF, agonistes bêta-adrénergiques, adénosine, IL1 et TNF (9,12,14). Des récepteurs à l'insuline ont également été mis en évidence (12). L'ensemble de ces données est résumé par la figure 10 (9).

1.2.1.6.5. Les protéines d'adhésion.

Les complexes membranaires protéiques CD 11/CD 18 sont situés à la surface du PN et jouent un rôle crucial au niveau du phénomène d'adhésion des PN (13). L'adhésion elle-même (à l'endothélium vasculaire) représente une étape-clé pour le phénomène de chimiotactisme des PN (12).

Il existe 3 types de ces complexes protéiques, appelés LFA-1, Mac 1 et p 150,95 (12). Chacun d'entre eux est un hétérodimère constitué d'une sous-unité alpha spécifique, respectivement CD 11a, CD 11b et CD 11c; ainsi que d'une sous-unité bêta commune, CD 18 (12). Ces données sont résumées par le tableau VII (12).

Le complexe Mac 1 et peut-être le complexe p150,95 sont également retrouvés sur les membranes des granules spécifiques et tertiaires (et secondairement transférés sur la membrane plasmique lors du processus de dégranulation) (13). Les patients déficients pour ces complexes d'adhésion présentent des infections à répétition (13).

1.2.1.6.6. Les enzymes membranaires.

La membrane du PN contient des pompes ioniques et des canaux ioniques qui régulent la composition ionique intragranulocytaire (12). Nous passerons brièvement en revue les principaux d'entre eux (12).

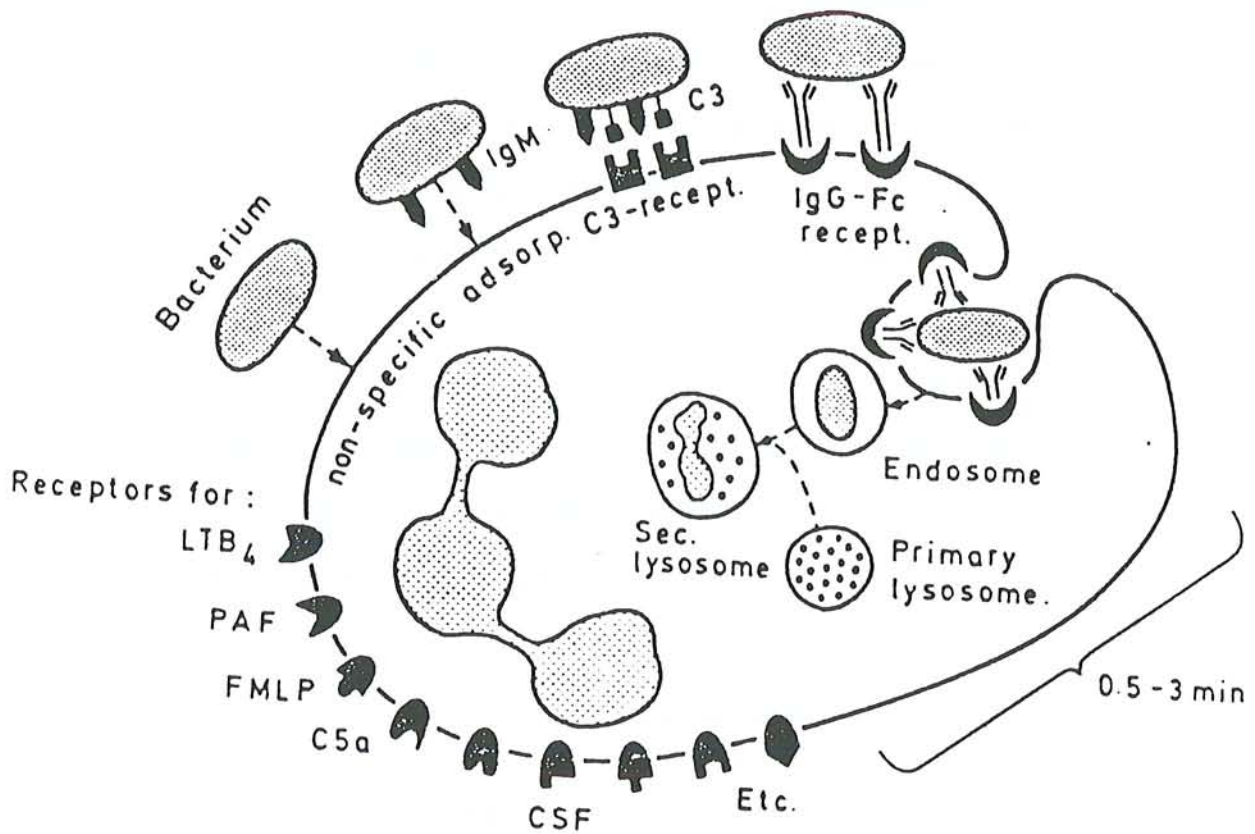
Le système de transport Na^+/H^+ sensible à l'amiloride régule le pH du cytoplasme et du phagosome (12).

La pompe Na^+/K^+ ATPase sensible à l'ouabaine régule la différence de potentiel membranaire (12).

Les système de régulation du Ca^{2+} comprennent:

- 1) la pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase sensible au vanadate, qui expulse le Ca^{2+} hors de la cellule et maintient la concentration intragranulocytaire de cet ion proche de $0.1 \mu\text{mol/L}$;

Figure 10 : Les récepteurs du polynucléaire, d'après Benestad et coll. (9).



LTB₄ : leucotriène B₄, PAF : platelet activating factor, FMLP : formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine, CSF : colony-stimulating factor.

Tableau VII : Les protéines d'adhésion du polynucléaire, d'après Babior et coll. (12).

	Mac-1		LFA-1		p 150,95	
Sous-unité	Alpha M	Béta	Alpha L	Béta	Alpha X	Béta
Poids moléculaire	170 kDa	95 kDa	180 kDa	95 kDa	150 kDa	95 kDa
Dénomination WHO	CD 11 b	CD 18	CD 11 a	CD 18	CD 11 c	CD 18
Distribution cellulaire	Granulocytes, monocytes, macrophages, lymphocytes		Lymphocytes		Granulocytes, monocytes, macrophages	
Implication dans le chimiotactisme	Oui		Non		Oui	
Fonctions	Rôle dans la phagocytose, la bactéricidie, le chimiotactisme, l'adhésion, l'agrégation, le chimiotactisme et la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps		Rôle dans l'activité des lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques, ainsi que pour les natural killers		Rôle dans l'adhésion et l'agrégation des PN	

- 2) une pompe transporteuse du Ca^{2+} depuis le cytoplasme vers un pool de stockage (réticulum endoplasmique?);
- 3) un système de transport de direction inverse répondant à l'inositol 1,4,5 triphosphate;
- 4) des canaux calciques permettant des influx de Ca^{2+} dans différentes circonstances (12).

1.2.1.6.7.Le cytosquelette

Le cytosquelette des PN constitue une structure protéique en rapport étroit avec la membrane plasmique, et qui est impliquée dans la formation de pseudopodes ainsi que dans le mouvement cellulaire (17). Il comprend les microfilaments et les microtubules.

1.2.1.6.7.1.Les microfilaments.

1.2.1.6.7.1.1.L'actine.

Le cytoplasme du PN peut être considéré comme un réseau filamenteux tridimensionnel, composé en majeure partie d'une protéine contractile : l'actine (12,17).

Elle constitue 10 % des protéines du PN et existe sous deux formes : une forme monomérique globulaire (G-actine) et une forme polymérique en double hélice (F-actine) (17,18). L'équilibre entre ces deux formes dépend de façon cruciale de l'activation du PN. La stimulation de ce dernier par un peptide chimiotactique provoque une décroissance rapide du taux de G-actine, accompagnée d'une augmentation de celui de F-actine (17).

Le vitesse de polymérisation de l'actine est très rapide et ce phénomène est initié dans les secondes qui suivent la stimulation (16). Ceci suggère que ces événements jouent un rôle dans le processus de couplage stimulus-réponse (16).

Ces réarrangements se déroulent également, mais à une moindre vitesse qu'avec les peptides chimiotactiques, en présence d'esters de phorbols et de l'ionophore A23187 (18).

1.2.1.6.7.1.2. La myosine.

Les PN contiennent également une autre protéine contractile: la myosine (environ 10 % des protéines cytoplasmiques du PN) (12). Elle est concentrée, avec l'actine, dans les pseudopodes des PN en migration (12).

Comme la myosine des muscles striés, la myosine des PN est un hexamère composé de 2 chaînes lourdes et de 4 chaînes légères, toutes de nature polypeptidique (14). Les chaînes lourdes possèdent des extrémités globulaires capables de se lier à l'actine et qui sont douées d'une activité de type ATPase (17). La myosine contracte le gel d'actine en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie (15). La capacité de la myosine à moduler la contraction du cytosquelette peut être régulée par la phosphorylation des chaînes légères de la myosine du PN (15). L'interaction entre l'actine et la myosine pourrait expliquer la genèse du mouvement du PN et expliquer la dépendance énergétique de ce processus, ainsi que de la phagocytose (12).

1.2.1.6.7.1.3. L'*actin-binding protein*

Le PN contient également plusieurs protéines capables de se lier à l'actine comme l'*actin-binding protein*, qui peuvent réguler le degré de polymérisation de l'actine et mettre en rapport plusieurs filaments d'actine pour former le gel (12). Ces protéines régulatrices peuvent à leur tour être régulées par des signaux générés durant l'activation cellulaire (12).

1.2.1.6.7.1.4. La gelsoline.

L'actine, au niveau des pseudopodes, existe sous la forme d'un gel. Cet état est lié à la présence de protéines se liant à l'actine, de haut poids moléculaire et qui forment un réseau avec l'actine (12,17,18). Le calcium, à des concentrations supérieures à $2 \cdot 10^{-7}$ mol/ L, dissout le gel d'actine en activant une protéine appelée gelsoline, qui raccourcit l'actine au niveau du réseau du gel (12,17,18).

Lorsque la concentration calcique est inférieure à ce seuil, la gelsoline devient inactive et la formation du réseau (et donc du gel) devient possible (12,17,18).

1.2.1.6.7.1.5. La profiline.

La polymérisation de l'actine peut aussi être régulée par une protéine appelée profiline (12). Celle-ci se lie aux monomères d'actine et inhibe la polymérisation de la G-actine (12).

1.2.1.6.7.1.6. Autres protéines régulatrices.

L'alpha-actinine, l'acumentinine et la protéine de 42 kDa sont également impliquées dans les phénomènes régulateurs (tableau VIII) (12).

1.2.1.6.7.1.7. Phénomènes régulateurs.

Les peptides chimiotactiques (FMLP) et le leucotriène LTB₄ provoquent une augmentation de la F-actine et de la quantité d'actine liée au cytosquelette, par l'intermédiaire d'une protéine se liant aux nucléotides cycliques (12,18).

Le calcium ne semble pas indispensable à la polymérisation de l'actine (17,18).

Les réarrangements du cytosquelette ne dépendent pas du calcium extracellulaire (17,18).

Le phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) peut moduler l'interaction des protéines se liant à l'actine. Celui-ci peut dissocier les complexes profiline-actine et peut également inhiber fortement la gelsoline (14). Cet effet inhibiteur vis-à-vis de la gelsoline est indépendant du taux de calcium intracellulaire, mais peut être éliminé par un traitement à la phospholipase A₂ ou C (14).

1.2.1.6.7.2. Les microtubules.

Les microtubules représentent une structure importante du cytosquelette, au même titre que les microfilaments (12).

1.2.1.6.7.2.1. Structure des microtubules.

Il s'agit de fibres creuses, de 24 nm de diamètre (12). Cette fibre est un

Tableau VIII : Les protéines du cytosquelette du polynucléaire, d'après Babior et coll. (12).

Protéine	Fonction
Actine	Polymérisation en filaments
<i>Actin-binding protein</i>	Pontage des filaments d'actine
Alpha-actinine	Liaison des filaments d'actine en fagots
Profiline	Régulation de la longueur des filaments d'actine
Acumentine	Idem
Gelsoline	Idem
Protéine de 42 kDa	Idem
Tropomyosine	Stabilisation des filaments d'actine
Myosine	Contraction du gel d'actine

polymère cylindrique de tubuline (12). Celle-ci est une protéine de 55 kDa, existant sous une forme d'hétérodimères constitués d'unités alpha et bêta (12). La tubuline existe aussi sous la forme de dimères solubles cytoplasmiques, en équilibre avec la forme "assemblée" (18). L'équilibre peut être rapidement déplacé sous l'influence de facteurs régulateurs (17).

Les microtubules peuvent servir de support de type "squelette" pour la cellule, et probablement pour les microfilaments ainsi que pour les autres systèmes contractiles (12).

1.2.1.6.7.2.2. Régulation de l'assemblage des microtubules.

Les agents augmentant le taux de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) accroissent la proportion de la forme "assemblée" (12). Les agents augmentant le taux d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), ainsi que le calcium, activent la dépolymérisation des microtubules (12).

Le glutathion oxydé, dont le taux augmente suite à l'activation du métabolisme oxydatif des PN stimulés, peut accélérer la dépolymérisation des microtubules (12,13,17,18). Les processus oxydatifs agissent au niveau des radicaux tyrosine de la tubuline, ce qui favorise directement la dépolymérisation des microtubules (12).

1.2.1.6.7.2.3. Rôle des microtubules.

Les microtubules pourraient jouer un rôle au niveau du processus de couplage stimulus-réponse (12). En effet, le nombre des microtubules assemblés augmente après exposition à des stimulateurs de la dégranulation (12,13). Toutefois, le nombre de microtubules ne semble pas varier lors de l'activation du chimiotactisme des PN (12).

La colchicine, qui induit une dépolymérisation des microtubules, inhibe aussi la phagocytose, le chimiotactisme, l'adhésion et la dégranulation des PN (12,13). Ceci pourrait signifier que les microtubules soient impliqués dans tous ces processus (13).

1.2.1.7. Le processus de couplage stimulus-réponse.

En réponse à un stimulus, les PN peuvent réagir par différentes réponses biologiques: chimiotactisme, phagocytose, explosion oxydative, dégranulation et agrégation (16). Au niveau du PN, le processus de couplage entre stimulus et réponse se déroule selon la séquence reprise dans la figure 11 (16).

Il faut noter que tous les stimuli ne déclenchent pas forcément toutes ces étapes d'activation (16). En fait, de très nombreux facteurs interviennent dans ces processus de couplages; nous décrivons les principaux dans ce chapitre.

1.2.1.7.1. Les récepteurs.

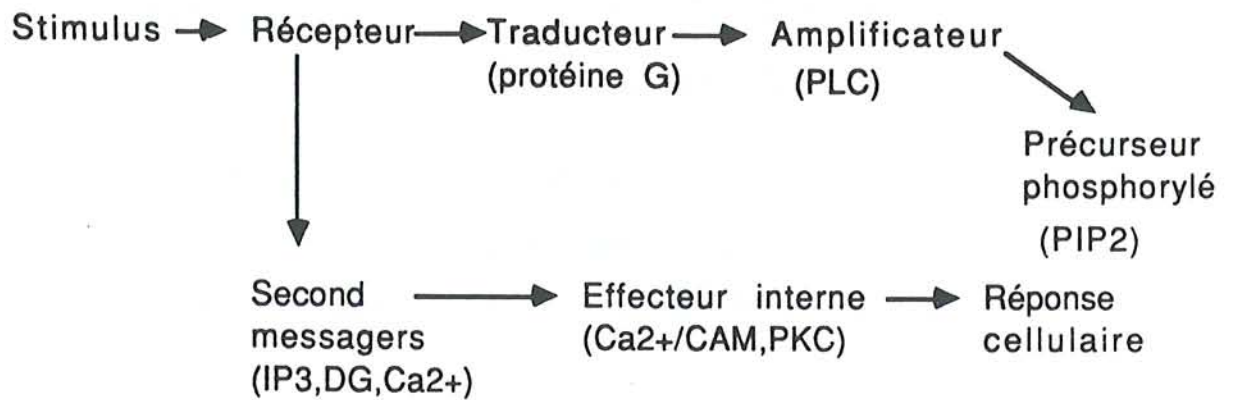
Le récepteur le plus étudié est celui des peptides formylés chimiotactiques (FMLP) (16). Le récepteur existe sous 2 formes: haute et faible affinité (16). La forme de haute affinité serait celle où le récepteur est associé à la protéine G, celle de faible affinité lorsque le récepteur n'est pas associé à cette protéine (12,16). Lorsque le peptide formylé s'associe au récepteur, il se forme un complexe de haute affinité ligand-récepteur qui s'associe avec le cytosquelette (16). Cette association est nécessaire à l'endocytose du récepteur (16).

1.2.1.7.2. La protéine de couplage.

La transduction du signal fait intervenir des protéines fixant les nucléotides de la guanine (13). La protéine G joue aussi un rôle dans le système de mobilisation du calcium (12). On appelle protéine Gc la protéine de régulation relative aux nucléotides de la guanine, qui couple le récepteur avec la phospholipase C (16).

La structure de la protéine Gc n'est pas connue avec précision (12). Elle semble différente des autres protéines G (12). La Gc est formée de 3 sous-unités: alpha, bêta et gamma (12).

Figure 11 : Le processus de couplage stimulus-réponse, d'après Sha'afti et coll. (16).



PLC : phospholipase C, PIP₂ : phosphoinositoside biphosphate, IP₃ : inositol triphosphate, DG : diacylglycérol, CAM : calmoduline, PKC : protéine kinase C.

La sous-unité alpha semble commune à toutes les protéines G (12).

La séquence d'évènements impliqués dans le couplage par la protéine Gc est résumée par la figure 12 (16).

L'activation de la Gc diminue la concentration en calcium; ceci est nécessaire à l'activation de la phospholipase C (16).

1.2.1.7.3. Hydrolyse du phosphoinositide et activation des PN.

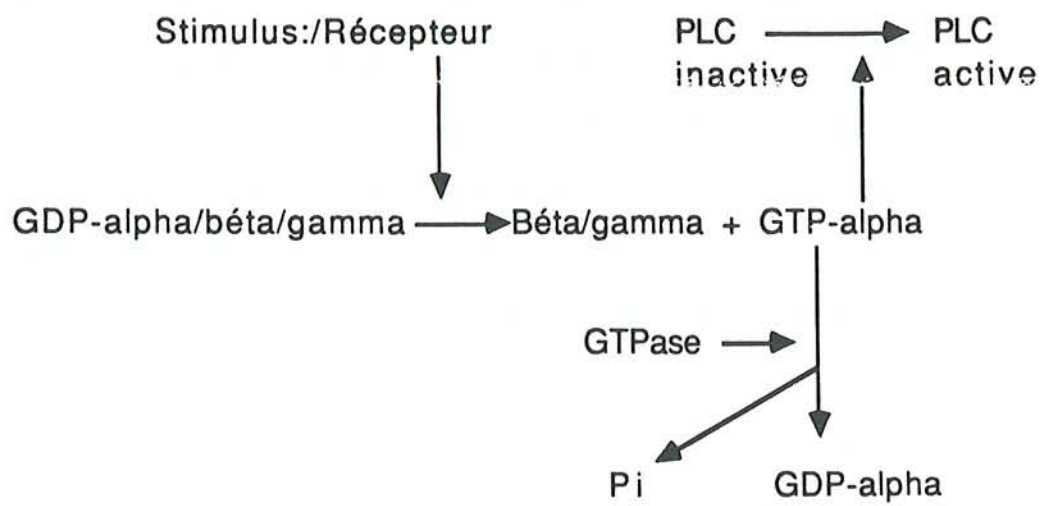
Cette séquence d'activation est résumée par la figure 13 (16). Il faut noter que le FMLP diminue les concentrations de PIP (phosphoinositoside phosphate) et de PIP₂ (phosphoinositoside biphosphate) (16).

L'occupation des récepteurs active la phospholipase C spécifique pour PIP₂, grâce à une ou plusieurs protéines G, selon le mécanisme décrit dans la figure 14 (16). L'hydrolyse de PIP₂ s'accompagne d'une mobilisation de l'ion calcium (16).

1.2.1.7.4. La protéine kinase C (PKC) des PN.

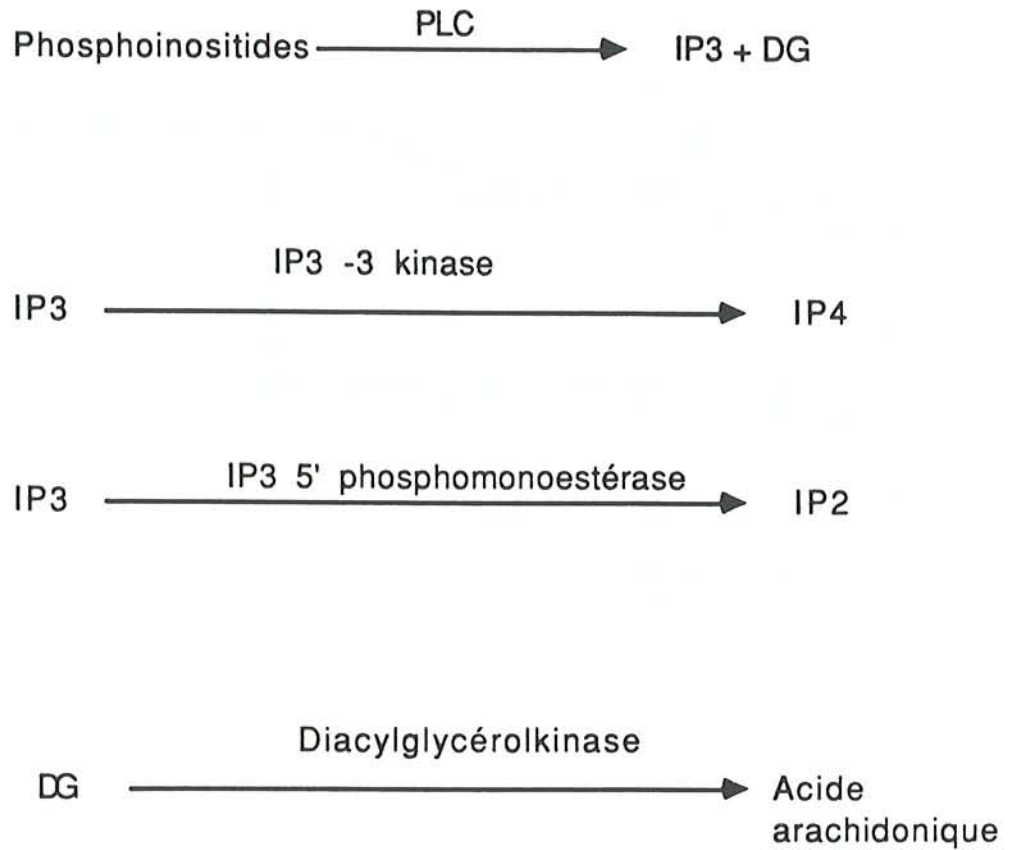
Lors d'une activation des PN, la PKC cytosolique est transloquée à la membrane plasmique en même temps qu'une *calcium activated neutral proteinase* (CANP) (16). Au niveau de la membrane du PN, la CANP provoque une activation de PKC par protéolyse (16). La PKC activée revient dans le cytosol où la phosphorylation de nombreux types de substrats peut alors avoir lieu (16). Selon le type de stimulus activateur, des variations peuvent être observées au niveau de la phosphorylation, selon l'intensité du stimulus et/ou la durée d'activation de la PKC (16). Ces données sont résumées par la figure 15 (16).

Figure 12 : Séquence d'événements dans le couplage par la protéine Gc, d'après Sha'afti et coll. (16).



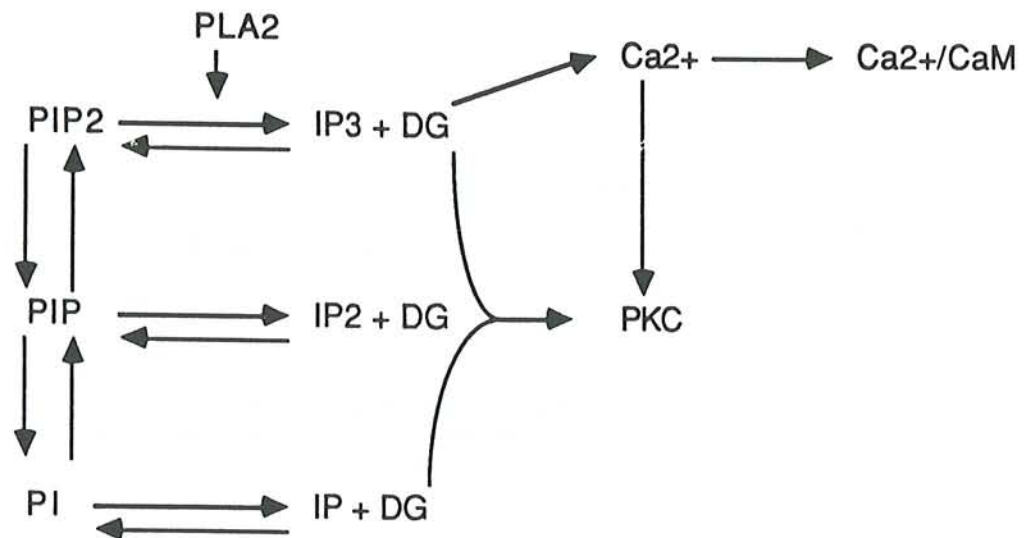
GDP : guanosine diphosphate, GTP : guanosine triphosphate, PLC : phospholipase C.

Figure 13 : Hydrolyse du phosphoinositide et activation du polynucléaire, d'après Sha'afti et coll. (16).



IP₃ : inositol triphosphate, IP₂ : inositol biphosphate, IP₄ : inositol tétraphosphate, PLC : phospholipase C, DG : diacylglycérol.

Figure 14 : Séquence d'événements dans l'hydrolyse du phosphoinositoside, d'après Sha'afti et coll. (16).



PIP₂ : phosphoinositoside biphosphate, PIP : phosphoinositoside phosphate, PI : phosphoinositoside, IP₃ : inositol triphosphate, IP₂ : inositol biphosphate, IP : inositol monophosphate, DG : diacylglycérol, PKC : protéine kinase C, CAM : calmoduline.

La PKC semble jouer un rôle important dans la plupart des réponses du PN à des stimuli (16). Ce rôle reste obscur pour la mobilité du PN (16). La figure 16 propose un modèle pour la régulation de la dégranulation par la PKC (16).

Le taux de Ca^{2+} intragranulocytaire varie dans les PN selon l'activité d'une pompe à efflux localisée dans la membrane plasmique (probablement associée à une ATPase) (16). L'activation de la PKC modifierait l'activation de cette pompe à calcium (16).

La membrane plasmique du PN possède un système d'échange entre le Na^+ extracellulaire et le H^+ intracellulaire (16). La PKC activée pourrait activer ce transport, et donc par ce mécanisme contribuer à l'acidification des cellules produites en réponse à différents stimuli (16). Ceci pourrait jouer un rôle important dans les réponses fonctionnelles des PN (16).

La stimulation de la PKC stimule la phosphorylation du PI et sa conversion en PIP, d'où une augmentation de la concentration en substrat pour la PIP_2 phospholipase C (16).

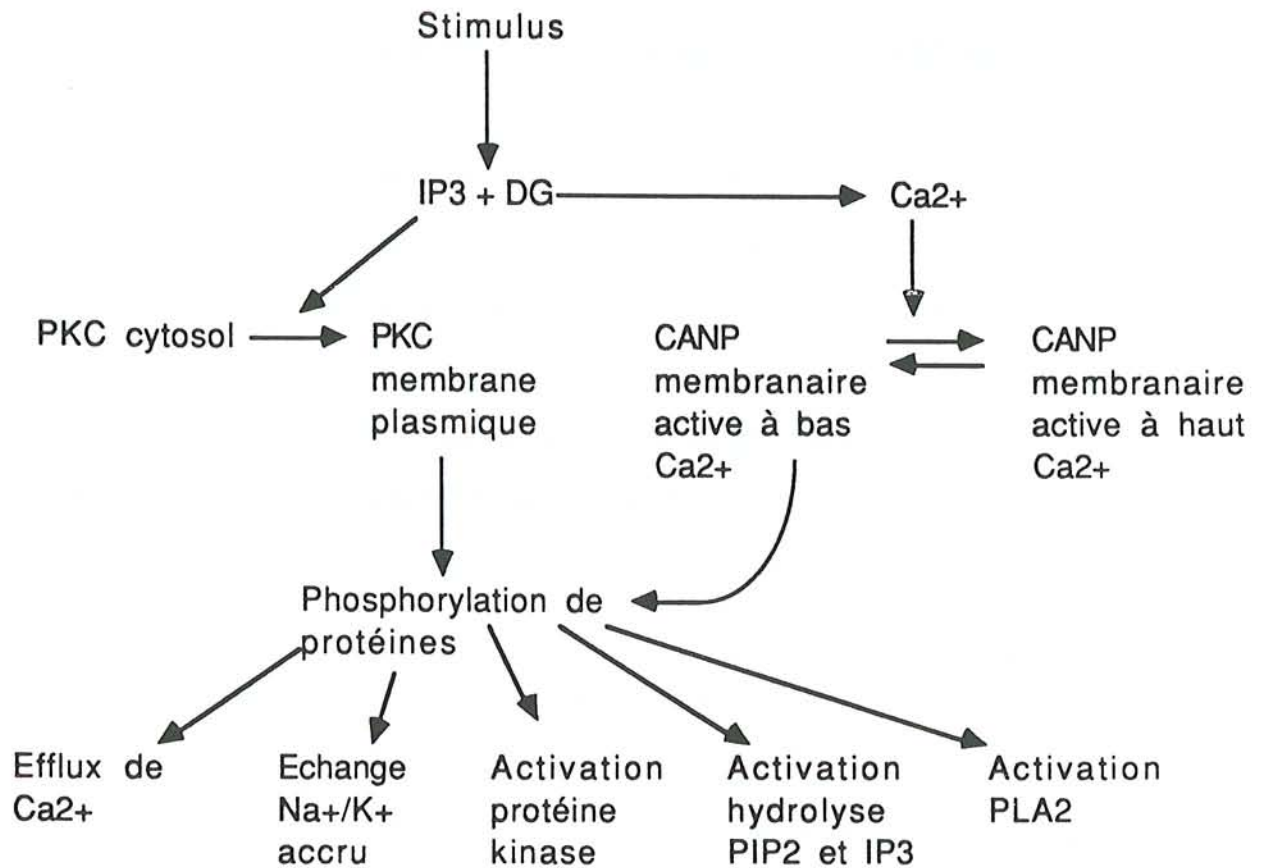
L' IP_3 (inositol triphosphate) est un second messager qui libère le Ca^{2+} des réserves cytosoliques (16). Le taux d' IP_3 est régulé par 2 mécanismes: 1) phosphorylation de IP_3 en 1,3,4,5 IP_4 ; 2) IP_3 est déphosphorylé pour former IP_2 qui donne ensuite IP (16).

Une des fonctions de la PKC stimulée serait de protéger le PN de nouvelles stimulations en inhibant la phospholipase C spécifique de PIP_2 (16).

1.2.1.7.5. Polymérisation de l'actine et réarrangement du cytosquelette.

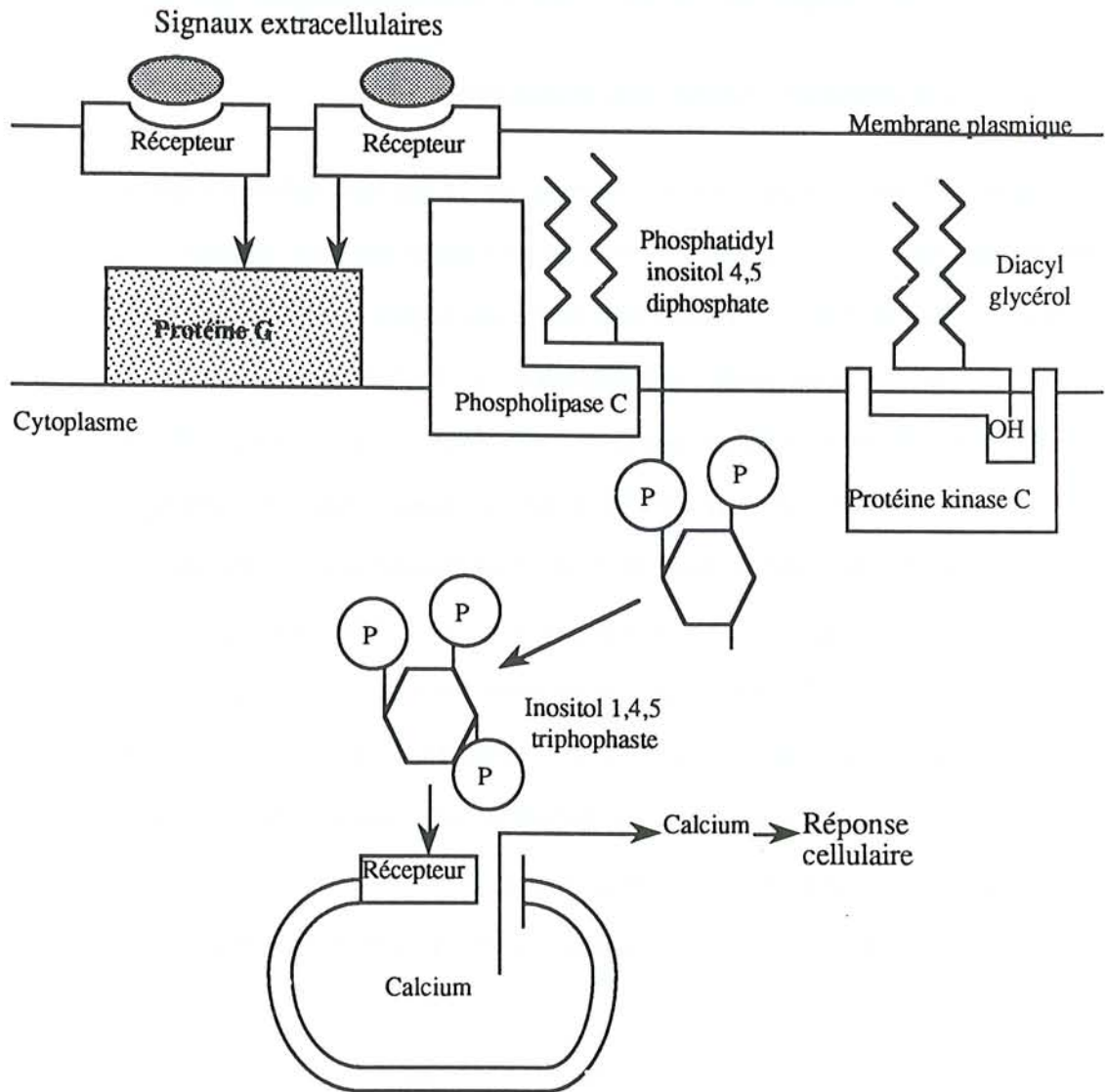
Certains stimuli induisent des mouvements des PN, en activant le système actine/myosine du cytosquelette (16).

Figure 15 : Séquence d'événements associés à l'activation de la PKC, d'après Sha'afti et coll. (16).



IP₃ : inositol triphosphate, DG : diacylglycérol, PKC : protéine kinase C, CANP : calcium activated neutral protein, PIP₂ : phosphoinositoside biphosphate, PLA₂ : phospholipase A₂.

Figure 16 : Représentation hypothétique des réactions qui suivent la fixation d'un ligand à son récepteur, d'après Benestad et coll. (9).



Le mécanisme de l'activation de la polymérisation de l'actine, par le FMLP en particulier, reste mal connu (variations du taux de Ca^{2+} ?, remodelage des phospholipides membranaires?) (16). La polymérisation de l'actine ferait intervenir des voies dépendantes et indépendantes de la protéine G (16).

1.2.1.7.6. Le métabolisme de l'acide arachidonique des PN.

1.2.1.7.6.1. Libération d'acide arachidonique.

En réponse à un stimulus, les PN libèrent de l'acide arachidonique qui est ensuite métabolisé en eicosanoïdes, tels les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes (16). Le mécanisme précis par lequel l'acide arachidonique est libéré des phospholipides membranaires est imparfaitement connu; les principales voies métaboliques impliquées sont résumées par la figure 17 (16):

- 1) l'acide arachidonique peut être clivé par la phospholipase A_2 (PLA_2) à partir de la phosphatidylcholine (PC), du phosphatidylinositol (PI) et de la phosphatidyléthanolamine (PE), principalement (16). Il s'agirait de la voie majeure (16). Le Ca^{2+} est nécessaire pour l'activation de la PLA_2 . L'activation de celle-ci serait modulée par la PKC et d'autres facteurs (16). Dans tous les cas, son activation nécessite une augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique et une protéine G fonctionnelle (16).

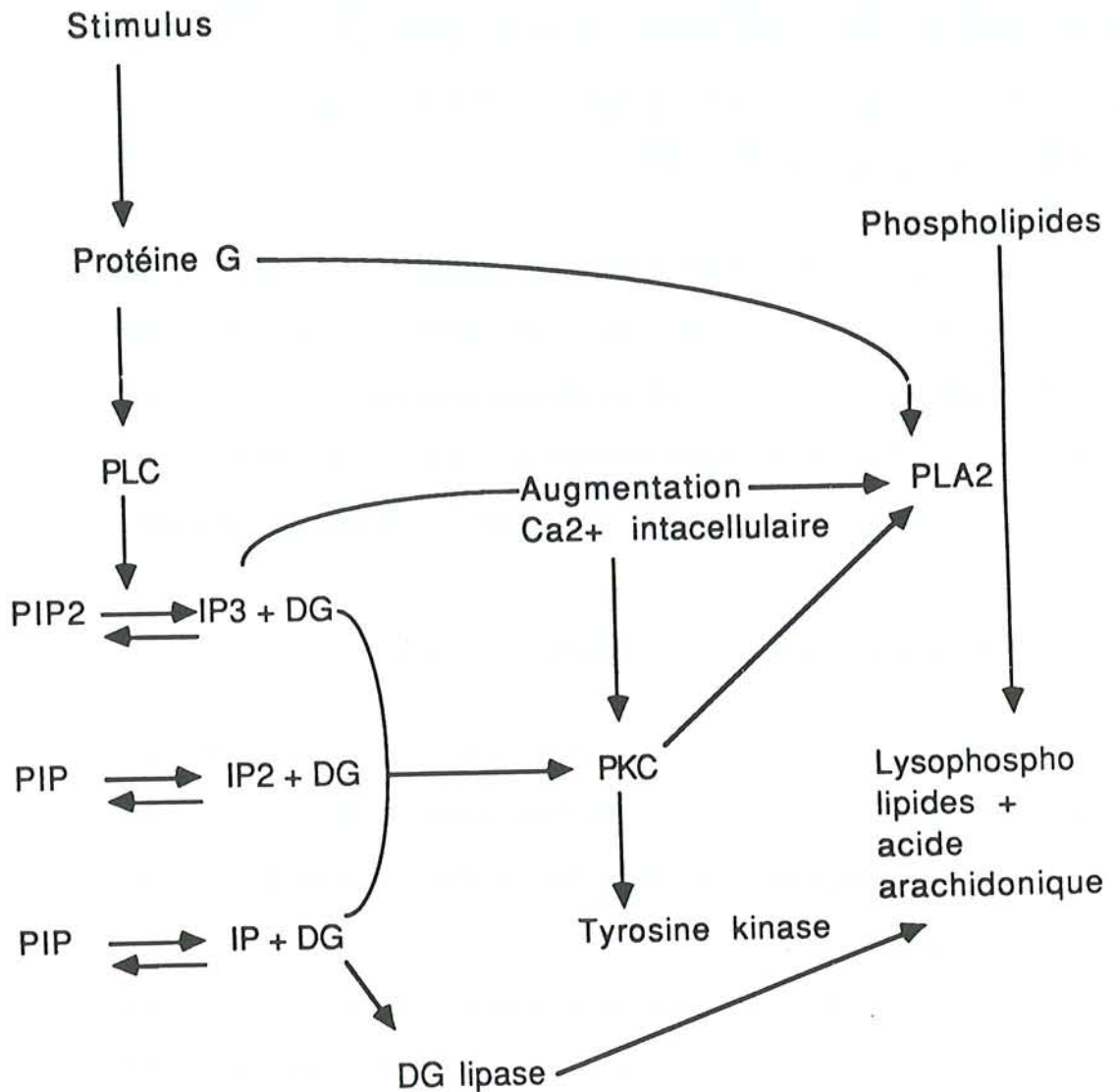
- 2) l'acide arachidonique peut être obtenu à partir du diacylglycérol grâce à la diacylglycérol lipase (16).

1.2.1.7.6.2. Métabolisme de l'acide arachidonique.

Il peut donner naissance à 3 types de composés: les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes (12,16).

Les prostaglandines et les thromboxanes sont générés grâce à la prostaglandine endoperoxyde synthétase; les leucotriènes par les lipoxygénases (12). Dans les PN, c'est principalement la voie des lipoxygénases qui prédomine (12).

Figure 17 : Événements aboutissant à la libération d'acide arachidonique, d'après Sha'afti et coll. (16).



PLC : phospholipase C, PIP₂ : phosphoinositide biphosphate, PIP : phosphoinositide monophosphate, PI : phosphoinositide, IP₃ : inositol triphosphate, IP₂ : inositol biphosphate, IP : inositol monophosphate, DG : diacylglycérol, PKC : protéine kinase C, PLA₂ : phospholipase A₂.

1.2.1.7.7. Le platelet activating factor (PAF).

La formation du PAF est résumée par la figure 18 (16).

Le PN possède des récepteurs pour le PAF (16). Le PAF agit sur les plaquettes et les PN (16). Chez ces derniers, il active divers processus dont le chimiotactisme, la dégranulation, l'agrégation, le métabolisme oxydatif... (16).

1.2.1.7.8. Les ions Na^+ et K^+ .

Ils ne semblent pas être des éléments essentiels au processus de couplage (12).

La concentration intragranulocytaire en K^+ est supérieure à celle du milieu extracellulaire, à l'inverse du Na^+ (3). Ce gradient est maintenu grâce à l'action d'une pompe Na^+/K^+ dont l'énergie provient de l'hydrolyse de l'ATP, via une ATPase membranaire sensible au Na^+ , K^+ et Mg^{2+} , et inhibée par l'ouabaine (3).

1.2.1.7.9. Le calcium (Ca^{2+}) intracellulaire.

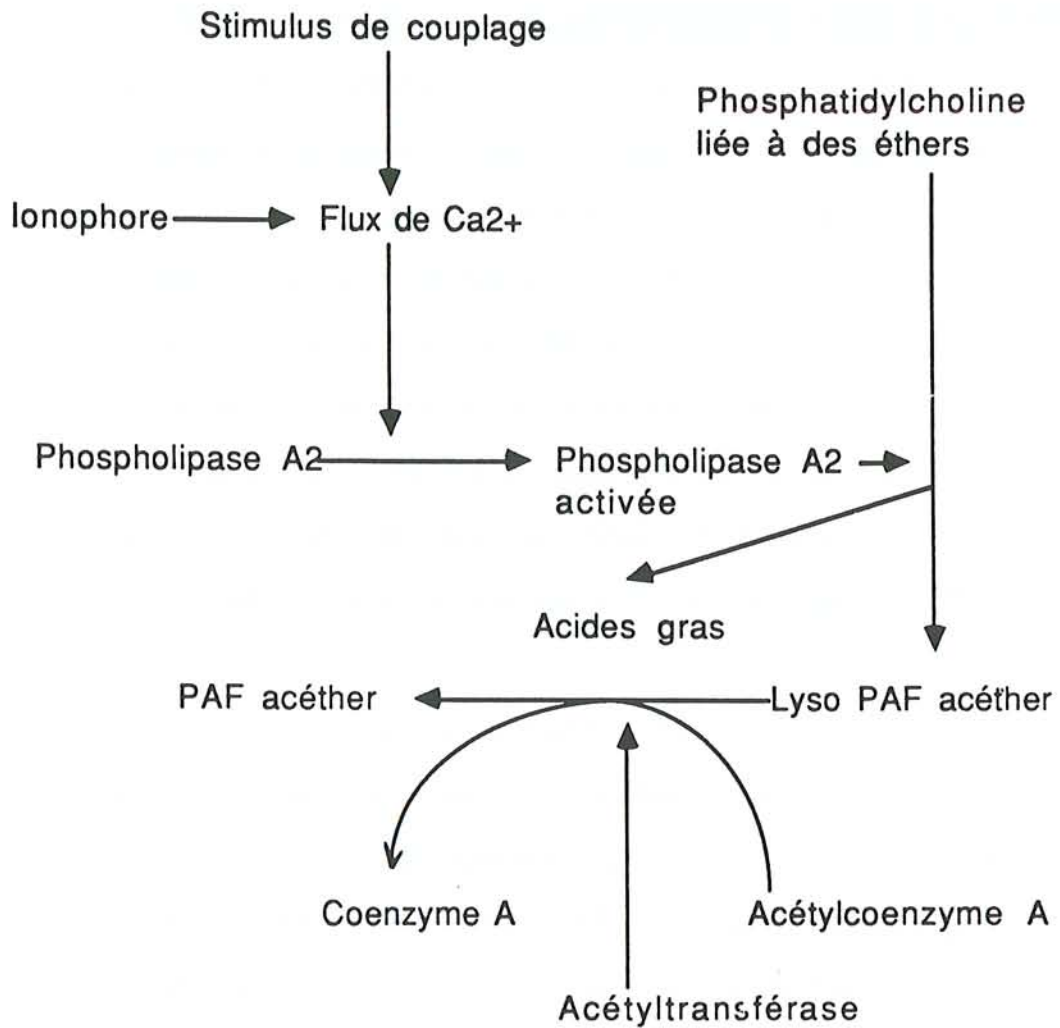
L'intervention de cet ion a déjà été évoquée. Après stimulation des PN, on observe un passage du Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, accompagné d'une libération de Ca^{2+} à partir des sites de stockage intracellulaire (16).

Le Ca^{2+} pourrait intervenir dans la polymérisation de l'actine, et par conséquent dans la mobilité du PN; ainsi que dans la dégranulation des PN (13).

1.2.1.7.10. Les nucléotides cycliques.

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) exercent des influences régulateurs opposées sur un grand nombre de cellules (20). Les réactions lymphocytaires mixtes (21,22), la production du facteur du complément C2 par les monocytes (23), la libération de médiateurs en relation avec les phénomènes d'allergie (24,25), la

Figure 18 : Formation du platelet activating factor, d'après Sha'afti et coll. (16).



PAF : platelet activating factor.

cytotoxicité dépendant des lymphocytes T (20), la production d'anticorps (20)... sont diminués par l'AMPc et par les agents augmentant la production d'AMPc.

Le GMPc augmente l'intensité des phénomènes décrits précédemment (20).

L'AMPc et le GMPc sont également impliqués dans la régulation du glycogène (20,26), du *leukocyte activating factor* (27,28), des fonctions du monocyte (29); ils sont aussi perturbés par des maladies tumorales (30).

L'incubation des PN avec de l'AMPc, ainsi qu'avec des agents qui augmentent les taux d'AMPc intragranulocytaire (épinéphrine, isoprotérénol, la toxine du choléra, les prostaglandines E₁ et E₂...), inhibe le chimiotactisme de ces cellules (25,31,32). Au contraire, le GMPc et les agents qui augmentent la concentration granulocytaire en GMPc (acétylcholine, phorbol myristate acétate (PMA), prostaglandine F₂...) augmentent le chimiotactisme des PN (25).

L'incubation du FMLP avec les PN provoque une augmentation transitoire de l'AMPc dans les 30 secondes qui suivent l'exposition à ce peptide, avec retour à la normale après 5 minutes (33,34). Ce phénomène est aussi observé avec des cellules tumorales (35). Cependant, l'amplitude du pic d'AMPc n'est pas proportionnelle à l'intensité du chimiotactisme (33). Il n'y a pas d'augmentation significative du taux de GMPc dans la minute qui suit l'exposition au FMLP (36). Le traitement des PN avec la PGE₁ diminue le flux de Ca²⁺ transmembranaire lié à l'exposition au FMLP (37).

Les agents chimiotactiques (FMLP) et les modulateurs chimiotactiques (phorbol myristate acétate, PGF₂, phényléphrine, carbachol...) peuvent tous deux élever le taux de GMPc intragranulocytaire (25). Le lévamisole à des concentrations de l'ordre de 10⁻³ mol/ L peut augmenter le chimiotactisme et la migration spontanée, ainsi que le GMPc intragranulocytaire (38).

Il est possible qu'en assurant le maintien du GMPc à un niveau suffisant, l'assemblage des microtubules et la migration des PN soient favorisées (24).

D'autres immunomodulateurs (tuftsine, assimexon, muramyl-peptide...) inhibent le chimiotactisme sans perturber le taux des nucléotides cycliques du PN (39).

Les facteurs augmentant le taux d'AMPc du PN et l'AMPc lui-même diminuent la libération d'hydrolases lysosomiales dans le milieu extérieur, de même que le traitement des PN par la colchicine ou la vinblastine (26,31,40,41). Le GMPc et les facteurs augmentant le GMPc intragranulocytaire ont un effet inverse (26,30,40,41). Ceci pourrait signifier que les nucléotides cycliques, par un effet indirect sur les microtubules, influencent la fusion avec les vacuoles de phagocytose (26,41).

Le calcium intracellulaire intervient dans le processus de couplage stimulus-réponse en ayant accès au processus intracellulaire responsable de l'accumulation de GMPc (26,41,42). L'antagonisme entre GMPc et AMPc pourrait être expliqué par leur capacité à réguler des kinases ou des phosphatases intervenant au niveau de substrats communs (enzymes, protéines de structure...) (43).

L'élévation de l'AMPc se déroule en même temps que l'hyperpolarisation de la membrane et précède la libération des hydrolases granulaires ainsi que la production d'anion superoxyde (44). L'élévation de l'AMPc peut être découplée de ces phénomènes par des modifications de la composition ionique extracellulaire (élimination du Ca^{2+} et remplacement par Na^+ ou K^+), ce qui suggérerait que l'AMPc n'est pas un facteur-clef dans le processus de couplage précoce (45).

La stimulation préalable de la surface du PN par les prostaglandines E_1 ou I_2 libère des quantités importantes d'AMPc, ce qui pourrait expliquer, en grande partie, l'effet stabilisant de ces prostaglandines sur la dégranulation et la production d'ion superoxyde (45).

Pendant le contact des PN avec des particules de zymosan recouvertes de facteur rhumatoïde, des agents tels l'épinéphrine, l'isoprotérénol et l'AMPc

inhibent à la fois l'ingestion de particules et la libération de bêta-glucuronidase (46). Cette action de l'épinéphrine est associée à une élévation concomitante de l'AMPc intragranulocytaire (46). Le GMPc et l'acétylcholine accélèrent la dégranulation sans affecter la phagocytose de particules (46).

Les agents de type FMLP ou les complexes immuns induisent une libération des granules primaires et secondaires avec élévation du taux d'AMPc, alors que la concanavaline A et le PMA ne provoquent qu'une dégranulation des granules spécifiques sans modification du taux d'AMPc (47).

Les PN sont moins sensibles que les lymphocytes aux agonistes de l'adénylcyclase (48).

L'assemblage des microtubules est altéré chez les patients atteints de la maladie de Chédiak-Higashi, avec une augmentation importante du taux d'AMPc et une altération de la fluidité membranaire (49,50).

1.2.2.Les fonctions du PN.

1.2.2.1.Le chimiotactisme.

1.2.2.1.1.Introduction.

Le chimiotactisme peut être défini comme une migration unidirectionnelle des PN en réponse à un gradient de substances douées de propriétés attractives vis-à-vis d'eux, et appelées facteurs chimiotactiques (51). Placés dans un gradient de facteurs chimiotactiques, les PN vont adhérer à des surfaces et commencer un mouvement amiboïde, orienté dans le sens de croissance du gradient (51). Ce processus favorise, *in vivo*, l'accumulation des PN dans le site inflammatoire après la reconnaissance des cellules étrangères (bactéries, par exemple) (52).

Le chimiotactisme comprend deux grands phénomènes: la génération des facteurs chimiotactiques d'une part; et d'autre part la perception de ces facteurs par les PN, ainsi que la réponse de mobilité de ceux-ci (52).

1.2.2.1.2.La génération des facteurs chimiotactiques.

De nombreux facteurs chimiotactiques existent dans l'organisme humain sous la forme de précurseurs, nécessitant une activation enzymatique avant de pouvoir attirer les PN (12).

On distingue parmi les facteurs chimiotactiques les cytotoxines (action attractives directe) et les cytotoxinogènes, qui induisent la formation de cytotoxines (51).

Les principaux facteurs chimiotactiques sont de nature protéique (protéines bactériennes, FMLP, C5a, facteur chimiotactique des PN...) ou lipidiques (LTB₄, 5-HETE, 5,12-HETE, 8,15-HETE, lipoxines, PAF...) (52). Ces données sont résumées par le tableau IX (52).

Tableau IX : Facteurs chimiotactiques pour le polynucléaire (2,3,7,9,12,13,52).

Protéines

Protéines bactériennes

Formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine

C5a

Peptide chimiotactique pour les neutrophiles

Lipides

Leucotriènes (LTB₄, 5-HETE, 5,12-HETE, 8,15-HETE)

Lipoxines

Platelet-activating factor

1.2.2.1.3.Reconnaissance des facteurs chimiotactiques et mobilité du PN.

La réponse chimiotactique des PN au gradient de concentration de facteur chimiotactique implique la liaison de ce facteur à un récepteur de membrane spécifique au niveau des PN (12,51). Cette liaison va activer des processus biochimiques cellulaires, une réorganisation de la surface cellulaire et des modifications du cytosquelette pour permettre l'orientation de la cellule dans le sens du gradient et la production de la force nécessaire au déplacement cellulaire (12).

1.2.2.1.3.1.Mécanisme du chimiotactisme.

1.2.2.1.3.1.1.Les étapes du chimiotactisme.

Le chimiotactisme comprend 5 étapes distinctes, mais étroitement intriquées :

1) la reconnaissance du facteur chimiotactique par le PN, 2) l'adhésion du PN 3) l'activation des processus biochimiques nécessaires à 4) l'orientation du mouvement cellulaire et 5) la génération de la force nécessaire au mouvement cellulaire (52).

1.2.2.1.3.2.2.La reconnaissance facteur chimiotactique-récepteur.

La reconnaissance des facteurs chimiotactiques par le PN est réalisée par une série de récepteurs cellulaires localisés à la surface du PN (12,52). Ces récepteurs sont des protéines de membrane dont les deux extrémités sont douées de propriétés différentes (12,52). Une extrémité est saillante au niveau de la surface du PN, l'autre transperce la membrane cellulaire et est associée à des composants du cytoplasme qui contrôlent la biochimie du PN (17,51,52).

Chimiquement, les récepteurs aux facteurs chimiotactiques sont des glycoprotéines dont l'élément glycosylé est situé en surface du PN (12,18,52).

Il existe un récepteur spécifique pour chaque facteur chimiotactique (51,52).

Les récepteurs sont distribués à la surface du PN (52). Lorsque le facteur chimiotactique entre en contact avec le récepteur, il se lie à lui via une

complémentarité de volume de type clef-serrure (51). La liaison facteur chimiotactique-récepteur va modifier l'extrémité interne du récepteur, en contact avec le cytoplasme (52). Cette modification du récepteur active une série de réactions biochimiques, en particulier la synthèse et l'hydrolyse du PIP₂ à partir des lipides de la membrane cellulaire (figure 19) (52). Celle-ci influence directement et indirectement l'adhésion cellulaire, l'orientation de la cellule et le mouvement cellulaire (52). L'hydrolyse du PIP₂ va générer 2 produits : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃) (16,52). L'IP₃ permet la libération d'ions Ca²⁺ à partir d'un *pool* intracellulaire de Ca²⁺, augmentant donc la concentration intracellulaire en Ca²⁺ (16,52).

L'activation par le facteur chimiotactique de la production de PIP₂, de la libération de DAG et de l'augmentation de concentration cytoplasmique en Ca²⁺, à l'endroit où le facteur chimiotactique se lie à son récepteur, rend les trois seconds messagers disponibles pour réagir avec les protéines effectrices au niveau cytoplasmique (51,52).

Comme ces seconds messagers ne sont produits que dans les zones proches des récepteurs auxquels se sont liés les facteurs chimiotactiques, les effets biochimiques sont donc répartis de façon asymétrique dans la cellule (51,52). Ces données sont résumées dans les figures 19 et 20 (52).

1.2.2.1.3.3. Les effets biochimiques des seconds messagers.

Les seconds messagers activent une série d'évènements biochimiques.

1.2.2.1.3.3.1. Fusion des granules avec la membrane.

Les messagers activent le mouvement des granules vers la membrane, ainsi que la fusion de ceux-ci avec la membrane plasmique (16). Les granules contiennent des protéines promotrices de l'adhérence des PN à l'endothélium (CD 11 et CD 18) ainsi que des récepteurs aux facteurs chimiotactiques (12,13). Comme ce phénomène est local au niveau cellulaire, l'augmentation

Figure 19 : Représentation schématique de l'activation du chimiotactisme des polynucléaires par un facteur chimiotactique, d'après Howard (52).

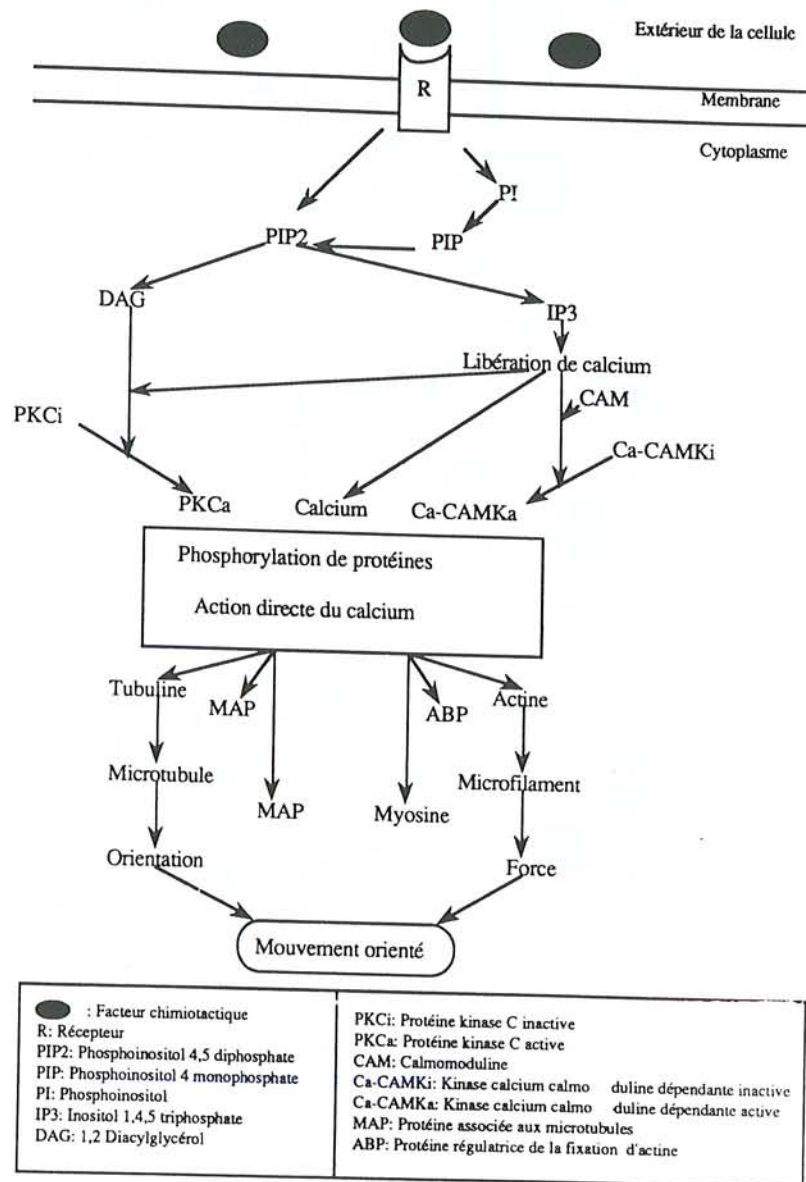
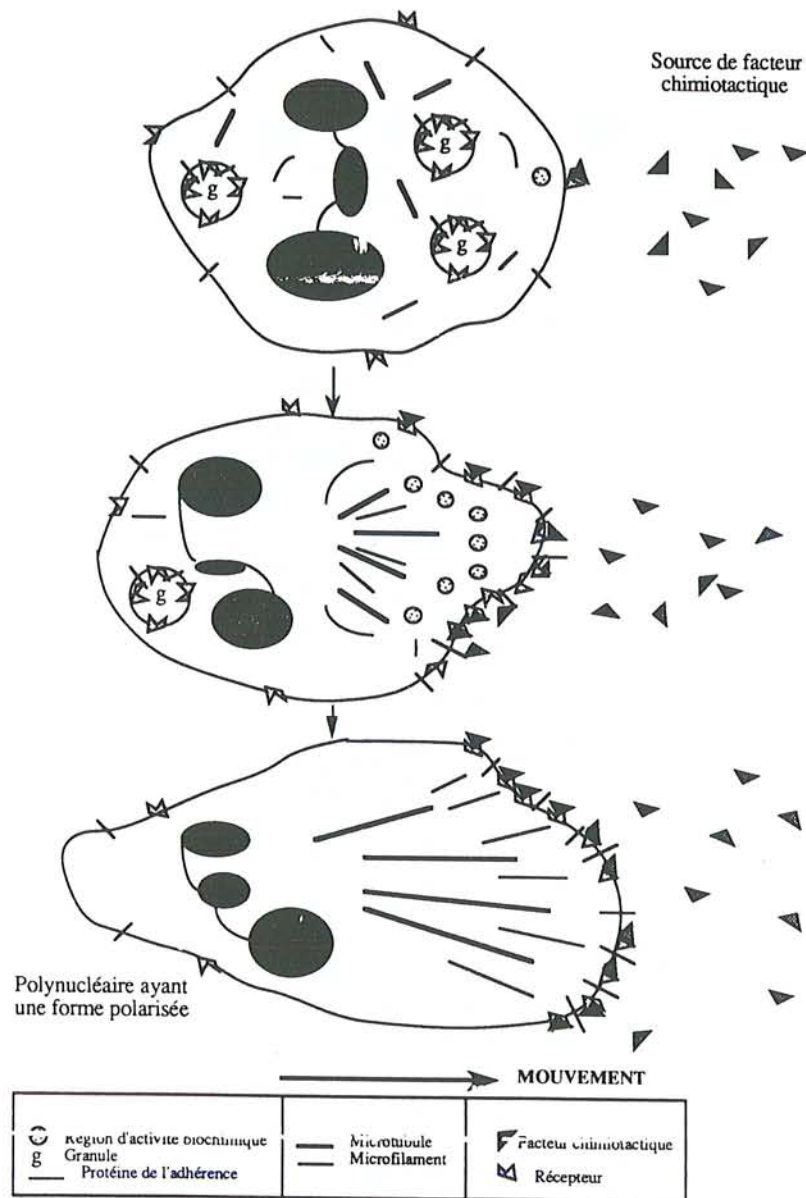


Figure 20 : Schéma de la réponse chimiotactique, d'après Howard 52).



des récepteurs aux facteurs chimiotactiques et la sensibilité du PN à de nouvelles molécules de ces facteurs sont également polarisées au niveau cellulaire (52,53).

1.2.2.1.3.3.2.Interaction avec le cytosquelette.

Le PIP_2 et le Ca^{2+} agissent comme régulateurs au niveau de la formation et des interactions biochimiques relatives aux microfilaments et aux microtubules (16,52,53). Les microtubules sont formés de polymères de tubuline et sont essentiels pour l'orientation du PN (12). Les microfilaments sont constitués d'actine (qui peut réagir avec la myosine) et jouent un rôle important au niveau du contrôle de la forme du PN ainsi que de sa locomotion (12).

1.2.2.1.3.3.3.Interaction avec les protéines kinases.

Le Ca^{2+} réagit avec le DAG ou avec la calmoduline (une protéine liant le calcium) pour activer une ou plusieurs enzymes appelées protéines kinases C (PKC) et kinase dépendante du calcium/calmoduline (Ca-CAM K) (12,16,52,53). Ces kinases phosphorylent des protéines (12). Elles transfèrent le groupement phosphoryl de l'ATP sur les microtubules et les microfilaments, ainsi que leurs protéines régulatrices, comme les protéines associées aux microtubules (MAPS) et la myosine (52,53). Ces protéines phosphorylées contrôlent la formation du réseau de microtubules et de microfilaments au niveau du PN, et par conséquent, l'orientation et la mobilité cellulaire (52,53). L'ensemble de ces données est illustré par les figures 19 et 20 (52).

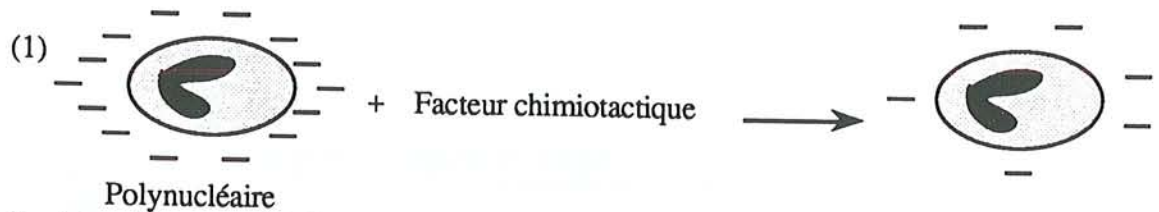
1.2.2.1.4.Conditions du déplacement des cellules.

Au cours du déplacement du PN, les membranes se déploient à la façon d'une bande de roulement d'autochenilles, dans une direction privilégiée, celle du gradient croissant en facteur chimiotactique (51). Une telle locomotion implique un dispositif contractile, un couplage entre la surface extérieure et le dispositif contractile et un moyen de faire apparaître de nouvelles zones d'adhésion dans la région du front de déplacement de la cellule (51,52).

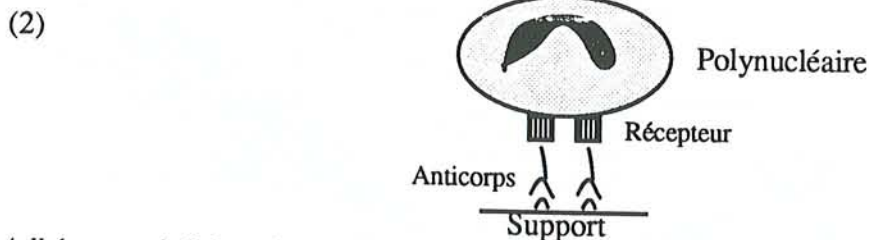
L'adhésion des PN aux surfaces endothéliales constitue une étape importante dans la réaction inflammatoire (51). Une série de protéines de surface sont impliquées dans ce phénomène: le récepteur MAC-1 (aussi appelé MO-1 et OKM1), qui fonctionne comme récepteur pour le C3bi (CR3); le récepteur LFA-1 et le récepteur p 150,95 (13). L'adhérence des PN aux surfaces endothéliales dépend du nombre de charges négatives respectivement portées par le PN et par la cellule endothéliale (51). Ces charges négatives sont celles des acides sialiques et sans doute celles des fonctions carboxyliques des glycoprotéines de membrane (51). La figure 21 résume les mécanismes proposés par la littérature permettant d'expliquer l'adhésion des PN à divers substrats (19). La progression du PN nécessite que de nouvelles possibilités d'adhésion apparaissent en même temps que cessent les premières apparues (51). La réorganisation cellulaire des microtubules est continue et permet à la cellule d'adapter son cytosquelette à son déplacement et aux mouvements internes des organites (51). La polarité du déplacement chimiotactique semble sous-tendue par l'apparition de faisceaux parallèles de microtubules, allant du centrosome vers la région d'extension du cytoplasme (51). Ces données sont résumées par la figure 22 (51).

Finalement, le PN migre vers la bactérie selon le gradient de facteur chimiotactique, ensuite la phagocyte, puis la tue (51).

Figure 21 : Les quatre mécanismes proposés par la littérature permettant d'expliquer l'adhérence des polynucléaires à divers supports, d'après Morin (19).

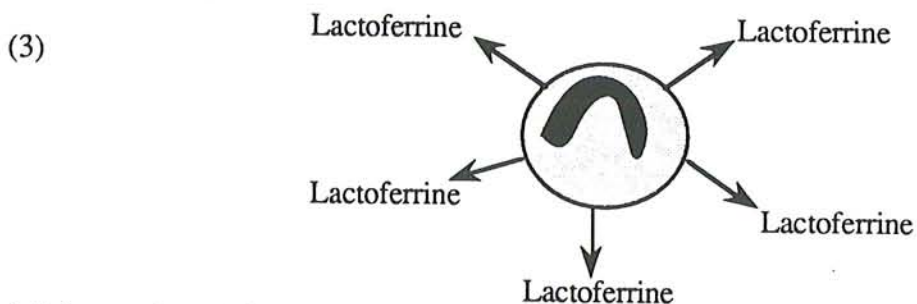


Certains facteurs chimiotactiques en réduisant la charge négative portée par les polynucléaires favorisent l'adhérence.

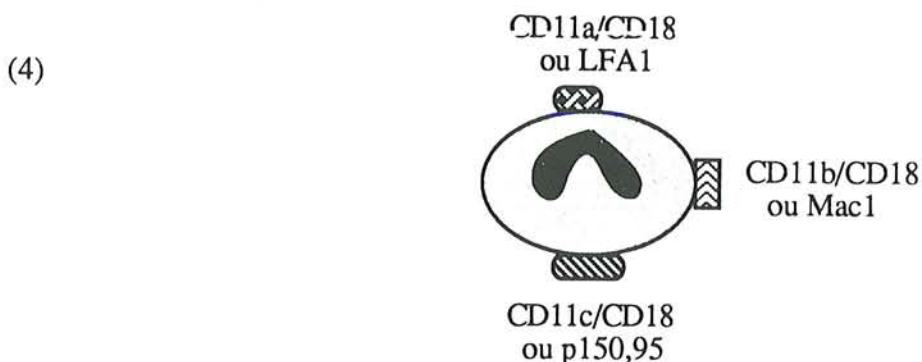


Adhérence réalisée grâce aux interactions:

- Support et anticorps.
- Anticorps et récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines localisés à la surface des polynucléaires.

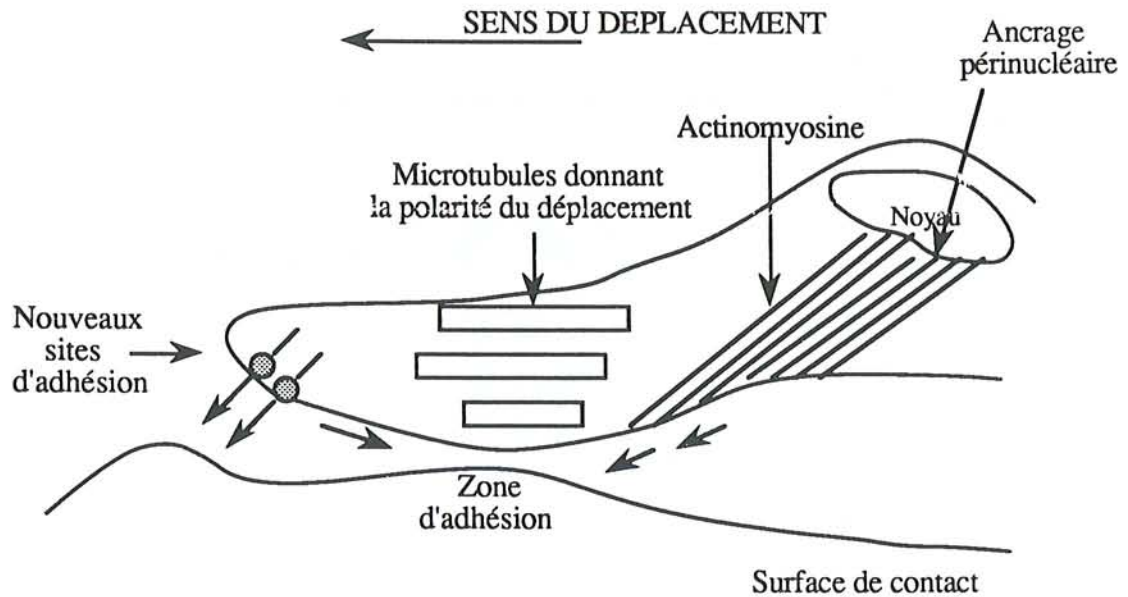


Adhérence favorisée par la lactoferrine contenue dans les granules spécifiques des polynucléaires.



Intervention des complexes glycoprotéiques spécifiques de l'adhésion tel que CD11a/CD18, CD11b/CD18 et CD11c/CD18 localisés à la surface des polynucléaires. Le rôle de ces complexes CD11/CD18 dans l'adhésion cellulaire est particulièrement étudié.

Figure 22 : Principaux éléments impliqués dans le déplacement des polynucléaires, d'après Giraudet et coll. (51).



1.2.2.2.La phagocytose.

1.2.2.2.1.Introduction.

La notion de phagocytose par des effecteurs cellulaires pouvant intervenir au niveau de la défense antibactérienne fut mise en évidence par Elie Metchnikoff dès la fin du 19ème siècle (54). Ce concept fut opposé dans un premier temps à celui du rôle prépondérant joué par des effecteurs humoraux, à savoir les anticorps (54). En fait, les chercheurs se rendirent rapidement compte que ces 2 systèmes agissaient en coopération et que les facteurs humoraux, à savoir les anticorps et les facteurs du complément, aidaient à la reconnaissance et la destruction d'organismes étrangers par les effecteurs cellulaires: les phagocytes (54). Ce processus de coopération est appelé opsonisation (54).

Le PN est, quantitativement tout du moins, le principal phagocyte chez l'homme (12,51). Au niveau sanguin, il constitue la cellule la plus abondante de ce type et, au sein de ce tissu liquide, peut directement agir contre les bactéries et les organismes unicellulaires (12).

Le mécanisme de phagocytose est suivi de la génération de diverses substances, oxydantes ou non, qui seront détaillées dans le chapitre suivant, relatif à la bactéricidie (1.2.2.3.).

1.2.2.2.2.Mécanisme du processus de phagocytose.

1.2.2.2.2.1.Mécanisme général.

Les PN migrent vers les sites d'infection tissulaire par le processus de chimiotactisme, précédemment décrit (51,54,55). Les organismes reconnus comme étrangers sont alors étroitement mis en contact avec la membrane du PN (55,56). Il s'en suit une série de réactions complexes qui aboutissent à l'ingestion de cet organisme par phagocytose (56,57). Une fois ingérée, la particule est alors digérée et détruite, partiellement ou totalement (54).

1.2.2.2.1.1.Internalisation de la particule.

Le processus d'internalisation, appelé endocytose, est déclenché par des particules opsonisées qui sont reconnues par des récepteurs spécifiques des opsonines C3b et Fc (12). Les récepteurs intervenant au niveau du processus d'opsonisation sont repris dans le tableau X (56). Il existe aussi des récepteurs non spécifiques qui fixent les particules non opsonisées (56).

Le PN, au pôle de reconnaissance des opsonines, émet des pseudopodes qui englobent progressivement la particule (54,56). La membrane plasmique du PN s'invagine, recouvre la particule et finalement l'isole dans un lysosome spécial appelé phagolysosome ou phagosome (56). Ces données sont reprises dans la figure 23 (56).

1.2.2.2.1.2.La dégranulation.

Durant et après ce processus, les granules du PN migrent vers le phagosome et leurs membranes fusionnent avec celle du phagosome de telle sorte que le contenu des granules est libéré dans le phagosome et dans le milieu environnant (56,58,59,60). Ce processus est appelé dégranulation (59).

Le relargage des granules azurophiles est rapide et massif (56). Il commence bien avant que le phagosome ne soit fermé (56). Ainsi, après la phagocytose, il se produit une augmentation transitoire du pH due à l'action des protéines cationiques (54). Ensuite, le pH chute et les enzymes lysosomiales entrent en action (54). La lactoferrine fixe les ions libres (54). Le lysozyme digère le peptidoglycan des parois bactériennes (54). La sécrétion du contenu des granules du PN peut aussi se produire en dehors du contexte de la phagocytose : lors de la mort de la cellule ou en présence d'une importante concentration de cytokines (56).

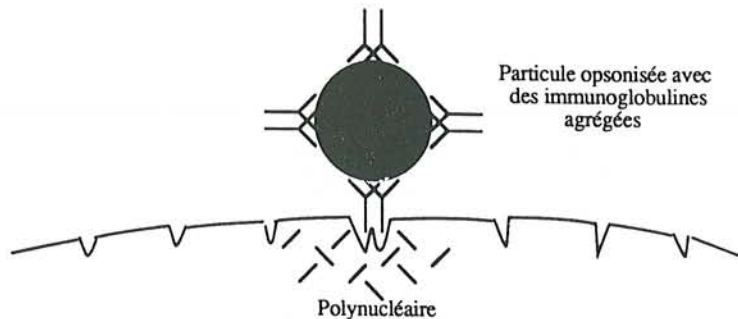
1.2.2.2.1.3.L'explosion respiratoire.

Simultanément, la liaison de la particule à la membrane du PN active une NADPH oxydase quiescente localisée au niveau de la membrane du PN, causant une augmentation massive de la consommation d'oxygène (56). Une

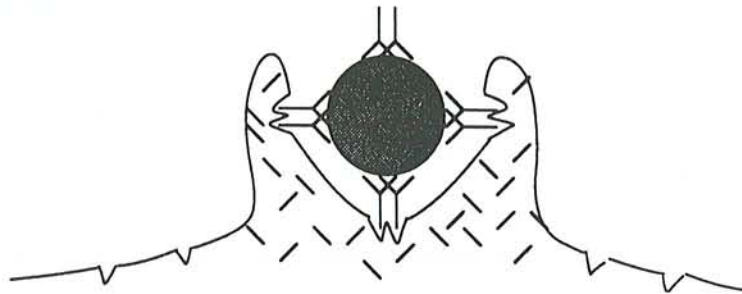
Tableau X : Récepteurs pour le fragment Fc et les facteurs du complément au niveau des phagocytes, d'après Silverstein et coll. (56).

Récepteur	Ligand	Poids moléculaire	Localisation cellulaire
Fc type I	Monomères d'immunoglobulines	72 kDa	Monocytes, macrophages
Fc type II	Agrégats d'immunoglobulines	42 kDa	Granulocytes, monocytes, plaquettes
Fc type III	Agrégats d'immunoglobulines	50-70 kDa	Granulocytes, macrophages, lymphocytes
Complément type 1 (CR1)	C3b, C4b, C3bi	210-290 kDa	Granulocytes, macrophages, monocytes, lymphocytes B
Complément type 3 (CR3)	C3bi, fibrinogène, facteur X	95-170 kDa	Granulocytes, monocytes, macrophages, lymphocytes

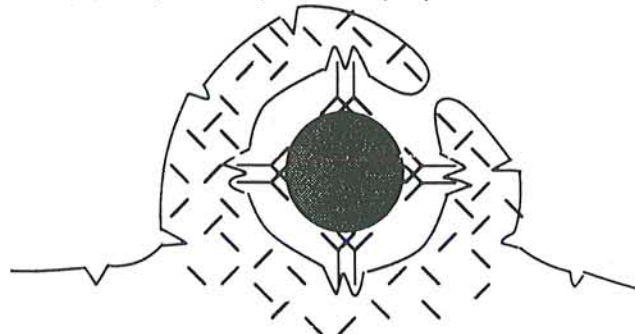
Figure 23 : Mécanisme possible de la phagocytose selon la zipper hypothèse, d'après Silverstein et coll. (56).



Fixation au polynucléaire de la particule opsonisée par l'intermédiaire des récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines situés à la surface des polynucléaires. Il y a assemblage des microfilaments d'actine dans la zone cytoplasmique adjacente à ce site de liaison.



Début de formation de pseudopodes englobant la particule. Création d'interactions supplémentaires entre les récepteurs et les ligands situés sur la particule afin d'aboutir à un assemblage plus important des protéines du cytosquelette.



Les extensions des pseudopodes continuent. La particule est pratiquement totalement englobée. Il y a ensuite fusion membranaire qui aboutit à la formation du phagosome.

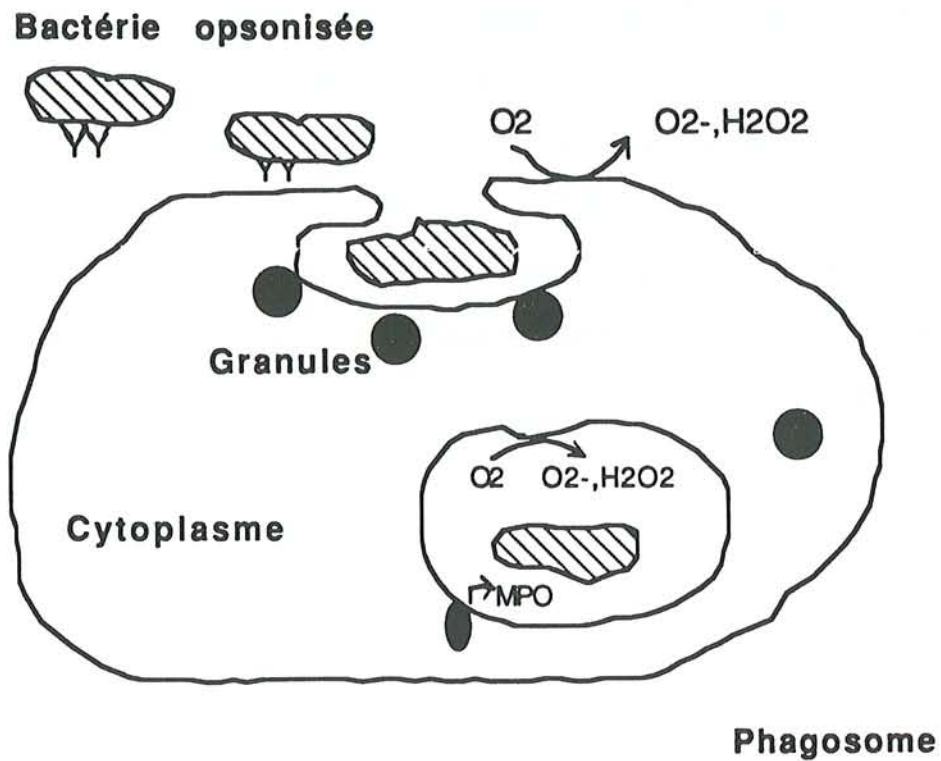
fois démarrée, cette "explosion respiratoire" dure 15 à 20 minutes et produit deux substances importantes : l'ion superoxyde (O_2^-) et l'eau oxygénée (H_2O_2) (56).

Le processus de génération d'espèces oxydantes sera vu plus en détail dans le chapitre suivant (1.2.2.3.).

L'ensemble du processus est résumé par la figure 24 (54).

La totalité du processus de phagocytose, depuis la reconnaissance de la particule jusque la dégranulation prend quelques minutes (56). Les bactéries sont tuées généralement durant ce laps de temps (54). La digestion qui va suivre se poursuivra durant plusieurs heures (54). La destruction de l'agent agresseur par les phénomènes oxydatifs et non oxydatifs sera développé dans le chapitre suivant.

Figure 24 : Le processus de phagocytose, d'après Roitt et coll. (54).



La liaison de la bactérie opsonisée à la membrane du granulocyte va déclencher l'explosion respiratoire. On observe l'invagination de la membrane plasmique, qui va ensuite former le phagosome. Le contenu des granules est déversé dans le phagosome ainsi que dans l'espace extracellulaire.

1.2.2.3. La bactéricidie.

1.2.2.3.1. Introduction.

Chez l'homme, la phagocytose est réalisée de façon rapide et efficace par les PN, les polynucléaires éosinophiles, les monocytes et les macrophages (54,56). Ces phagocytes spécialisés constituent la première ligne de défense de l'organisme contre l'infection (54,56).

Quand les phagocytes, en réponse à un stimulus chimiotactique, migrent vers les sites d'infection, ils sont mis en contact avec les micro-organismes agresseurs et l'ingestion s'en suit (54). Une fois ingérés, les micro-organismes sont retenus dans des vacuoles intracellulaires (phagosomes) où ils sont exposés à des facteurs antimicrobiens (54). Ils peuvent ensuite être tués (54,60).

Les PN possèdent plusieurs méthodes pour détruire les bactéries. Ces méthodes sont généralement classées en mécanismes oxygène-indépendants et oxygène-dépendants (54,56).

1.2.2.3.2. Les mécanismes oxygène-indépendants.

Il est assez difficile de déterminer l'efficacité des mécanismes bactéricides non-oxydatifs, mais il existe plusieurs éléments pour affirmer qu'une activité antibactérienne importante puisse se manifester en l'absence d'oxygène (54).

D'abord, l'efficacité des mécanismes oxygène-indépendants peut être démontrée dans des modèles expérimentaux appauvris en oxygène (54). Ensuite, les PN de patients atteints de granulomatose chronique, qui sont incapables de générer les espèces oxygénées microbicides peuvent néanmoins tuer des quantités limitées de la plupart des bactéries (13,54). Troisièmement, il est connu que les constituants des granules de PN possèdent une activité bactéricide (56).

1.2.2.3.2.1. Les protéines bactéricides du PN.

1.2.2.3.2.1.1. Les protéines cationiques.

Les études sur des fractions de PN lysés ont localisé les protéines antibactériennes au niveau des granules cytoplasmiques (12,56,60). Plusieurs protéines ont été décrites; nous reprendrons ici les principales d'entre elles (54):

- 1) deux types de protéines cationiques spécifiques des gram négatifs ont été décrites: la première de poids moléculaire 37 kDa et la seconde de poids moléculaire 57 kDa. Ils sont présents au niveau des granules primaires et secondaires et nécessitent une gamme de pH comprise entre 5.6 et 7.4 (54);
- 2) une protéine bactéricide augmentant la perméabilité (PBI), de poids moléculaire 60 kDa, également spécifique des gram négatifs, a été localisée au niveau des granules azurophiles. Elle requiert un pH proche de 7.0 (54);
- 3) trois peptides de faible poids moléculaire (inférieur à 3.5 kDa) appelés défensines ont été mis en évidence au niveau des granules azurophiles (54). Ils possèdent des propriétés à la fois bactéricides et antifongiques. Ils requièrent un pH compris entre 7.0 et 8.0 (54).

Ces protéines de type cationique sont davantage présentes dans les PN que dans les macrophages (54). Elles sont surtout efficaces à des pH basiques, qui sont observés avant l'acidification du phagosome (54).

1.2.2.3.2.1.2. Le facteur bactéricide azurophile.

Il s'agit d'une protéine extraite des granules azurophiles, possédant une activité bactéricide vis-à-vis des gram positifs et négatifs, à un pH optimum de 5.5 (54). Ce pH est celui qui existe dans le phagosome après l'ingestion de microorganismes (54). Ces données sont résumées par le tableau XI (54).

1.2.2.3.2.1.3. Le lysozyme.

Le lysozyme est une protéine cationique de 14.5 kDa, localisée au niveau des granules primaires et secondaires des PN (12). Il est aussi présent au niveau des monocytes et des macrophages (12).

Tableau XI : Protéines bactéricides du polynucléaire, d'après Roitt et coll. (54).

Protéines bactéricides	Localisation subcellulaire	pH optimal	Microorganismes sensibles
1. Protéines cationiques antimicrobiennes (pm: 37 kDa et 57 kDa)	Granules primaires et secondaires.	5.6-7.4	Bactéries gram-négatives
2. Protéine bactéricide augmentant la perméabilité (BPI) (pm: 60 kDa)	Granules primaires	7.0	Bactéries gram-négatives
3. Défensines (pm: <35 kDa)	Granules primaires	7.0-8.0	Bactéries gram-positives et gram-négatives, Cryptococcus neoformans, Herpes type I
4. Facteur bactéricide azurophile	Granules primaires	5.5	Bactéries gram-positives et gram-négatives

Le lysozyme est sécrété de façon constitutive, indépendamment de l'état d'activation du PN (12,54,61).

Le lysozyme peut agir soit à l'intérieur du phagosome, soit sous forme excrétée (54). Il détruit la liaison entre la N-acétylmuramine et la N-acétylglucosamine des protéoglycans des parois bactériennes, ce qui peut entraîner la lyse des bactéries gram positif (54). L'accès aux parois des gram négatifs (entourées par une double couche lipidique) requiert l'intervention conjointe d'autres systèmes comme les composants lytiques du complément ou les protéines cationiques lysosomiales (12,17,54,61).

La contribution précise du lysozyme à l'activité microbicide du PN n'est pas claire (54). Cependant, la digestion de la bactérie dans le phagosome est en corrélation avec leur susceptibilité à l'action du lysozyme, *in vitro* (54).

1.2.2.3.2.1.4. Les hydrolases acides.

Le PN contient, au niveau de ses granules primaires, plusieurs types d'hydrolases acides: N-acétyl-glucuronidase, cathepsines B et D, bêta-glucuronidase, bêta-glycérophosphatase, alpha-mannosidase, qui peuvent intervenir au niveau du processus bactéricide à pH acide (54,61,62).

1.2.2.3.2.2. La production d'inhibiteurs de croissance.

1.2.2.3.2.2.1. L'arginase.

Dans certains cas, c'est l'aptitude à inhiber la croissance bactérienne par la sécrétion de molécules détruisant ou diminuant l'accessibilité de substances trophiques, qui est importante (54). Ainsi, l'arginase limite la disponibilité de l'arginine et si cet effet pose peu de problèmes à la plupart des bactéries, il a été montré une corrélation entre l'activité cytolytique des phagocytes sur les schistosomules et leur sécrétion d'arginase (54). Les cellules tumorales sont également sensibles à l'action de cette enzyme (54,61).

1.2.2.3.2.2.2. La lactoferrine.

La lactoferrine se lie aux macrophages au moyen d'un récepteur spécifique; elle est endocytée et peut pénétrer dans le phagosome où elle est active à pH acide (3). Les neutrophiles sont capables de synthétiser de la lactoferrine et de la stocker au niveau des granules (3,54,61). La lactoferrine fixe le fer, même à pH acide et en prive ainsi les bactéries, ce qui limite leur croissance (3,54,61). Il faut noter que des PN surchargés en fer perdent ainsi une partie de leur pouvoir bactéricide (3,54,61).

1.2.2.3.2.3. Variations de pH au sein du phagosome.

Dans un premier temps, le pH du phagosome augmente permettant l'action toxique des protéines cationiques sur la membrane des bactéries (63). Cette phase est relativement courte (63).

Dans un deuxième temps, une acidification du phagosome dans les 10 à 15 minutes est observée (63). L'acidification du phagosome a lieu au moment de la fusion du lysosome; elle augmente l'activité de la myéloperoxydase et favorise l'action peroxydasique de la catalase (54,63).

Par elle-même, l'acidification du phagosome peut endommager certains microorganismes (54). Le pH atteint à 3.5-4.0, valeurs auxquelles des parasites tel le *Toxoplasma gondii*, sont sensibles (54). En outre, le pH optimal de la majorité des enzymes lysosomiales est acide, ainsi que celui de la lactoferrine (54).

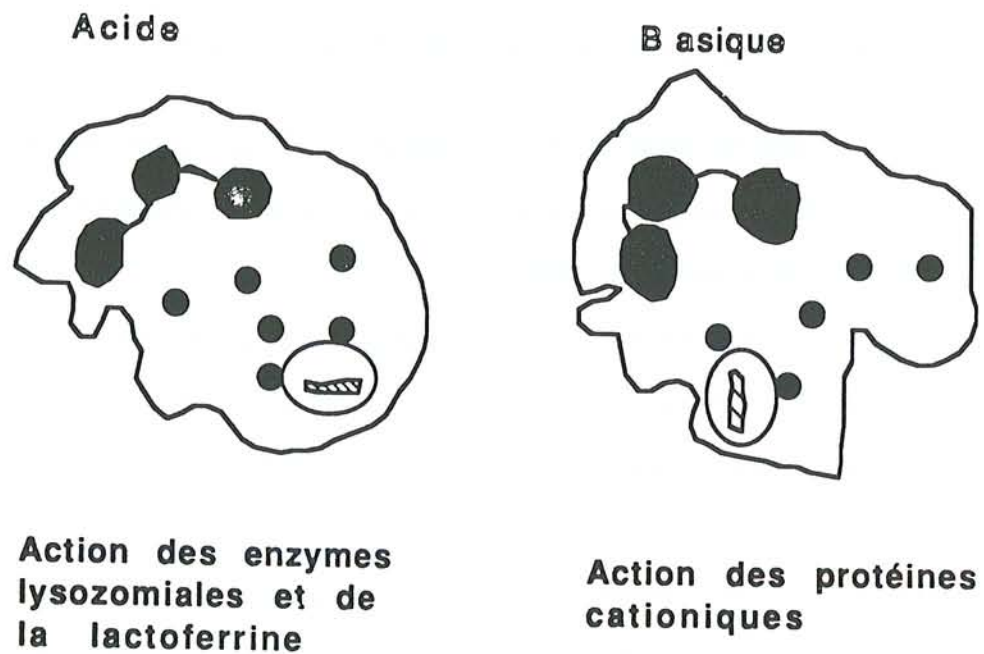
Tous ces mécanismes nécessitent la formation du phagosome (54). Ces données sont résumées par la figure 25 (54).

1.2.2.3. Les mécanismes oxygène-dépendants.

1.2.2.3.1. Introduction.

Nous avons évoqué dans le chapitre précédent le processus de phagocytose par le PN d'une particule étrangère, par exemple une bactérie. Après la

Figure 25 : Mécanismes impliqués dans la lyse bactérienne, d'après Roitt et coll. (54).



phagocytose, le PN dispose d'une série de moyens très élaborés et très performants pour détruire cette bactérie par la production d'espèces oxydantes activées (63,64,65,66).

1.2.2.3.3.2.L'explosion respiratoire.

Durant la phagocytose, les PN subissent une véritable explosion de leur métabolisme oxydatif (*respiratory burst*), comprenant principalement 1) une augmentation de la consommation d'oxygène; 2) une utilisation accrue du glucose par la voie des pentoses phosphates; 3) la libération de plusieurs espèces oxygénées (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$ et 1O_2 ; 4) le phénomène de chimiluminescence; 5) un *turnover* accéléré du glutathion réduit (13). La chimiluminescence peut être considérée comme l'émission d'un "éclair" lumineux lié à la production d'une ou plusieurs de ces espèces oxydantes (13).

1.2.2.3.3.2.1.Les espèces oxydantes générées.

L'ion superoxyde O_2^- est reconnu pour être le produit initial de l'oxygène consommé (13). Il est produit par l'intermédiaire d'un complexe enzymatique associé à la membrane du PN et appelé NADPH oxydase (65,66). Ce complexe réduit l'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons, selon la figure 26 (13,63,65).

La majeure partie de cet ion superoxyde se transforme alors par un processus de dismutation (spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase) en eau oxygénée H_2O_2 , selon la figure 26 (13).

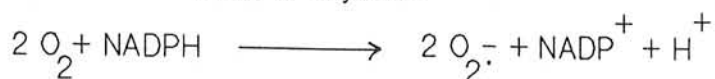
Les radicaux de type $OH\cdot$ sont des espèces hautement oxydantes formées par l'interaction de l'ion superoxyde O_2^- et l' H_2O_2 en présence de fer ou de certains autres métaux (13,65,66). Ce sont les réactions d'Haber-Weiss, reprises dans la figure 26 (13).

Le radical $\cdot OH$ peut aussi être généré par l'interaction entre l' H_2O_2 et le fer; c'est la réaction de Fenton (fig 26) (13,66). Cette dernière est accélérée par la présence de l'ion superoxyde (13).

Figure 26 : Génération des espèces oxydantes du polynucléaire, d'après Forehand (13).

1) Production de l'ion superoxyde.

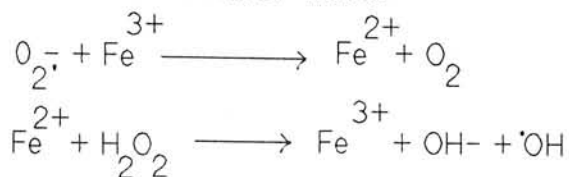
NADPH Oxydase



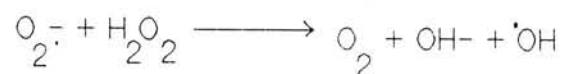
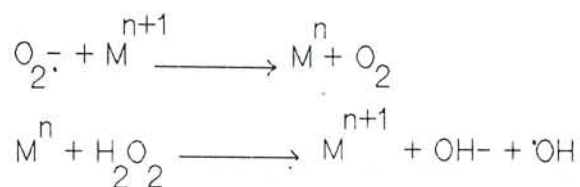
2) Formation de l'eau oxygénée à partir de l'ion superoxyde par la superoxyde dismutase (SOD).



3) Réaction d'Haber-Weiss.



4) Réaction de Fenton.



5) Formation de chloramines.



Le rôle physiologique de ces radicaux et le contrôle de leur production restent mal connus (13,65,66).

Ces espèces sont formées selon la réaction reprise dans la figure 26 (13).

D'autres espèces oxydantes ont été reconnues récemment, comme les chloramines, formées par la réaction entre l'hypochlorite et les amines, selon la figure 26 (13).

Le rôle physiologique critique de l'explosion respiratoire est illustré par la granulomatose chronique, caractérisée par une déficience marquée en génération d'espèces oxydantes et par la présence d'infections bactériennes à répétition (13).

1.2.2.3.3.2.2.Activation de l'explosion respiratoire.

Le démarrage de l'explosion respiratoire nécessite un signal approprié pour activer la NADPH oxydase quiescente (65). Cette étape peut être initiée de plusieurs façons : 1) interaction de certains ligands avec leur récepteur membranaire; 2) insertion dans la membrane plasmique d'ionophores qui initient ou médient les mouvements de cations à travers la membrane; 3) par les esters de phorbol via une activation directe du Ca^{2+} et d'une protéine kinase C phospholipide dépendante (13,16,63,65,66).

Les principaux stimuli in vitro de l'explosion respiratoire sont les suivants : PMA, facteurs chimiotactiques d'origine bactérienne, facteurs du complément, ionophores calciques, lectines végétales, particules inertes, ions fluorures, complexes immuns, dérivés de l'acide arachidonique, analogues structuraux de l'inositol et du diacylglycérol, détergents, anticorps antineutrophiles, cytochalasine E, phospholipase C, PAF, PGDF (*platelet-derived growth factor*) (13,16,63,64,65,66).

L'explosion respiratoire associée à la phagocytose de bactéries par les PN démarre 30 à 60 secondes après le contact avec la bactérie opsonisée (IgG, C3...) (63). Ce délai est probablement lié aux étapes biochimiques (transduction du signal, couplage stimulus-réponse...) requises pour lier

l'interaction ligand récepteur (stimulation) avec la modification de la NADPH oxydase à l'état actif (activation) (16). Ces étapes ont déjà été évoquées dans le chapitre relatif au couplage stimulus-réponse; elles sont résumées par la figure 27 (13).

Lorsque les PN sont stimulés par des esters de phorbol, plusieurs protéines sont phosphorylées, en association avec la libération de l'anion superoxyde (64). Des phosphorylations atypiques de protéines, observées en cas de granulomatoses chroniques, suggèrent que ces phosphorylations jouent un rôle dans l'explosion respiratoire (13). Leur rôle exact reste mal connu (13).

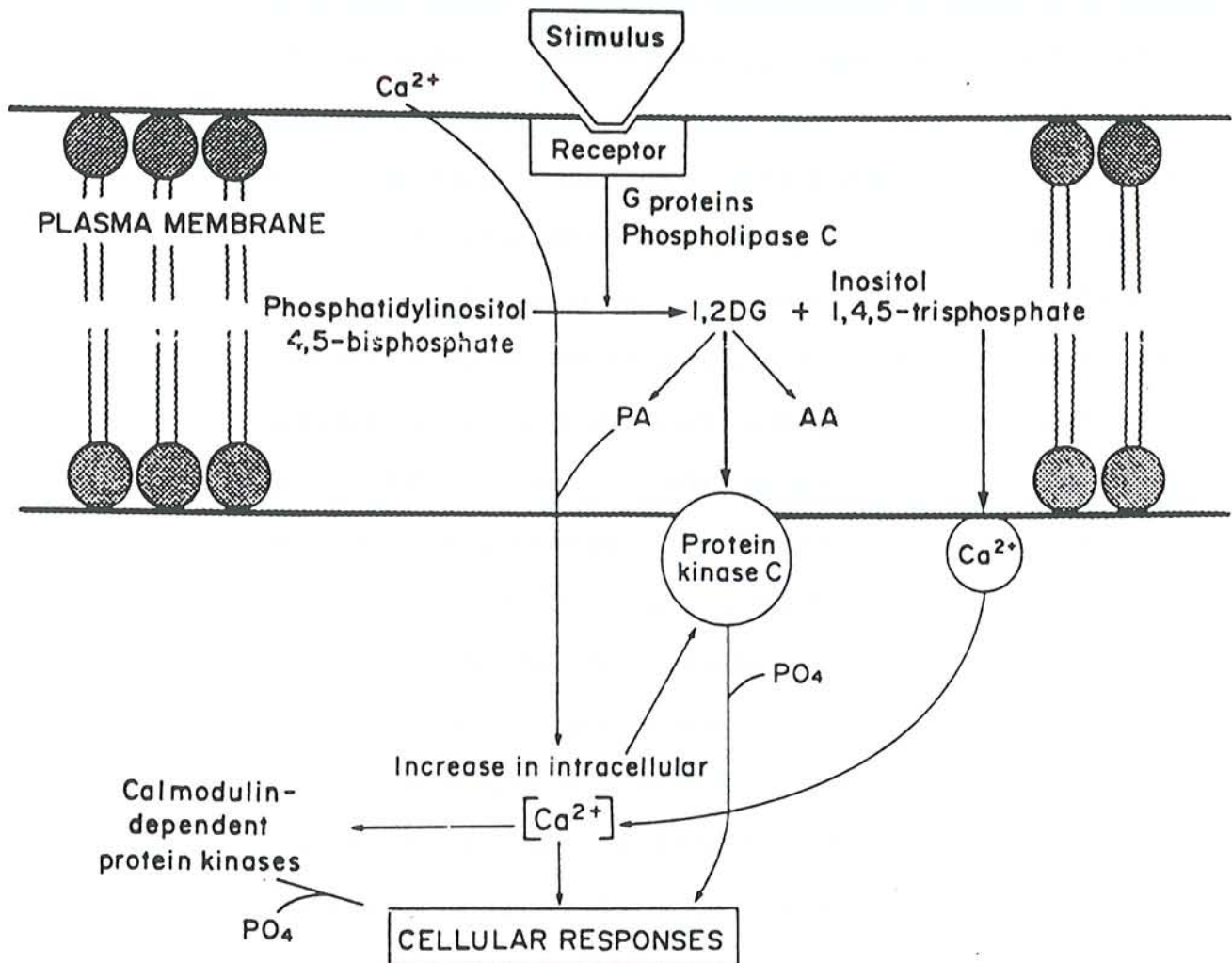
La stimulation du PN est également accompagnée du transfert de constituants à partir de sites de stockage intracellulaires vers la membrane du PN (translocation) (63,65). En particulier, le cytochrome b qui est probablement un composant de la NADPH oxydase, se trouve chez les PN non stimulés comme composant de la membrane des granules spécifiques (65). Après stimulation du PN, il est transféré vers la membrane du PN et vers la membrane du phagosome (65).

1.2.2.3.3.2.3. La NADPH oxydase.

L'explosion respiratoire associée à la phagocytose est essentiellement catalysée par la NADPH oxydase (65). Cette enzyme est un complexe de plusieurs enzymes, proche de celui trouvé au niveau des phosphorylations oxydatives mitochondriales (63,65). La structure exacte du complexe reste mal connue, en raison de son instabilité *in vitro* et de son état non-fonctionnel lorsque le PN est au repos (65).

Deux composants semblent probables: une flavoprotéine qui oxyde le NADPH, et un cytochrome qui joue le rôle de transporteur d'électrons du système (65).

Figure 27 : Modèle proposé pour le couplage stimulus-réponse, d'après Forehand et coll. (13).



PA : acide phosphatidique, AA : acide arachidonique, DG : diacylglycérol.

Sous certaines conditions expérimentales, l'activité NADPH oxydase des préparations cellulaires requiert le FAD (flavine adénine dinucléotide), et non le FMN (flavine mononucléotide) et la riboflavine (12,13,63,65). Le FAD retrouvé au niveau de la membrane est réduit par le NADPH en anaérobiose (65). Cependant, la flavoprotéine n'a pas été reconnue avec certitude (65). Un candidat possible serait un composé associé à la membrane de 66 kDa (65). Son affinité avec le 2',3' dialdéhyde dérivé du NADPH suggère une fonction de substrat, mais d'autres études repoussent son rôle catalytique (65).

Un cytochrome de type b, présent dans les cellules phagocytaires est maintenant reconnu comme composant de la NADPH oxydase (63,65). Dans sa forme réduite, le pic d'absorption se situe à 558 nm d'où son appellation de cytochrome b558 (63,65). Dans les cellules au repos, la plupart de ce cytochrome b558 est situé au niveau de la membrane des granules spécifiques (13,63,65). Une partie de ce cytochrome migre vers la membrane plasmique sous l'action de stimuli de fusion membranaire ou de dégranulation (13,63,65). Plusieurs faits expérimentaux sont en faveur de l'implication de ce cytochrome b558 dans la chaîne de transport d'électrons depuis le NADPH vers l'oxygène, probablement comme constituant terminal (65). Le cytochrome est constitué de deux sous-unités: une petite sous-unité alpha (peptide de poids moléculaire 22 kDa) et une grande sous-unité bêta (glycoprotéine de poids moléculaire 91 kDa) (65). Leur mode d'association reste mal connu (65). Chez certains des patients atteints de granulomatose chronique, un déficit en cytochrome b558 a été mis en évidence, qui semble en relation avec une absence des sous-unités alpha et bêta (défaut primaire de synthèse de la chaîne bêta, lié au chromosome X; et défaut de la stabilité d'expression de la chaîne alpha) (13,65).

La présence d'ubiquinone au niveau de la NADPH oxydase a été proposée, mais ce concept ne semble plus s'imposer à l'heure actuelle (63,65).

Les études expérimentales pour identifier les facteurs cytosoliques impliqués dans la NADPH oxydase furent basées sur l'existence d'une *guanosine*

triphosphate (GTP)-binding protein impliquée dans le processus de couplage (65).

Deux protéines de poids moléculaire 47 kDa (p47) et 67 kDa (p67) furent mises en évidence par *immunoblotting* après chromatographie d'affinité vis-à-vis du GTP sur gel d'agarose (65). Ces 2 protéines cytosoliques sont en relation avec la NADPH oxydase (65).

Le transfert d'électrons entre le NADPH, la flavoprotéine, le cytochrome et l'oxygène est résumé par la figure 28 (13).

Le phénotype de granulomatose chronique correspond à plusieurs génotypes différents, eux-mêmes liés avec des dysfonctionnements relatifs aux protéines p22, gp 91, p47 et p67, principalement. Ces données sont résumées par le tableau XII (65).

Les 2 peptides constituant le cytochrome b558, soit p22 (chaîne alpha) et gp 91 (chaîne bêta), sont situés dans la membrane plasmique (65). Le groupement hémique du cytochrome n'est pas forcément associé à la sous-unité p22, comme il est indiqué sur la figure 29 (65). Les composants cytosoliques p47 et p67 ont migré au niveau de la membrane où ils sont associés au cytochrome b (65). Une protéine kinase a phosphorylé p47 sur plusieurs sites, et ce phénomène favorise peut-être l'association à la membrane (5). Les fonctions du GTP et du Mg^{2+} restent mal connues, mais semblent être situées dans le cytosol (65). Le site de liaison du NADPH n'est pas connu (65). Les électrons sont transférés à des transporteurs proximaux: peut-être p47 et p67, au groupement hémique du cytochrome b et ensuite à l' O_2 (65). La flavoprotéine intervenant au niveau de la NADPH oxydase n'est pas connue (FAD ?) et n'est pas représentée sur ce schéma (65).

Un défaut au niveau des gènes codant pour les quatre protéines représentées sur ce schéma engendrera un défaut de synthèse de l'ion superoxyde et un phénotype de granulomatose chronique (13).

Ces données sont résumées dans la figure 29 (65).

Figure 28 : Fonctionnement simplifié de la NADPH oxydase, d'après Forehand et coll. (13).

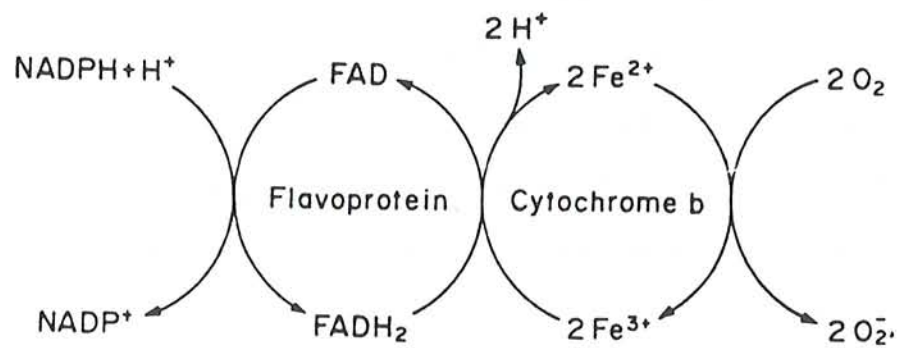


Tableau XII : Constituants de la NADPH oxydase et rapport avec la granulomatose chronique, d'après Forehand et coll. (13).

Composant déficient	Lésion	Transmission	Prévalence
p22	Membrane	Autosomale	5 %
gp91	Membrane	Liée au chromosome X	51 %
p47	Cytosol	Autosomale	33 %
p67	Cytosol	Autosomale	5 %
Flavoprotéine	Membranaire?	Liée au chromosome X?	6%

1.2.2.3.3.2.4. Fin de l'explosion respiratoire.

La durée de l'explosion est brève et dépend du stimulus : 2 à 3 minutes avec le FMLP, plus de 10 minutes avec le PMA ou des particules de zymosan (56).

La fin de l'explosion respiratoire pourrait résulter de l'inactivation de la NADPH oxydase par les systèmes bactéricides oxygène-dépendants ou oxygène-indépendants (56). Des faits expérimentaux montrent que le système MPO (myéloperoxydase) oxygène-dépendant inactive la NADPH oxydase (56).

1.2.2.3.3.2.5. Les mécanismes antioxydants.

Les produits de l'explosion respiratoire sont libérés dans le phagosome où ils participent à la destruction de la particule ingérée (13). La figure 30 illustre les voies métaboliques de l'explosion respiratoire et les enzymes impliquées (13). Comme les espèces oxygénées produites pourraient détruire les autres cellules circulantes, les tissus adjacents et le PN stimulé lui-même, il est capital que leur site de production soit limité au phagosome (12). Les PN possèdent un arsenal de mécanismes protecteurs pour neutraliser ces composés oxygénés "débordant" le processus bactéricide (12).

La superoxyde dismutase est une enzyme cytoplasmique (associée au cuivre et au zinc) et nucléaire (associée au manganèse), et qui est le principal "nettoyeur" de l'ion superoxyde (12,17,66). Cette enzyme catalyse la dismutation de deux molécules d' O_2^- en H_2O_2 et en O_2 (12,17,66). La céruloplasmine plasmatique pourrait avoir un effet similaire au niveau des sites inflammatoires (12).

Le glutathion est un tripeptide trouvé dans tous les tissus, et permet, en association avec la glutathion peroxydase, la transformation de l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (12,13,66).

Figure 29 : Représentation schématique de la NADPH oxydase : l'électron (e^-) provenant du NADPH est transféré à l'oxygène grâce à deux protéines cytoplasmiques p67 et p47 et au cytochrome b (Cyt b), d'après Clarck (65).

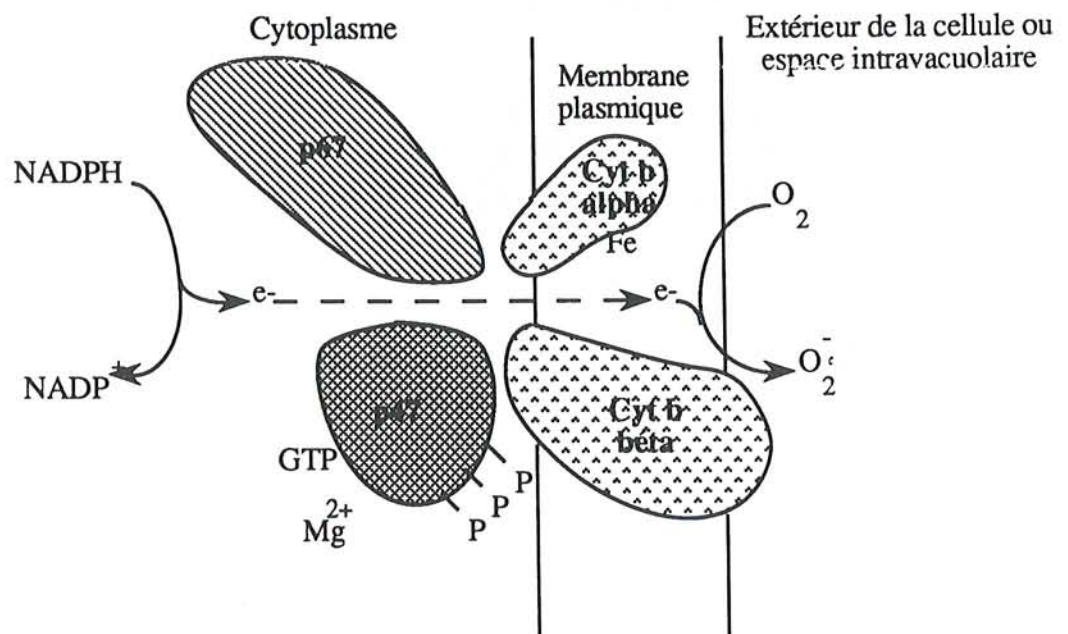
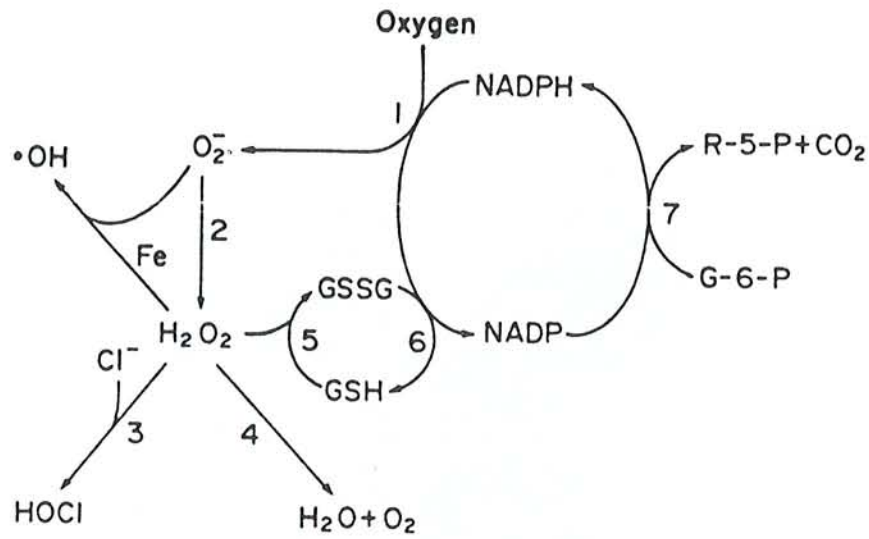


Figure 30 : Inactivation des produits générés par l'explosion oxydative, selon Forehand et coll. (13).



1 : NADPH oxydase, 2 : superoxyde dismutase, 3 : myéloperoxydase, 4 : catalase, 5 : glutathion peroxydase, 6 : glutathion réductase, 7 : glucose-6 phosphate déshydrogénase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, R-5 P : ribulose-5 phosphate.

La catalase permet la transformation enzymatique de l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (12,13,66).

La vitamine C peut se combiner aux radicaux libres et les neutraliser (12). Elle peut se combiner au radicaux de vitamine E et régénérer la vitamine E (effet de synergie) (12). La vitamine E peut aussi neutraliser des radicaux libres (12).

La taurine peut se combiner avec l'hypochlorite pour former une monochloramine taurine inactive (12).

1.2.2.3.3.3.Le système catalysé par la myéloperoxydase (MPO).

1.2.2.3.3.3.1.Localisation de la myéloperoxydase.

La MPO est localisée au niveau des granules primaires des PN, ainsi que dans les lysosomes des monocytes (63).

1.2.2.3.3.3.2.Structure de la MPO.

Chaque molécule de MPO (PM : 156 kDa) est composée d'un complexe de 2 hémi-MPO, qui conservent chacune l'activité de la MPO entière (63). Les hémi-MPO sont constituées d'une sous-unité alpha de 59 kDa et d'une sous-unité bêta de 13 kDa (63). Il y a 2 atomes de fer dans chaque molécule de MPO, qui sont liés à la sous-unité alpha (63). Des études par résonance de spin ont montré que la MPO comporte 2 sites de peroxydation, ce qui est compatible avec la notion de 2 hémi-MPO chacune douée d'activité enzymatique (63).

1.2.2.3.3.3.3.Fonctions de la MPO.

La destruction oxygène-indépendante des bactéries peut être effectuée par le système MPO (12,54,64). La stimulation du PN par la phagocytose va entraîner la libération du contenu des granules, ainsi que des produits de l'explosion respiratoire dans le phagosome et dans l'espace extracellulaire (12,54,63,64). La combinaison de la MPO, de l' H_2O_2 et d'ions halogénures (système MPO/ H_2O_2 / halogénure générera des acides hypohaliques (HClO , par exemple) et d'autres intermédiaires, responsables de l'effet bactéricide

(12,53,54,63,64). La MPO catalyse l'oxydation (par un transfert de 2 électrons) des halogénures Cl^- , I^- , Br^- (ainsi que du SCN^-) par l' H_2O_2 (66). L'oxydation du chlorure semble quantitativement la plus importante, probablement parce que celui-ci est l'anion cellulaire le plus abondant (63).

L'ensemble des réactions enzymatiques catalysées par le système MPO est résumé par la figure 31 (66).

La toxicité bactéricide de l'acide hypochlorique et des N-chloramines est bien connue et est illustrée par leur utilisation thérapeutique dans la liqueur de Dakin (63). Chez l'homme, le rôle physiologique de ces molécules apparaît moins net (63). En effet, le déficit en MPO ne s'accompagne que de peu de conséquences cliniques, mis à part une sensibilité exagérée aux infections à *Candida albicans* (63). Le mécanisme précis de l'effet bactéricide reste mal connu (12). Il comprendrait la destruction des systèmes de transport d'électrons, une réduction du *pool* des nucléotides adényliques et une oxydation de sites critiques porteurs de fer ou de groupes soufrés, au niveau de la bactérie (12,63,64,66).

La MPO influence aussi le processus inflammatoire à d'autres niveaux (63). Par exemple, le système MPO inactive plusieurs protéines importantes comme celles contenues dans les granules des PN, certains facteurs chimiotactiques et l'alpha-1 antitrypsine (63). De plus, le système MPO- H_2O_2 - halogénure diminue la liaison des peptides chimiotactiques à leurs récepteurs membranaires (63). Chacune de ces actions peut moduler l'intensité ou la durée de la réaction inflammatoire (63).

1.2.2.4. Le rôle du PN au niveau de la réaction inflammatoire (récapitulatif).

Le rôle du PN au niveau de la réaction inflammatoire est multiple, complexe et encore imparfaitement connu. Cette cellule est en rapport étroit avec d'autres éléments importants de la défense de l'organisme contre divers facteurs

agresseurs, comme les immunoglobulines et les facteurs du complément, par exemple. Le rôle du PN au niveau de la réaction inflammatoire est résumé par la figure 32 (17).

Figure 31 : Ensemble des réactions catalysées par la myéloperoxydase, d'après Forehand et coll. (13).

MPO

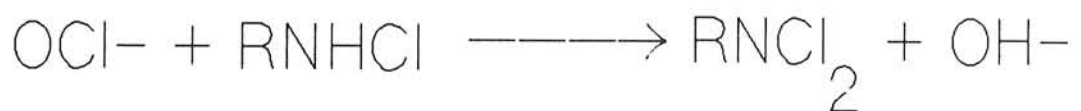
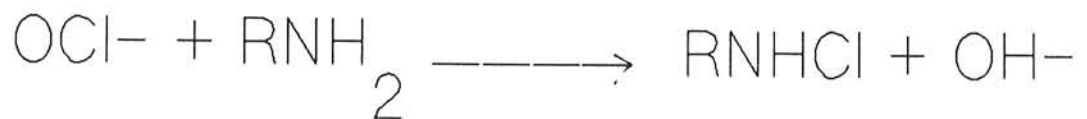
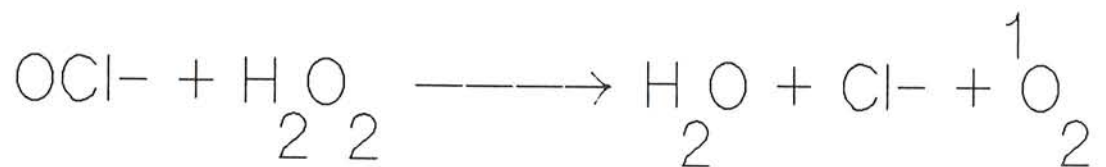
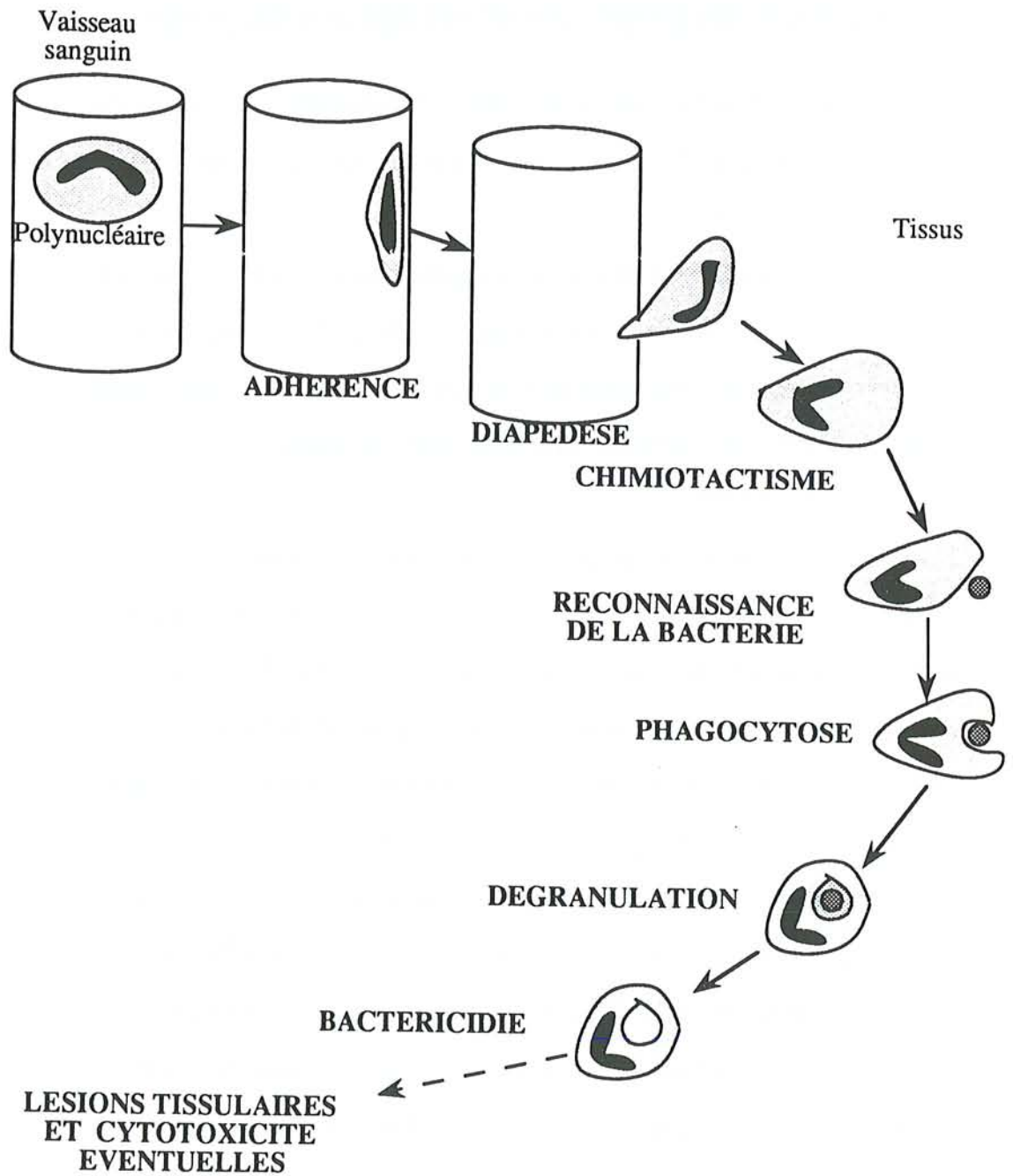


Figure 32 : Réponse du polynucléaire lors de la réaction inflammatoire, d'après Wolach et coll. (17).



1.3. Transfusion et conservation des PN.

1.3.1. Indications des concentrés de PN.

1.3.1.1. Les neutropénies et les agranulocytoses.

Les concentrés granulocytaires interviennent principalement au niveau de la stratégie thérapeutique des surinfections observées chez les patients atteints de neutropénie sévère (67-78).

La majorité des décès chez ces malades en aplasie ou en agranulocytose est liée aux infections bactériennes ou fongiques (10,12,79). Cliniquement, ces infections se révèlent sous différents tableaux : fièvre isolée, angine ulcéro-nécrotique, infections cutanées, foyers infectieux pulmonaires ou périrénaux, septicémie... (10,12,79).

En réalité, seule une faible proportion de sujets neutropéniques sont candidats à une transfusion de PN (69,80). Il faut en effet écarter de cette indication les patients granulopéniques asymptomatiques et les 80 à 85 % de patients surinfectés répondant correctement aux antibiotiques (67,69,73,76).

En fait, la transfusion de PN est de moins en moins utilisée et a été supplantée par d'autres armes thérapeutiques (69). Parmi celles-ci, l'apparition de chambres stériles sous flux laminaires et celle de nouveaux antibiotiques (céphalosporines de 3ème et 4ème générations, aminoglycosides, en particulier) ont bouleversé le pronostic et le traitement de ces affections (69).

Récemment, le traitement des neutropénies a pu bénéficier de l'apport des cytokines : G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) et GM-CSF (*granulocyte-monocyte-colony stimulating factor*), principalement (81-92).

Leur utilité a été démontrée dans plusieurs cas : neutropénies secondaires à l'utilisation d'analgésiques, d'antimitotiques, de pathologies tumorales, de radiations.... (81-92). Cependant, des réserves ont été émises concernant

l'administration thérapeutique des cytokines: inefficacité chez les patients dont la moelle a été aplasiée par des chimiothérapies répétées, danger de flambée de processus leucémiques, existence de tumeurs solides CSF-dépendantes, exacerbation de certains processus infectieux (sans relation avec l'effet des CSF sur les PN), en particulier (69,81).

Plusieurs paramètres laissent présager de l'inefficacité de l'antibiothérapie et suscitent l'utilisation de concentrés de PN (93):

- 1) bactériémie à gram négatifs.
- 2) sujets âgés affaiblis par d'autres maladies.
- 3) granulocytose inférieure à 100/ μ L
- 4) prévision d'une aplasie médullaire prolongée.

Ce traitement substitutif par des concentrés de PN est particulièrement recommandé pour deux types d'aplasies (67-78) :

- 1) les aplasies post polychimiothérapiques résultant des cures d'induction nécessaires pour la première rémission complète des leucémies aiguës. L'efficacité thérapeutique est inférieure lors des inductions suivantes, imposées par les rechutes éventuelles.
- 2) les aplasies induites par la chimiothérapie ou la radiothérapie utilisées pour le traitement des tumeurs solides : lymphomes hodgkiniens ou non hodgkiniens, tumeurs testiculaires, tumeurs du sein...

L'efficacité des transfusions de PN se juge cliniquement par la disparition de la fièvre, sur l'état général du patient et sur l'ascension du taux de globules blancs 1 h après transfusion (68,76).

Le succès thérapeutique dépend principalement de 3 facteurs (67,69,76,94,95):

- 1) la qualité fonctionnelle des PN prélevés (satisfaisant avec les séparateurs en flux discontinu).
- 2) la quantité suffisante de PN apportés au receveur. Une amélioration clinique peut être espérée si la polynucléose obtenue une heure après la transfusion dépasse 1000/ μ L. Comme la demi-vie des PN transfusés est très

courte (4 à 24 h) les transfusions doivent être répétées 1 ou 2 fois par jour. En général, pour un adulte de taille normale, on estime qu'il faut apporter un minimum de 2×10^{10} PN/m² de surface corporelle.

-3) la compatibilité immunologique : la présence d'isoanticorps dans le sérum du receveur est responsable d'une réduction de l'efficacité clinique, par diminution de la durée de vie intravasculaire des PN, par séquestration splénique et par altération de leurs capacités fonctionnelles. Les antigènes responsables sont ceux du système HLA et ceux spécifiques aux PN. L'immunisation du receveur dans ce type de transfusion est intense de par le large éventail de cellules transfusées: les PN mais aussi les cellules contaminantes (globules rouges, plaquettes, lymphocytes, monocytes). Le respect ou non de la compatibilité ABO ou Rhésus ne paraît pas modifier les résultats cliniques.

Le risque immunologique impose certaines précautions (74,79,96):

- 1) une recherche d'anticorps anti-leucoplaquettaires chez le receveur avant la transfusion et une quinzaine de jours après;
- 2) un cross match entre les lymphocytes du donneur et le sérum du receveur;
- 3) une vérification de l'adéquation du sérum du receveur vis-à-vis des PN du donneur. Les transfusions incompatibles dans le système antigénique granulocytaire exposent non seulement à une inefficacité thérapeutique, mais aussi à des réactions cliniques sévères chez le patient.

D'autres facteurs interviennent dans le pronostic final (80):

- 1) la numération plaquettaire chez le receveur : non effondrée, elle témoigne d'une activité médullaire résiduelle et diminue l'incidence des coagulations intravasculaires disséminées chez ces patients.
- 2) la probabilité d'une reprise de l'activité hématopoïétique médullaire, qui autoriserait alors l'arrêt des transfusions, même si le syndrome infectieux persiste.)

-3) la durée du traitement transfusionnel : au minimum 4 jours, au maximum 12 jours. Au delà, la poursuite conjointe de l'inactivité médullaire et de la surinfection ne peut plus laisser espérer un effet positif de cette thérapeutique.

1.3.1.2. Les pathologies fonctionnelles du PN.

D'autres indications sont également envisageables, telles les pathologies fonctionnelles des PN : la granulomatose chronique, en particulier (69).

1.3.1.3. Les utilisations comme bioréactif.

La migration de PN marqués à l'aide d'un isotope adéquat (certains isotopes de l'indium, par exemple) vers un foyer infectieux profond, difficilement décelable au point de vue clinique, permet de repérer celui-ci avec une grande sensibilité (69).

1.3.1.4. Autres utilisations des concentrés de PN.

L'utilisation des PN est également proposée par certains auteurs en cas d'avortements spontanés à répétition, mais ceci n'est pas admis par tous (97).

Selon certains auteurs, la transfusion de PN aurait un effet favorable sur le pronostic des septicémies chez le nouveau-né (98-103).

1.3.2. Les complications associées à la transfusion de PN.

1.3.2.1. Complications vis-à-vis du donneur.

1.3.2.1.1. Accidents liés au prélèvement.

1.3.2.1.1.1. Accidents locaux liés à la ponction.

Le simple fait de brancher le séparateur de cellules sur le réseau veineux du donneur peut engendrer certains problèmes tels des ruptures de veines, des hématomes, des douleurs au point de ponction, des spasmes veineux, des

saignements au point de ponction après le don, des thromboses veineuses (en cas de cytophèreses répétées)...(104,105).

1.3.2.1.1.2. Accidents généraux liés à la procédure.

Un syndrome vaso-vagal, lié à une stimulation du système parasympathique causée par l'émotion ou l'anxiété excessive du donneur peut être observé (104,105). Il peut aller jusqu'à une perte de connaissance avec hypotension (104,105). La mise du patient en position de Trendelenburg et l'administration d'atropine peuvent s'avérer nécessaires (104,105).

La circulation extracorporelle, obligatoire en cas de cytophèrese, diminue la volémie du donneur (104,105).

Le refroidissement de la température corporelle du donneur est lié à la circulation extracorporelle à température ambiante (104,105).

L'hypocalcémie est due à l'utilisation de citrate comme anticoagulant (104,105).

Une hémolyse de type mécanique (passage d'une suspension de globules rouges entraînée à grand débit à travers un orifice étroit) est parfois mise en évidence (104,105).

L'utilisation de gélatine fluide modifiée peut entraîner de rares cas d'allergie (prurit, érythème...) (104,105).

Un seul cas de décès a été décrit jusqu'à présent (rupture d'anévrisme cérébral) (104,105).

1.3.2.1.2. Accidents liés aux cytophèreses à répétition.

La cytophèrese est un acte médical invasif, non dénué de risques et qui doit être rigoureusement contrôlé. Les législations française et belge ne permettent que deux prélèvements par an (106). Si ce seuil est dépassé, divers effets secondaires peuvent être observés.

1.3.2.1.2.1.Perte de globules rouges.

La perte en globules rouges au cours d'une séance isolée de cytophérèse est faible : de l'ordre de 1.5 g/ dL d'hémoglobine circulante chez le donneur avec les séparateurs les plus récents (104,105). Par contre, des dons répétés de façon excessive pourraient engendrer une anémie chez le donneur (104,105).

1.3.2.1.2.2.Perte de plaquettes.

Elle est systématiquement observée chez le donneur, mais son intensité est très variable (104,105). Il est dès lors indispensable d'effectuer une numération plaquettaire avant le prélèvement (104,105).

1.3.2.1.2.3.Effet sur les leucocytes.

Les cytophérèses, même répétées, n'affectent pas la numération sanguine des PN, en raison de la courte demi-vie des PN et de la capacité énorme de la moelle à accroître son secteur de multiplication lorsque la demande périphérique en PN augmente (10,104).

Une cytophérèse isolée ne diminue pas notablement le taux de lymphocytes circulants, en raison d'une recirculation physiologique importante des lymphocytes à partir des gros vaisseaux lymphatiques (107-109). Par contre, des cytophérèses répétées peuvent engendrer une immunodépression (107-109). Il existe en effet un risque de lymphopénie par amoindrissement du pool de lymphocytes recirculants (107-109). C'est surtout la lignée T qui est lésée, principalement en raison de la longue demi-vie de ces cellules (de quelques mois à quelques années) (107-109).

1.3.2.1.2.4.Effet des cytophérèses sur le système du complément.

Durant une séance de cytophérèse, des variations notables du taux des facteurs du complément ont été mises en évidence chez le donneur: 1) une diminution de C1, C2, B et C3q; 2) un taux inchangé de C4, properdine et properdine convertase; 3) une augmentation modérée de C3 (110). La cause vraisemblable

de ces perturbations réside dans l'adsorption passive de ces protéines sur les surfaces artificielles du séparateur de cellules (110). Toutefois une activation des voies du complément (comme pour les séparations par filtration) ne peut être écartée (110).

1.3.2.1.2.5.Effets des cytophères sur les facteurs de coagulation.

On observe une baisse sélective des facteurs de coagulation V, VIII et du fibrinogène (104,105). Les taux de facteur XI et de l'antithrombine III restent inchangés (104,105). C'est l'adhérence de ces facteurs aux surfaces artificielles du séparateur qui provoque une diminution de ces taux; et non un processus de coagulation intravasculaire disséminée (taux de produits de la dégradation de la fibrine et de monomères de fibrine normaux) (104,105).

1.3.2.1.2.6.Effet sur le bilan hépatique.

Une augmentation transitoire du taux des transaminases ASAT(aspartate amino transférase) et ALAT (alanine aminotransférase) peut être observée (111).

1.3.2.1.2.7.Effet sur le métabolisme calcique.

Au niveau sanguin, une baisse du taux de calcium ionisé, de calcium total, de calcium lié aux protéines, des phosphates, avec augmentation parallèle de la parathormone a été décrite (112). Ces phénomènes sont en rapport avec l'utilisation de composés citratés utilisés comme anticoagulant (112).

1.3.2.2.Complications observées chez le receveur.

1.3.2.2.1.Les immunisations.

Les transfusions de PN sont susceptibles d'être à l'origine de complications immunologiques dont le degré de gravité peut être très variable (68,78,104,105,113-116). En pratique, pour limiter les phénomènes d'immunisation, les donneurs sont de préférence choisis dans la famille du receveur (104,105,113,114). En général, les leucoagglutinines sont

responsables de complications plus graves que celles induites par les incompatibilités HLA spécifiques entre donneur et receveur (96).

L'ordre chronologique d'apparition de ces effets secondaires permet de les classer en 2 groupes : les complications tardives et les complications précoces (96).

1.3.2.2.1.1. Les complications précoces.

Différentes manifestations peuvent être observées (96,104,105,117-119) :

- 1) les éruptions et les prurits, qui peuvent s'observer lors de toute transfusion;
- 2) les réactions de type frissons-hyperthermie, qui sont dues à une cytolysé leucocytaire. Cet effet secondaire peut être atténué par l'administration d'antihistaminiques et de corticoïdes;
- 3) le syndrome respiratoire aigu qui se manifeste par la toux, la dyspnée, la cyanose du visage, l'hypotension, voire un véritable collapsus. Il témoigne de la présence de leucoagglutinines. L'arrêt de la transfusion et l'injection de corticoïdes sont impératifs pour sauver le patient. L'administration simultanée d'amphotéricine B et de PN peut provoquer des détresses respiratoires secondaires à l'agrégation des leucocytes. Ce phénomène n'est pas admis par tous les auteurs;
- 4) le collapsus avec anurie irréversible. Cet accident grave, mais rare, est provoqué par les lésions vasculaires et tissulaires dues à l'apport massif de leucocytes avec libération massive de leur contenu;
- 5) des réactions hémolytiques ont également été observées.

1.3.2.2.1.2. Les complications tardives.

Rarement, il a pu être observé (96,104,105,120):

- 1) une réaction du greffon contre l'hôte, parfois mortelle. Le facteur responsable majeur est la quantité de leucocytes injectée. Il est dès lors recommandé de ne pas dépasser la dose conseillée. Le risque peut être écarté par l'irradiation des poches à 1500 rads;

2) le syndrome mononucléosique observé 10 jours après la transfusion, qui témoigne alors d'un conflit immunologique. Il faut le distinguer de celui qui pourrait survenir après 3 semaines environ, et qui serait lié à la transmission d'une maladie virale;

3) la transmission de maladies infectieuses : hépatites virales, syndrome d'immunodéficience acquis, infection à cytomégalo virus, toxoplasmose... En pratique, le problème est proche de celui lié à la transfusion d'érythrocytes ou de sang total et les agents pathogènes incriminés dans ce cadre pourraient donc concerner également la transfusion de globules blancs.

1.3.2.3. Conclusion.

La transfusion de globules blancs n'est pas un acte médical anodin. De nombreux incidents (ou accidents) peuvent théoriquement se produire, aussi bien chez le donneur que chez le receveur, et un respect strict des règles d'utilisation de cette technique doit donc être observé.

1.3.3.La conservation des PN.

1.3.3.1.Intérêt de la conservation des PN.

L'actuelle impossibilité de conserver les concentrés de PN au-delà de quelques heures limite leur utilisation en entraînant les inconvénients suivants (69) :

- 1) l'impossibilité de répondre sans délai aux demandes thérapeutiques urgentes. En pratique, le laps de temps séparant la demande et l'acte transfusionnel avoisine les 24 h (choix et convocation du donneur, cytophérèse, transfusion);
- 2) l'impossibilité de transfuser en respectant une réelle compatibilité HLA, ce qui explique les phénomènes d'iso-immunisation observés. En pratique, les donneurs sont souvent choisis dans la famille des patients.
- 3) l'absence de souplesse des centres de transfusion vis-à-vis des donneurs pour lesquels la convocation ne peut que rarement être programmée.

La possibilité de conserver les concentrés granulocytaires, même quelques jours seulement, aurait les conséquences suivantes (69):

- 4) une meilleure programmation transfusionnelle pour les malades neutropéniques (durant les week-ends, principalement);
- 5) une amélioration de la compatibilité immunologique transfusionnelle;
- 6) une souplesse accrue dans le recrutement des donneurs et dans l'organisation des services de cytophérèse (surtout lors des gardes).

1.3.3.2.Etapes intervenant dans la conservation des PN.

L'analyse des données concernant la conservation des leucocytes doit tenir compte de toutes les étapes relatives à cette technique, à savoir (69):

- 1) le choix des donneurs;
- 2) les méthodes de séparation des PN (y compris la prémédication des donneurs);
- 3) les méthodes de conservation proprement dites.

1.3.3.3.La sélection des donneurs.

Les donneurs sont sélectionnés selon les normes nationales relatives à ce type de don (106). Le plus souvent, les leucocytes sont obtenus par ponction veineuse (phlébotomie) ou par cytaphérèse et par conséquent, les critères de sélection sont ceux relatifs à ce type de prélèvement (106).

Actuellement, les leucocytes sont prélevés chez des adultes sains (106). Dans le passé, des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC), en raison du taux très élevé de polynucléaires sanguins accompagnant cette maladie ont été utilisés comme donneurs (122,123). L'innocuité et l'efficacité de cette procédure n'ont pas été clairement démontrés; elle a donc été abandonnée (123). D'autre part, les rendements actuels des cytaphérèses (concentration en PN supérieure à 10^{10} / L ne justifient plus le choix de donneurs atteints de LMC (78).

Pour les donneurs adultes sains, aucun des auteurs de la littérature examinée ne mentionne de choix particulier comme l'âge, le sexe, la race...

1.3.3.4.Les méthodes de prélèvement des donneurs.

1.3.3.4.1.La ponction veineuse (phlébotomie).

Ce prélèvement peut être réalisé facilement et à faible coût (67). Il n'altère pas les fonctions des PN (67). Ce prélèvement est fréquemment utilisé pour les études de conservation expérimentales (124,125). Son principal désavantage réside dans la faible quantité de PN disponible par rapport aux cytaphérèses (67,124,125).

1.3.3.4.2. La cytaphérèse.

1.3.3.4.2.1. Introduction.

Le prélèvement des PN par cette technique pose un certain nombre de problèmes (126) :

- 1) la faible concentration en PN dans le sang du donneur (1500 à 7000/ μL , environ) par rapport aux concentrations thérapeutiques à obtenir au niveau des poches;
- 2) l'importance du pool de PN marginés, c'est-à-dire adhérent à l'endothélium vasculaire et qu'il faudra mobiliser pour augmenter le rendement de la cytaphérèse;
- 3) la densité très voisine des PN par rapport aux érythrocytes;
- 4) une demi-vie très courte des PN, qui ne dépasse pas 14 h dans la circulation du receveur, avec comme conséquence la nécessité de transfusions répétées;
- 5) la nécessité de recueillir un nombre considérable de PN pour obtenir un résultat efficace au niveau de la protection contre les infections: apport itératif de 5 à 10^{10} PN et nécessité d'atteindre une numération minimale de 1000 PN/ μL ;
- 6) impossibilité de conserver les PN au-delà de quelques heures et donc nécessité d'obtenir un prélèvement quasi immédiatement avant la transfusion.

L'ensemble de ces problèmes fut en partie résolu par l'augmentation des performances techniques des séparateurs (centrifugation en flux continu) et par l'utilisation des glucocorticoïdes et des macromolécules dans la procédure de prélèvement pour obtenir des concentrés suffisamment riches en PN (126).

1.3.3.4.2.2. La prémédication aux glucocorticoïdes.

Ce sont les glucocorticoïdes qui sont les plus efficaces dans ce cadre, et qui présentent le moins d'effets secondaires (123,127). Il est néanmoins indispensable de respecter leurs contre-indications habituelles (qui sont

normalement respectées puisque le prélèvement est effectué chez un donneur sain): hypertension artérielle sévère, tuberculose évolutive, diabète, ulcère digestif haut, psychopathie aiguë (127).

Ils agissent par 3 mécanismes différents (10) :

- 1) la mobilisation des PN stockés à l'étage médullaire;
- 2) la diminution du pool marginé;
- 3) la réduction de la diapédèse.

Il faut noter que l'efficacité de la prémédication aux glucocorticoïdes est d'autant plus grande que la polynucléose initiale du donneur est faible (128).

A la polynucléose, est associée une lymphopénie intéressante: le prélèvement est alors moins immunogène (123,128).

Dans le cadre de la prémédication, la dexaméthasone est la plus souvent utilisée; dans une moindre mesure l'hydrocortisone et la prednisone (67).

Les protocoles d'administration sont très variés, mais aucun d'entre eux n'a réellement prouvé sa supériorité.

Le plus souvent, la dexaméthasone est administrée *per os* à la dose unique de 4 mg/ kg, 12 h avant le prélèvement (129-131). L'hydrocortisone peut être administrée par voie intraveineuse (IV) à la dose de 200 mg, 2 h avant le prélèvement (67); la prednisone, *per os* à la dose de 40 mg, 12 h avant le prélèvement (132).

Des protocoles d'administration fractionnée de ces 3 glucocorticoïdes ont également été décrits (131).

Au niveau du centre régional de transfusion sanguine (CRTS) de Nancy, 4 x 3 comprimés de 0.5 mg d'acétate de dexaméthasone (Dectancyl^R, Roussel, France) sont pris *per os* 12 h avant le don; suivis de 200 mg d'hydrocortisone en IV en début de cytophérèse et de 200 mg en IV après 4.5 L de sang traité.

L'augmentation du rendement observée avec l'utilisation de glucocorticoïdes est très nette: 30 à 50%; elle dépend aussi du type de séparateur de cellules utilisé (129-131).

Les glucocorticoïdes ne perturbent pas de façon significative les fonctions des PN, en particulier la phagocytose et la bactéricidie (123, 129, 133, 134).

Pour le donneur, et aux doses préconisées, les effets secondaires peuvent être considérés comme négligeables si les contre-indications sont respectées (129-131).

Les glucocorticoïdes n'ont toutefois aucune action sur la contamination érythro-plaquettaire du prélèvement de PN, ou sur la quantité d'anticoagulant nécessaire (135).

La concentration résiduelle en corticoïdes au niveau des poches de transfusion n'a pas été mesurée, à notre connaissance.

1.3.3.4.2.3. Les macromolécules.

Elles sont ajoutées en continu au sang du donneur avant son entrée dans le site de centrifugation (136-141). Leur mécanisme d'action réside dans une augmentation de la vitesse de sédimentation des globules rouges, avec formation de rouleaux d'hématies (137,138). Ce phénomène augmente la démarcation entre la couche leucocytaire et la couche érythrocytaire et par conséquent le rendement et la sélectivité de la cytophérèse (137,138).

D'autres conséquences favorables sont également observées, comme la décroissance de la déperdition en hémoglobine du donneur ainsi qu'une moindre exposition du receveur aux antigènes érythrocytaires du donneur (139).

Plusieurs variétés de macromolécules ont été testées : le fibrinogène, les gammaglobulines, les dextrans, l'hydroxyéthylamidon (*hydroxyethylstarch* ou HES) et la gélatine fluide modifiée (Leukogel^R, Plasmion^R, Plasmagel^R) (75,76,139-141).

Seuls l'HES et la gélatine sont encore employés aujourd'hui; les autres groupes ayant été abandonnés en raison de leur antigénicité trop importante (138-141).

1.3.3.4.2.3.1.L'hydroxyéthylamidon (HES).

Il s'agit d'une macromolécule de haut poids moléculaire (45 kDa), présentée en flacon de 500 ml d'une solution à 6 % (136,137). Cette solution est utilisée depuis 20 ans aux USA mais n'est pas homologuée en France (136).

Les avantages de l'HES sont principalement son absence de toxicité et sa faible immunogénicité (136,137).

Le désavantage majeur résulte d'une demi-vie d'élimination particulièrement longue accompagnée d'une accumulation du produit au niveau du système réticulo-endothélial: l'HES est toujours détectable jusqu'à un an après son injection dans l'organisme (136,137).

Le poids moléculaire élevé de l'HES peut être à l'origine d'une augmentation du volume plasmatique accompagnée de symptômes d'hypervolémie (oedèmes, céphalées...) (136,137).

Enfin, de rares cas de réactions cutanées et même de choc anaphylactique ont été signalés (137).

Dès lors, des analogues de l'HES présentant un plus faible poids moléculaire et donc une élimination plus rapide, ont été proposés (138,139).

1.3.3.4.2.3.2.La gélatine fluide modifiée.

Dans le cadre des cytophèreses, 3 spécialités sont utilisées : le Leukogel^R (USA), le Plasmion^R (Laboratoire Roger Bellon, France) et le Plasmagel^R (Laboratoires Roger Bellon, France) (140-142).

Elles contiennent toutes trois 15 g de gélatine, mais diluée dans 500 ml de solution électrolytique différente (141). Son poids moléculaire est compris entre 30 et 40 kDa (140).

Les gélatines présentent l'avantage majeur par rapport à l'HES d'avoir une demi-vie beaucoup plus courte (7.5 h); elles ne sont plus détectables au bout de 3 jours lorsqu'il dose unique de 500 mL est administrée (139-141).

La gélatine est un produit de toxicité négligeable, n'interférant pas avec l'hémostase (y compris les plaquettes), les fonctions hépatiques et rénales (y compris l'équilibre hydro-électrolytique) (142).

Les fonctions leucocytaires restent intactes (mobilité, phagocytose, bactéricidie) (142).

Les phénomènes d'hypervolémie et de réactions allergiques sont beaucoup plus rares qu'avec l'HES (142).

En ce qui concerne les désavantages, les performances, bien que correctes, sont toutefois inférieures à celles de l'HES, surtout pour les séparateurs à flux continu (139,142).

Les capacités d'augmentation de la vitesse de sédimentation des gélatines sont majorés par l'utilisation concomitante d'héparine (142).

1.3.3.4.2.4. Les anticoagulants.

L'établissement d'une hypocoagulabilité correcte dans les circuits extracorporels d'un séparateur de leucocytes est capital (69). Dans ce domaine, l'anticoagulant de choix et d'ailleurs de loin le plus utilisé, est l'héparine (69).

L'héparine utilisée est un mucopolysaccharide de PM 12 kDa (environ) et dont la demi-vie est de 2 h (3). Son mécanisme d'action repose sur l'augmentation de la vitesse de neutralisation de la thrombine par l'antithrombine III qui est l'inhibiteur spécifique de la thrombine (3). L'héparine existe sous la forme de sel sodique ou calcique (3).

En cas de surdosage en héparine, entraînant une hypocoagulabilité exagérée chez le donneur, l'injection de sulfate de protamine (1 unité pour une unité d'héparine) permet de neutraliser rapidement celle-ci (3,10).

De nombreux protocoles expérimentaux ont été proposés pour l'emploi de l'héparine en cas de cytophérèse (3,10,143,144) :

- 1) la perfusion d'héparine en continu durant toute la cytophérèse; soit à débit fixe (10000 à 20000 UI au total), soit à débit dégressif.

- 2) l'injection discontinue d'héparine (2000 UI toutes les heures).
- 3) l'injection initiale juste avant la cytophérèse (par exemple 17000 UI), suivi d'une injection de 5000 UI une heure après.

D'autres procédures, moins courantes, associant l'héparine à un composé citraté tel l'ACD (adénine-citrate-dextrose), ont été recommandées (79).

L'utilisation d'ACD seul, ou de CPD (citrate-phosphate-dextrose) a aussi été rapportée (145).

1.3.3.4.2.5. Les techniques de séparation par centrifugation.

1.3.3.4.2.5.1. Introduction.

Depuis 1970, différents types de séparateurs ont vu le jour. A l'heure actuelle, seuls les séparateurs utilisant la centrifugation comme principe de fonctionnement restent d'actualité et ce sont eux que nous décrirons principalement.

Nous rappellerons brièvement le principe et le fonctionnement des séparateurs par filtration et par élutriation.

1.3.3.4.2.5.2. Principe de la centrifugation.

La principale technique de cytophérèse (isolation de plasma ou de cellules) repose sur le principe de la centrifugation. Les cellules sanguines (globules rouges, globules blancs, plaquettes) possèdent des densités différentes et donc des vitesses de sédimentation différentes, selon la loi de Stokes (146).

Le facteur g (accélération due à la gravité) peut être modifié par le phénomène de centrifugation qui facilite la séparation d'éléments de densité différente en substituant au champ de la pesanteur verticale un champ centrifuge radial (147). Pour ce faire, la suspension est placée dans un appareil à grande vitesse rotatoire; elle est soumise ainsi à une force centrifuge F obéissant à l'équation : $F = M w^2 r$, où M est la masse de la particule, r la distance à l'axe de rotation et w^2 le carré de la vitesse angulaire (146). La vitesse de rotation de l'appareil permet la séparation des globules rouges (couche externe), des leucocytes

(couche intermédiaire) et du plasma (couche centrale). Il faut noter que les essais de refroidissement du sang avant passage sur centrifugeuse afin d'augmenter le taux de PN dans les concentrés n'ont donné aucun résultat (148,149).

1.3.3.4.2.5.3. Centrifugation en flux continu et en flux discontinu.

Il existe 2 grandes familles d'appareils selon le mode de centrifugation.

Pour la centrifugation à débit séquentiel, le sang est fractionné à partir de plusieurs unités prélevées successivement chez un même donneur (cycles discontinus, bol par bol) (150-154). La phase de prélèvement sanguin et celle de réinfusion du sang épuré ne sont donc pas concomitantes (150-154). La ponction d'une seule veine est suffisante, mais la procédure est longue (67). L'appareil le plus utilisé dans ce domaine est l'Haemonetics 30 (Haemonetics, USA) (67,150,151).

Pour la centrifugation à débit continu, le sang est fractionné dès son arrivée dans le système centrifugeur (143,144,147,151,154). Le prélèvement et la restitution sont alors simultanés (151). La ponction antécubitale bilatérale est indispensable (151).

Le tableau XIII résume la classification des séparateurs selon le type de débit, la marque, le modèle et l'année de fabrication (146).

Tous ces appareils sont constitués des éléments de base communs suivants: le bloc de centrifugation, les pompes et la présence d'une console de commande (146). Il faut noter que tous ces organes possèdent des spécificités propres à chaque modèle (146).

1.3.3.4.2.6. Les méthodes de séparation par filtration.

Les méthodes, désormais historiques, de séparation par filtration en flux continu utilisaient comme principe l'adhésion réversible des PN à des fibres de nylon (69,156-158). Les automates les plus employés étaient le Fenwall leukapheresis pump (Fenwal, USA) et le Leukopak system (Leukopak, USA)

Tableau XIII : Classification des séparateurs en flux continu, d'après Thomas (146).

Type	Marque	Modèle	Année d'apparition
Flux discontinu	Haemonetics	H 30	1973
	Haemonetics	V 50	1980
	Haemonetics	V 50 + Surge	1983
Flux discontinu	IBM Biomedical	IBM 2997	1977
	Fenwal	CS 3000	1979
	Dideco	Vivacell	1984
	Cobe	Spectra	1988
	Fresenius		1989

(69,156-158). Avant la cytophérèse, les donneurs recevaient un anticoagulant, habituellement le citrate (156). Le prélèvement durait environ 3 heures (157). Les PN étaient ensuite élués des fibres de nylon par un mélange d'ACD (adénine-citrate-dextrose) et de NaCl 0.9%, dans la plupart des cas (158). Le concentré avait un volume final de 300 mL (157,158). Les cellules étaient alors remises en suspension dans un mélange ACD/NaCl 0.9% (156,158). Cette technique possédait un bon rendement, supérieur à 10^{11} PN/ L (69). La contamination érythro-plaquettaire était plus faible que celle observée avec les méthodes par centrifugation (69).

Avec les méthodes par filtration, une activation du complément (principalement la voie alterne) pendant et après la cytophérèse était observée (159).

Les méthodes par filtration entraînaient des altérations importantes des PN aussi bien morphologiques que fonctionnelles (159).

Les altérations morphologiques peuvent être observées aussi bien en microscopie optique qu'en microscopie électronique: chromatine anormale, vacuoles cytoplasmiques, expansions cytoplasmiques, distribution anormale des granules...(160). La plupart des PN (plus de 60 % en microscopie électronique) étaient altérés (160).

Au niveau fonctionnel, les altérations concernaient la bactéricidie, le chimiotactisme, la phagocytose et la consommation d'oxygène (159). Tous ces problèmes entraînèrent l'abandon de cette procédure.

1.3.3.4.2.7. Les méthodes de séparation par élutriation.

Cette méthode n'est plus utilisée actuellement dans le cadre des cytophèreses de leucocytes (69). Le principe de séparation consistait à exercer une force centrifuge aux cellules à séparer (69). Dans un même temps, un flux liquide centripète équilibrait la force centrifuge (69). La vitesse de centrifugation était choisie de façon à éliminer les cellules indésirables (69). L'équipement le plus

employé de ce type était le Beckmann SE-6 rotor (Beckmann, USA), qui pouvait utiliser du sang total ou des leucoconcentrés comme source de PN (161-164). Le rendement des séparateurs par élutriation était bon, de l'ordre de 10^{11} PN/ L (69,163). La contamination érythro-plaquettaires était notable (69). Des résultats intéressants ont été observés avec le couplage d'un système de séparation par centrifugation en flux continu avec un système d'élutriation, mais ils n'ont pas été confirmés par la suite (163).

1.3.3.4.2.8.Comparaison des différentes techniques de cytophérèse.

Elle est résumée par le tableau XIV (69).

1.3.3.4.2.9.Contenu d'un concentré de PN.

Le tableau XV met en évidence, à titre indicatif, la contamination massive en érythrocytes, en plaquettes et en leucocytes mononucléés (146).

1.3.3.5.Les méthodes de conservation des PN.

1.3.3.5.1.Introduction.

La conservation des PN doit prendre en considération toutes les étapes impliquées dans l'obtention de ceux-ci, à savoir la prémédication et la sélection des donneurs, les méthodes de séparation des cellules et la conservation des PN proprement dite (69). Les données relatives à la production des concentrés de PN ont été traitées dans les chapitres précédents, seules les conservations de PN seront abordées ici.

Nous ferons d'abord l'inventaire des méthodes utilisées pour évaluer les capacités fonctionnelles et l'intégrité structurelle des PN conservés. Nous détaillerons ensuite les deux grands groupes de méthodes de conservation : les conservations en milieu liquide et les cryoconservations.

Tableau XIV : Comparaison des différentes techniques de cytophérèse, d'après Verstraeten et coll. (69).

	Centrifugation continue	Centrifugation discontinue	Filtration	Elutriation
Rendement	Elevé	Moyen	Elevé	Moyen
Contamina- tion érythro- plaquettaire	Massive	Massive	Modérée	Moyenne
Hydroxy- éthylamidon	Oui	Oui	Non	Non
Altération des granulocytes	Modérée	Modérée	Massive	Modérée

*Tableau XV : Composition d'un concentré
leucocytaire, d'après Thomas (146).*

Contenu cellulaire d'une poche Prélèvement avec l'automate CS 3000 (146)

Nombre de leucocyte (10^{10})	2.69
-----------------------------------	------

Nombre de granulocytes (10^{10})	2.20
--------------------------------------	------

Nombre de plaquettes (10^{11})	3.98
------------------------------------	------

Hémoglobine (g/ dL)	4.1
---------------------	-----

1.3.3.5.2. Evaluation des capacités fonctionnelles des PN conservés.

De très nombreux paramètres ont été utilisés comme critère de bonne conservation (69). Le paramètre idéal devrait être altéré de façon sensible et précoce lors de la conservation des PN (sensibilité) (69). Il devrait mettre en évidence des lésions spécifiquement associées à la conservation (spécificité) (69). En outre, ce paramètre devrait pouvoir être déterminé de façon fiable (exactitude et précision de la méthode), aisée et peu coûteuse (69). Le tableau XVI (69) regroupe les principaux paramètres utilisés comme critères de bonne conservation. La multiplicité des paramètres proposés traduit en fait la difficulté d'évaluer correctement les capacités fonctionnelles des PN (69). La plupart des auteurs ne se fient donc pas à un critère de conservation unique, mais plutôt à une série de tests, les plus complémentaires possibles (69).

1.3.3.5.3. Les conservations en milieu liquide.

Elles présentent les meilleures performances à l'heure actuelle, mais aucune solution satisfaisante ne s'est globalement imposée jusqu'ici; en tout cas pour des conservations dépassant 24 h (165-173). Néanmoins, des données très importantes ont pu être dégagées de la littérature.

1.3.3.5.3.1. Contamination érythro-plaquettaire.

La contamination par les globules rouges et les plaquettes (surtout) est nuisible pour la conservation des PN en accélérant l'agrégation leucocytaire, la libération du contenu granulaire des PN, ainsi qu'en altérant leur chimiotactisme (174,175). Des interactions plaquettes-PN faisant intervenir certaines lipoxgénases plaquettaires et le PF₄ ont été décrites (176,178). Les séparateurs de cellules devraient donc avoir un rendement qualitativement important (dose suffisante de PN administrée), mais également une pureté maximale en PN (69). Ceci est loin d'être le cas actuellement et il

Tableau XVI : Techniques utilisées pour évaluer les capacités fonctionnelles des polynucléaires, d'après Verstraeten et coll. (69).

Fonctions des granulocytes	Méthodes utilisées
Numération cellulaire	Coulter counter
Volume cellulaire	Coulter counter
Morphologie cellulaire	Microscopie optique ou électronique
Viabilité	Bleu trypan, éosine...
Pouvoir bactéricide	Staphylocoque, Escherichia coli...
Phagocytose	Bactéries, particules de latex...
Consommation d'oxygène	Electrode de Clark
Adhésivité	Surface de verre
Réduction du nitrobleu de tétrazolium	Cytochimie, spectrophotométrie
Production d'anion superoxyde	Réduction du cytochrome C...
Chimiotactisme	Migration sous agarose, chambre de Boyden...
Adénosine triphosphate intragranulocytaire	Méthodes luminométriques...
Enzymes intragranulocytaires	Méthodes spectrophotométriques...
Affinité pour les peptides chimiotactiques	Méthodes isotopiques...

serait plus adéquat de parler de sang total enrichi en leucocytes que de concentré leucocytaire (69).

1.3.3.5.3.2. Concentration en PN.

Les meilleures conservations sont observées pour des concentrations faibles en PN (de l'ordre de $5 \cdot 10^6$ /L), ce qui va à l'encontre des objectifs thérapeutiques (69,167,169,170,172). De plus hautes concentrations en PN (de l'ordre de 10 fois plus, comme observé au niveau des concentrés de PN) entraînent une production plus élevée d'acide lactique par la glycolyse anaérobie des PN, et donc une chute de pH, préjudiciable au maintien des fonctions des PN (69,167,169,170,172). En outre, les PN vont alors d'autant plus utiliser les additifs de conservation (glucose,...) et donc modifier les conditions de conservation présentes au départ (174).

1.3.3.5.3.3. Récipient utilisé pour la conservation.

La sélection du matériau utilisé pour le récipient en vue de la conservation des PN n'est pas sans importance. Le chlorure de polyvinyle donnerait de meilleurs résultats que les polyoléfines et le polypropylène pour le maintien de la viabilité et de la phagocytose des PN (179,180).

Le relargage de plastifiants dans le milieu de conservation altère le chimiotactisme et la bactéricidie des PN conservés 24 h à 22°C (181).

1.3.3.5.3.4. Anticoagulant utilisé.

Le sang prélevé sur ACD permettrait un meilleur maintien du test de réduction du NBT que celui prélevé sur CPD et sur héparine (69,182).

1.3.3.5.3.5. Agitation du milieu de conservation.

L'agitation des concentrés de PN n'est pas recommandée durant la conservation de ceux-ci (notamment pour le maintien du chimiotactisme); à l'inverse de la conservation des concentrés plaquettaires où une agitation "douce" (agitateur

rotatif à faible vitesse de rotation) est indispensable pour éviter l'agrégation de celles-ci (10,69,183). Au contraire, l'agitation des concentrés de sang total utilisés pour préparer des suspensions de PN semble conseillée (183). L'effet de l'agitation sur la conservation des PN peut être apprécié par la libération de certains constituants granulaires dans le milieu de conservation (lysozyme, bêta-glucuronidase...) (184,185,186).

1.3.3.5.3.6.pH du milieu de conservation.

Il s'agit peut-être du critère de bonne conservation le plus important (69). Le pH optimum de conservation est probablement compris entre 7.2 et 7.4 (164,167,169,171,172). La zone optimale de conservation du chimiotactisme est comprise entre pH 7.0 et 7.5; celle de la chimiluminescence entre pH 6.5 et 8.0 (171,172).

L'utilisation d'un additif pour limiter la décroissance du pH durant la conservation des PN est donc indispensable si celle-ci dépasse quelques heures (187).

1.3.3.5.3.7.Température de conservation.

La température de conservation optimale se situe entre 20 et 25°C, plutôt que 4°C (164,167,169,171,172). La température de 4°C semble entraîner une dépolymérisation des microtubules, expliquant l'altération de mobilité du PN observée (171). La température de 37°C est à proscrire car elle entraîne de multiples lésions des PN (164,169,171,188-191).

1.3.3.5.3.8.Le glucose.

Le glucose est un adjuvant de conservation intéressant, particulièrement pour le maintien du chimiotactisme (apport d'un substrat énergétique) (192-194). Les concentrations optimales pour la conservation sont probablement proches de la glycémie physiologique (5.5 mmol/ L), alors que des concentrations plus élevées (55 mmol/ L) peuvent entraîner une lyse osmotique des PN (192-194).

1.3.3.5.3.9.Cations divalents.

La présence de cations divalents, particulièrement le calcium, peut agréger les PN et donc causer une perturbation de leur viabilité au cours de leur conservation (195).

1.3.3.5.3.10.Les réducteurs.

L'apport de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) permettrait le maintien de certaines propriétés du PN au cours de la conservation de ceux-ci, en particulier la chimiluminescence (196). Globalement, il semblerait qu'un milieu relativement réducteur soit favorable à la conservation des PN (69). Cette approche expérimentale a été peu explorée jusqu'à présent.

1.3.3.5.3.11.Les protéines.

Certains milieux de type RPMI (Roswell Park Memorial Institute, USA), additionnés d'1 % d'albumine (mais aussi d'un tampon bicarbonate et de glucose) permettraient les meilleures conservations du chimiotactisme au cours de la conservation des PN en limitant les interactions des PN avec les cellules contaminantes (187,192).

Outre cette action bénéfique, l'apport de protéines dans le milieu de conservation possède également un effet (in vitro) sur la réduction de l'adhésion des PN à la paroi des boîtes utilisées pour mesurer le chimiotactisme de ceux-ci (197).

1.3.3.5.3.12.Les corticostéroïdes.

L'emploi des corticostéroïdes ajoutés au milieu de conservation a été proposé, principalement pour stabiliser les membranes des PN et donc limiter la lyse de ceux-ci (179). L'hydrocortisone pourrait également diminuer l'aggrégation des PN au cours de la conservation (179). Les résultats favorables notés dans un premier temps n'ont pas été confirmés par la suite (179).

1.3.3.5.3.13. La désoxyribonucléase 1 (DNase 1).

La DNase 1 retarderait, voire éliminerait, la formation d'agrégats fibrineux et de matériel précipitable engendré par la libération d'acides nucléiques liés à des protéines, causée par la lyse cellulaire durant la conservation (179).

L'utilisation de DNase 1 améliore, selon Contreras, le maintien de la viabilité cellulaire. Il n'a pas étudié l'action de cet additif sur les autres fonctions du PN.

1.3.3.5.3.14. Para-amino-benzoate (PAMB).

L'addition de 0.1 mmol/ L d'acide para-amino-benzoïque au milieu de conservation a été recommandée par certains auteurs, mais ceci n'a pas été confirmé par la suite (198).

1.3.3.5.3.15. Principaux paramètres relatifs à la conservation.

Ils sont résumés dans le tableau XVII (69).

1.3.3.5.3.16. Evolution des principales fonctions ou paramètres relatifs aux PN au cours de la conservation en milieu liquide.

1.3.3.5.3.16.1. Le chimiotactisme.

Le chimiotactisme est la fonction des PN la plus précocement perturbée au cours de la conservation (69,168,169,171,172). Comme le chimiotactisme est un phénomène consommateur d'énergie, on remarqua dans un premier temps une étroite corrélation entre le taux de l'ATP intragranulocytaire et le chimiotactisme des PN (199,200,201). Cependant, Lane en utilisant le 2-désoxyglucose comme inhibiteur de la glycolyse des PN nota un effet inhibiteur sur la plupart des fonctions des PN (dont la migration spontanée),

Tableau XVII : Principaux paramètres liés à la conservation des polynucléaires, d'après Verstraeten et coll. (69).

Paramètres

Température de conservation

pH du milieu de conservation

Agitation

Type de polymère utilisé pour le conteneur

Anticoagulant

Additifs utilisés pour améliorer le milieu de conservation:

- tampon bicarbonate
- glucose
- protéines
- corticoïdes
- désoxyribonucléase 1
- nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

mais pas sur le chimiotactisme qui était au contraire augmenté (202). Ceci signifierait qu'il n'y a pas de causalité entre la chute de l'ATP intragranulocytaire et celle du chimiotactisme (69,202).

L'altération de certains récepteurs, notamment ceux pour le FMLP pourrait partiellement expliquer la diminution du chimiotactisme observée au cours de la conservation des PN (203,205).

D'autres auteurs suggèrent une altération de la conversion de l'acide arachidonique en leucotriène B₄, l'amplificateur intracellulaire majeur pour le chimiotactisme des PN (206).

Certaines études montrent que la conservation des PN en milieu liquide pourrait s'accompagner d'une hyperadhésivité et d'une tendance accrue à l'agrégation des PN, surtout à 4°C (207,208).

L'analyse vidéo du chimiotactisme des PN montre après 24 h de conservation à 22°C: 1) un nombre diminué de cellules migrantes; 2) une réduction de 25 % de la vitesse de migration des PN; 3) une altération de l'orientation des PN vis-à-vis du chimiotactisme (209).

En résumé, l'altération du chimiotactisme au cours de la conservation des PN procède vraisemblablement de plusieurs mécanismes différents, mais reste encore mal connue à l'heure actuelle.

1.3.3.5.3.16.2.L'ATP intragranulocytaire.

Il s'agit également d'un paramètre important pour évaluer la bonne qualité de la conservation des PN (69,168-172). Une chute de l'ATP intragranulocytaire est observée durant la conservation des PN, surtout si le pH de conservation s'éloigne de 7.4 et si la concentration des PN est élevée (211). Ceci semble lié à la production d'acide lactique par les PN (211). Lane suggère que l'inhibition de l'activité de la phosphofructokinase par le pH acide pourrait expliquer en partie la chute du taux d'ATP observé durant la conservation des PN (211).

1.3.3.5.3.16.3.La chimiluminescence.

Le maintien de cette propriété dépend, tout comme le chimiotactisme, d'un pH du milieu de conservation stabilisé à une valeur proche de 7.0; mais toutefois dans des limites plus larges (6.5-8.0) (171,172).

1.3.3.5.3.16.4.La réduction du NBT, la phagocytose et la viabilité.

Ces fonctions sont fréquemment mesurées mais paraissent être nettement moins sensibles que celles citées précédemment (69).

1.3.3.5.3.17.Récapitulatif.

Les conservations des PN en milieu liquide sont les plus performantes et les mieux étudiées à l'heure actuelle (69). Les études les plus avancées permettent une conservation de 24 h, voire 48 h, à partir d'un milieu synthétique de type RPMI additionné d'un tampon bicarbonate, de glucose et de protéines (69). Le meilleur critère de conservation des PN est probablement la mesure du chimiotactisme (paramètre le plus sensible) (69). Toutefois, en raison du manque de connaissances théoriques relatives aux altérations du PN durant la conservation, la plupart des auteurs utilisent une série de tests pour évaluer les fonctions des PN : mobilité, phagocytose, métabolisme oxydatif, métabolisme énergétique, intégrité des membranes...(69).

1.3.3.5.4.Les cryopréservations (ou cryoconservations).

Les cryopréservations sont l'autre grand groupe de techniques utilisées pour la conservation des PN. Contrairement aux cryopréservations de lymphocytes, de monocytes, de CFU-C, les cryopréservations de PN humains posent d'énormes problèmes (212-220). Les résultats demeurent controversés et dans l'ensemble très insuffisants (212,222).

Les études de cryopréservations de PN sont moins complètes et moins nombreuses que celles qui concernent les conservations en milieu liquide (69).

En fait, beaucoup d'auteurs se limitent à un test de viabilité et à une numération cellulaire comme critère de bonne conservation (221,222).

Une des limites les plus gênantes des cryopréservations réside dans l'impossibilité de fournir une quantité notable de PN, en particulier pour des besoins transfusionnels (221).

Les facteurs les plus importants à considérer en cas de cryoconservation sont: 1) le type et la concentration en cryoprotecteur; 2) la vitesse de congélation; 3) la température de congélation finale utilisée pour la conservation; 4) la durée de la conservation et 5) la vitesse et la durée de décongélation (221-223).

Les cryopréservations nécessitent un cryoprotecteur de membrane pour protéger le PN du stress osmotique observé durant la congélation (221,222). Le choix du cryoconservateur est important; le plus utilisé est le diméthylsulfoxyde (DMSO) à des concentrations variant entre 0.6 et 2.0 mol/ L (221-228). L'élimination du cryoprotecteur constitue une étape critique (221-222). Après la décongélation, le DMSO (comme les autres cryoprotecteurs) doit être éliminé progressivement et lentement par dilution et lavage (229). Une dilution trop rapide peut conduire à un choc osmotique (227,229). La toxicité dépend aussi de la concentration en cryoprotecteur, de la température et du temps de contact avec les PN (221,222,227,229). Le DMSO ne procure pas une protection satisfaisante contre les congélations rapides (10°C/ min) (230,231).

Le glycérol, à des concentrations comprises entre 1 et 2 mol/ L, peut aussi être utilisé comme cryoprotecteur (232). Les dégâts causés aux PN sont plus importants qu'avec le DMSO, et ceci semble dû à des chocs osmotiques plus prononcés (232,233).

Certains auteurs recommandent l'éthylène glycol 1 à 2 mol/ L comme cryoprotecteur (232,233).

Le PN est une cellule particulièrement difficile à préserver à de très basses températures (221).

Les 4 principaux facteurs impliqués dans les lésions observées sont: 1) le choc osmotique; 2) la congélation; 3) une vitesse de congélation trop rapide; 4) le choc par dilution (234,239).

Les fonctions des PN, en particulier le chimiotactisme sont profondément altérées à des osmolalités supérieures à 600 mOsmol/ Kg ou à une température légèrement inférieure à 0°C en l'absence de cryoprotecteur (240). La vitesse optimale de congélation est comprise entre 1 et 3°C/min (240,241). Une conservation des PN à -80°C ne doit pas dépasser 3 semaines si l'on veut maintenir les principales fonctions des PN de façon acceptable (221,222,242). Pour des conservations de plus longue durée, l'azote liquide (-196°C) est indispensable (221,222).

En ce qui concerne les critères de bonne conservation, le contraste est frappant entre le maintien de la viabilité (souvent correct) et ceux du chimiotactisme et de la morphologie des PN (profondément altérés) (234,243,244). La dégranulation des PN ainsi que la perte du chimiotactisme sont les 2 lésions les plus précoces (234,243,244).

Le contrôle du volume cellulaire est également important (228) dans ce cadre. L'utilisation de macromolécules et d'une dilution suffisamment lente après décongélation améliorent le maintien du volume cellulaire (228,234,245,246).

L'étude des additifs de conservation reste très fragmentaire dans ce domaine. L'utilisation de plasma humain comme additif de conservation s'avère nuisible, conduisant à l'agrégation des PN et à une perte rapide de leurs fonctions (247).

L'ATP et l'albumine pourraient être des additifs de conservation intéressants (comme pour les conservations en milieu liquide) (197).

En conclusion, à l'heure actuelle, les cryopréservations ne présentent pas de résultats satisfaisants et leur développement s'avère plus difficile encore que celui des conservations en milieu liquide (69).

1.4. Conclusions générales et bases théoriques d'un modèle expérimental de conservation des PN.

Les modèles de conservation des PN décrits dans la littérature examinée s'avèrent dans l'ensemble décevants et aucun d'entre eux ne s'est imposé comme solution utilisable en routine clinique ou à des fins d'études expérimentales (69).

Le problème majeur ne réside pas dans le prélèvement. En effet, les techniques modernes de prélèvement des PN (centrifugation en flux continu, avec prémédication du donneur par les glucocorticoïdes) permettent des rendements satisfaisants et n'altèrent pas les fonctions du PN (69).

Par contre, la conservation des PN pose toujours des problèmes et ne permet pas de stocker ces cellules plus de 24 h, alors qu'une conservation comparable à celles des plaquettes (3 à 5 jours) serait souhaitable (69). Les conservations liquides sont mieux étudiées et plus performantes que les cryoconservations (69). Une température de 20 à 25°C et un pH proche de 7.4 semblent des conditions cruciales pour assurer une bonne conservation (69). Par contre, le choix du milieu de conservation (plasma? milieu synthétique?) ainsi que celui d'éventuels additifs reste malaisé et aucun protocole ne s'est imposé à l'heure actuelle (69).

Le chimiotactisme semble être la fonction des PN la plus précocement altérée au cours de la conservation; son étude constituerait donc le meilleur choix comme critère de bonne conservation (69). Toutefois, la plupart des auteurs utilisent une batterie de tests pour étudier l'évolution des fonctions du PN au cours de la conservation (69).

Dans notre travail, nous viserons donc à définir un milieu de conservation optimal des PN, et à choisir les mesures les plus adéquates pour étudier le PN durant cette conservation.

2.Etude expérimentale.

2.1.Etude fonctionnelle des PN conservés.

2.1.1.Choix de la méthode de séparation des PN et du milieu de conservation.

2.1.1.1.Choix des méthodes liquides.

Les méthodes de conservation en milieu liquide font l'objet du plus grand nombre d'études expérimentales (cf partie bibliographique) (69). Ces études permettent de dégager plusieurs conclusions importantes, notamment en ce qui concerne le pH et la température du milieu de conservation (69). Les résultats obtenus par plusieurs auteurs (Glasser et Lane en particulier) permettent de penser qu'une conservation adéquate des fonctions les plus fragiles du PN, le chimiotactisme en particulier, pourrait être réalisée pendant plusieurs jours (174,187). Toutefois, la durée de conservation des PN, pour la plupart des études expérimentales, ne dépasse pas 48 h (69).

De plus, l'équipement et l'expérience de notre laboratoire autorisent un départ relativement rapide des études expérimentales de conservation des PN en milieu liquide. En effet, la séparation de PN par sédimentation sur dextran ou sur Percoll^R, ainsi que la mesure de plusieurs fonctions du PN (chimiotactisme, migration spontanée, réduction du NBT...) ont déjà été mises au point avant cette étude.

L'alternative possible aux conservations en milieu liquide, c'est-à-dire les cryopréservations, montrent plusieurs inconvénients, notamment le manque d'expérience des techniques de cryopréservation dans notre laboratoire, et surtout la faible quantité de PN conservables par cette méthode, ce qui limite fortement l'utilisation pratique éventuelle de PN conservés de cette façon (221,222).

Toutes ces raisons expliquent le choix d'une méthode de conservation liquide.

2.1.1.2.Choix des fonctions des PN à étudier lors de la conservation.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes est effectuée à l'aide d'un Counter STKR (Coulter,USA) pour toute l'étude expérimentale. Elle est réalisée d'une part, pour calculer la quantité d'additif nécessaire à une bonne conservation des PN et d'autre part, pour mesurer la contamination en cellules parasites. Ces contaminations cellulaires peuvent s'avérer très nocives, notamment en consommant certains additifs de conservation prévus pour les PN (bicarbonate, glucose...) ou en favorisant l'agrégation leucocytaire (174,175).

La mesure du chimiotactisme est sélectionnée dans le cadre de cette étude, car il représente le marqueur le plus sensible de l'altération fonctionnelle des PN au cours de la conservation (171,172). Nous utilisons une technique de migration sous agarose proche de celle recommandée par Nelson; l'agent chimiotactique est la formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (248). La migration spontanée est mesurée simultanément, par la même méthode que le chimiotactisme (248). La technique utilisée pour mesurer le chimiotactisme et la migration spontanée est développée dans l'annexe 1.

La réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) (67) et la mesure de la chimiluminescence (249) ont été sélectionnées pour étudier le métabolisme oxydatif du PN durant la conservation. La phagocytose est mesurée par une technique utilisant des billes de latex (67). La technique de mesure de la réduction du NBT ainsi que celle de la phagocytose sont précisées dans l'annexe 2; celle de la mesure de la chimiluminescence dans l'annexe 3.

La mesure de l'adénosine triphosphate (ATP) intragranulocytaire et la mesure du pH du milieu de conservation (déterminé à l'aide d'un pHmètre TS 40/N

(Tacussel électronique, France), permettent d'apprécier l'état énergétique des PN conservés (249). La chute du pH observée lors de la conservation est liée à la génération de lactate par les PN, elle-même en relation avec la glycolyse anaérobie, principale source d'énergie du PN (211). L'ATP est également mesuré, lorsque celui-ci est utilisé comme additif de conservation. La méthode de mesure de l'ATP est développée dans l'annexe 4 (249).

La mesure de la libération de lysozyme (témoin des granules primaires et spécifiques) et de la bêta-glucuronidase (témoin des granules primaires) dans le milieu de conservation est effectuée pour mesurer la dégranulation des PN au cours de la conservation (249). Les méthodes de dosage de la bêta-glucuronidase et du lysozyme sont développées dans les annexes 5 et 6, respectivement (249).

2.1.1.3.Choix des méthodes de prélèvement des PN.

2.1.1.3.1.Choix des donneurs.

Les donneurs, pour l'obtention de sang total et pour les cytophèreses, sont sélectionnés selon les normes relatives au don de sang et de leucocytes en France (106). Aucun autre critère particulier de choix (âge, race, sexe...) n'a été retenu (249).

2.1.1.3.2.Ponction veineuse.

Le sang total est obtenu par ponction veineuse. Il est recueilli dans un tube de polypropylène stérile (Falcon 2059, Becton Dickinson, USA) contenant 10 UI d'héparine (Héparine Eurobio, France) par ml de sang (249).

2.1.1.3.3.Cytaphérèse.

Ce prélèvement est réalisé chez des donneurs ayant reçu une prémédication aux glucocorticoïdes. Les leucocytes sont obtenus par centrifugation en flux

continu à l'aide de la centrifugeuse Fenwal CS 3000 (Fenwal,USA) et recueillis dans une poche transfusionnelle R 2021 en chlorure de polyvinyle (Fenwal,USA). Le mode opératoire précis est développé dans l'annexe 7.

2.1.1.4.Choix des méthodes de séparation des PN.

2.1.1.4.1.Sédimentation sur dextran.

La méthode de séparation des PN par sédimentation sur dextran est la plus utilisée dans notre laboratoire (cf annexe technique 8) (249). Elle possède l'avantage de ne pas causer d'altération supplémentaire in vitro en raison de l'absence de centrifugation. Elle est assez rapide (1 h environ), aisée et ne nécessite qu'un matériel relativement peu coûteux (seringues et tubulures stériles, filtres). Elle peut être réalisée stérilement sans difficultés, à condition de disposer d'un flux laminaire. Elle possède plusieurs désavantages dont le principal est probablement d'être une méthode de séparation des leucocytes et non des PN. Si les leucocytes sont obtenus par une ponction veineuse de 15 ml chez un donneur sain (quantité disponible journallement dans le cadre de notre étude), les concentrations en PN obtenues pour 5 ml de milieu de conservation (conditions expérimentales usuelles) dépassent rarement 10^{10} /L. La pureté en PN habituellement obtenue, par rapport à l'ensemble des leucocytes, est d'environ 70 %. Elle dépend de la leucocytose et de la formule sanguine du donneur. Si les PN sont obtenus par cytophérèse, ce problème ne se pose pas, en raison des rendements en PN beaucoup plus élevés (10 fois, au moins). Toutefois, les cytophérèses sont beaucoup plus difficilement disponibles que les ponctions veineuses, en raison de la complexité et de la durée de ce prélèvement. Un autre inconvénient des cytophérèses réside dans la contamination en leucocytes mononucléés, proche de celle observée pour la sédimentation sur dextran. La pureté en PN habituellement obtenue (qui dépend du donneur) est d'environ 70 %. La contamination en érythrocytes et

en plaquettes est également considérable, de l'ordre de 5.10^{11} à 10^{12} /L pour les érythrocytes et les plaquettes, soit 10 à 20 fois plus que celle observée pour le prélèvement sanguin. Ces contaminations n'altèrent pas sensiblement la qualité des études fonctionnelles, en tout cas pour des PN frais et selon les méthodes décrites, mais elles peuvent s'avérer néfastes lors de la conservation des PN (par exemple, consommation de glucose par ces cellules parasites, ou par des phénomènes d'agrégation des PN).

Malgré ces défauts, nous avons retenu la méthode par sédimentation sur dextran pour les essais relatifs aux études fonctionnelles du PN. La technique est détaillée dans l'annexe 8.

2.1.1.4.2.Sédimentation sur Percoll^R.

La méthode de séparation par sédimentation sur Percoll^R (cf annexe technique 11) montre une contamination beaucoup plus réduite en cellules mononucléées. La pureté habituellement obtenue est de l'ordre de 95-98 %. La contamination en érythrocytes et en plaquettes est également bien moindre qu'avec la sédimentation sur dextran: de l'ordre de 10 à 100 fois moins et donc difficilement mesurable par l'automate de numération Coulter. Cette pureté nettement accrue est toutefois obtenue au dépend d'une perte de rendement importante, de l'ordre de 10 fois par rapport à la sédimentation sur dextran, et donc d'une concentration en PN beaucoup plus faible pour un même volume de sang prélevé.

La méthode de séparation sur Percoll^R est toutefois indispensable pour les études de la structure de membrane du PN où une pureté maximale est indispensable (cf chapitres 2.2. et 2.3.).

2.1.1.5.Choix de la température de conservation.

Pour toute notre étude, nous choisissons de conserver les PN à température ambiante, c'est-à-dire une zone de températures comprises entre 22 et 29°C. Ce

choix est en accord avec la littérature récente (167-172). Les températures de 4°C et 37°C ne sont plus utilisées actuellement (190,191). La température de conservation a été mesurée pour chaque essai (249).

2.1.1.6.Choix du milieu de conservation.

Le choix du milieu de conservation est guidé, d'une part par l'étude bibliographique, et d'autre part par l'étude expérimentale.

Un autre axe de réflexion nous mène à étudier des milieux injectables, puisque ceux-ci présentent plusieurs des critères nécessaires à une conservation correcte: la présence d'un pH proche de 7.4, d'une composition électrolytique proche du plasma, de la stérilité et de l'apyrogénicité, notamment (249).

La préférence est donnée à des milieux synthétiques, afin de maîtriser plus sûrement la composition du milieu, le plasma ou le sérum apportant une source d'additifs inconnus, dont l'influence, positive ou négative est malaisée à déterminer (249).

D'autre part, l'étude bibliographique nous montre que la conservation des PN s'avère impossible au-delà de quelques heures si un tampon bicarbonate n'est pas ajouté au milieu de conservation (187). Nous intégrons tous ces renseignements pour choisir et étudier 4 milieux de conservation: un mélange tampon phosphate/solution d'albumine, le Rhéoslander^R, le Plasmagel^R glucosé désodé et le Plasmion^R.

2.1.1.6.1.Méthodologie.

Le nombre d'essais est de cinq. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type. L'étude statistique est réalisée par analyse de variance entre les résultats obtenus au temps 0 h et ceux obtenus au bout de 24 h de conservation.

Le chimiotactisme, la migration spontanée, la réduction du NBT et la phagocytose sont aussi représentés sous la forme du pourcentage d'activité par

rapport au temps 0 h. La libération de lysozyme et de bêta-glucuronidase est exprimée sous la forme de la différence d'activité par rapport au temps 0 h.

2.1.1.6.2. Milieu tampon phosphate/albumine.

Le premier milieu de conservation testé est constitué d'un mélange de tampon phosphate pH 7.4 glucosé 1 mmol/ L (PBS-G) et d'une solution stérile d'albumine à 200 g/ dL, 1/1 volume/volume. La composition du PBS-G est la suivante: chlorure de sodium anhydre (Prolabo, France): 8 g; chlorure de potassium anhydre (Prolabo, France): 0.2 g; Hydrogénophosphate de sodium anhydre (Prolabo, France): 1.15 g; dihydrogénophosphate de potassium anhydre (Prolabo, France): 0.2 g; D+glucose (Prolabo, France): 0.18 g; Eau distillée: 1 L. Nous choisissons ce milieu en raison de l'apport d'un tampon phosphate dont le pH est proche de celui du sang, de glucose et de protéines, trois facteurs reconnus comme favorables à la conservation des PN (187,192,197).

La durée de conservation est de 24 h.

Les paramètres étudiés pour cet essai sont le chimiotactisme, la migration spontanée, la réduction du NBT, la phagocytose et la libération de lysozyme et de bêta-glucuronidase dans le milieu de conservation.

La température de conservation est de 23 ± 2 °C.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes est de $8.9 \pm 2.1 \cdot 10^9$ / L, $6.6 \pm 1.5 \cdot 10^9$ / L, $25 \pm 15 \cdot 10^9$ / L et $38 \pm 14 \cdot 10^9$ / L, respectivement.

Le tableau I présente les résultats à 0 h et 24 h de conservation pour le milieu PBS-G/albumine.

Nous notons la formation d'agrégats macroscopiques au bout de 24 h de conservation. Nous observons une altération significative (cf tableau I) de tous les paramètres mesurés au bout de 24 h de conservation. Le chimiotactisme, en particulier, est effondré au bout de 24 h. Ce milieu est donc inadapté à la conservation des PN.

Tableau I : Conservation des PN durant 24 h dans le milieu PBS glucosé/albumine.

Paramètre	Durée de conservation			
	0 h		24 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	% 0h	P
Chimiotactisme (mm)	2.24 $\pm$ 0.40	0.10 $\pm$ 0.10	5	0.001
Migration spontanée (mm)	1.20 $\pm$ 0.30	0.10 $\pm$ 0.10	8	0.001
NBT (%)	90 $\pm$ 3	80 $\pm$ 2	89	0.01
Phagocytose (%)	99 $\pm$ 1	90 $\pm$ 2	91	0.01
			Δ 0 h	
Lysozyme (ug/ mL)	3 $\pm$ 2	21 $\pm$ 6	18	0.001
Bêta-glucuronidase(US/mL)	18 $\pm$ 6	39 $\pm$ 9	21	0.001

$\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart type, % 0h : pourcentage de l'activité à 0h, Δ 0h : différence d'activité par rapport à 0h,

NBT : nitrobleu de tétrazolium, U.S. : Unité Sigma

2.1.1.6.3. Milieu Rhéoslander^R.

Le deuxième milieu de conservation testé est le Rhéoslander^R (Laboratoire Roger Bellon, France). La composition de ce milieu est la suivante: dextran 40000: 10 g; Sorbitol: 5 g; Eau pour injectables: 100 mL. Nous choisissons ce milieu en raison de son contenu en protéines.

La température de conservation est de 22 ± 1 °C.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes est de $7.8 \pm 0.9 \cdot 10^9 / L$, $5.1 \pm 0.7 \cdot 10^9 / L$, $40 \pm 20 \cdot 10^9 / L$ et $51 \pm 17 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

Le tableau II présente les résultats à 0 h et 24 h de conservation pour le milieu Rhéoslander^R.

A 0 h de conservation, le chimiotactisme et la migration spontanée sont déjà nettement réduits par rapport aux valeurs de références.

La formation d'agrégats macroscopiques après 24 h de conservation est beaucoup plus importante et nettement moins réversible que pour l'essai précédent. Toutes les fonctions étudiées sont significativement détériorées après 24 h de conservation (cf tableau II).

Ce milieu est donc encore plus inadapté que le précédent puisqu'on observe d'importants dégâts d'emblée.

Tableau II : Conservation des PN durant 24 h dans le milieu Rhéoslander.

Paramètre	Durée de conservation			
	0 h		24 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	% 0h	P
Chimiotactisme (mm)	0.60 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0	0.001
Migration spontanée (mm)	0.20 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0	0.001
NBT (%)	85 ± 3	40 ± 11	47	0.001
Phagocytose (%)	90 ± 3	51 ± 12	57	0.001
			$\Delta 0 h$	
Lysozyme (ug/mL)	29 ± 3	159 ± 28	130	0.001
Bêta-glucuronidase(US/mL)	48 ± 19	188 ± 44	140	0.001

$\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart type, % 0h : pourcentage de l'activité à 0h, $\Delta 0h$: différence d'activité par rapport à 0h,

NBT : nitrobleu de tétrazolium, U.S. : Unité Sigma

2.1.1.6.4. Le Plasmagel^R glucosé désodé.

Le troisième milieu expérimenté est le Plasmagel^R glucosé (Laboratoire Roger Bellon, France). La composition de ce milieu est la suivante: gélatine: 2.5 g; glucose: 5 g; eau pour injectables: 100 mL. Ce milieu est choisi en raison de la présence de protéines et de glucose, bien que ce dernier soit présent à une concentration nettement supérieure à celle du plasma.

La température de conservation est de 23 ± 1 °C.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes est de $7.0 \pm 1.1 \cdot 10^9 / L$, $4.8 \pm 1.0 \cdot 10^9 / L$, $30 \pm 10 \cdot 10^9 / L$ et $28 \pm 9 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

Le tableau III présente les résultats à 0 h et 24 h de conservation pour le Plasmagel^R glucosé désodé.

A 0 h de conservation, les fonctions des PN restent normales par rapport à nos valeurs de références.

A 24 h de conservation, toutes les fonctions sont significativement altérées (cf tableau III) et l'on note la formation (modérée) d'agrégats macroscopiques. Ce milieu est donc inadapté à la conservation des PN.

Tableau III : Conservation des PN durant 24 h dans le milieu Plasmagel.

Paramètre	Durée de conservation			
	0 h		24 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	% 0h	P
Chimiotactisme (mm)	1.80 $\pm$ 0.40	0.10 $\pm$ 0.10	6	0.001
Migration spontanée (mm)	0.90 $\pm$ 0.30	0.10 $\pm$ 0.10	11	0.001
NBT (%)	91 $\pm$ 3	77 $\pm$ 4	85	0.01
Phagocytose (%)	97 $\pm$ 2	89 $\pm$ 2	92	0.01
			Δ 0 h	
Lysozyme (ug/mL)	4 $\pm$ 2	36 $\pm$ 11	32	0.001
Bêta-glucuronidase(US/mL)	18 $\pm$ 6	50 $\pm$ 11	32	0.001

$\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart type, % 0h : pourcentage de l'activité à 0h, Δ 0h : différence d'activité par rapport à 0h,

NBT : nitrobleu de tétrazolium, U.S. : Unité Sigma

2.1.1.6.5. Le Plasmion^R.

Le Plasmion^R (Laboratoires Roger Bellon, France) est une solution injectable de gélatine et d'électrolytes. La composition de ce milieu est la suivante: gélatine modifiée: 3 g; NaCl: 0.538 g; KCl: 0.037 g; MgCl₂: 0.014 g; lactate: 0.336 g; eau pour injectables: 100 mL. Ce milieu est dépourvu d'ions calcium; c'est pourquoi elle nous intéresse dans le cadre de cette étude.

La température de conservation est de 24 ± 2 °C.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes est de $6.5 \pm 1.0 \cdot 10^9 / L$, $5.3 \pm 0.9 \cdot 10^9 / L$, $30 \pm 10 \cdot 10^9 / L$ et $42 \pm 12 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

Les résultats à 0 h et à 24 h de conservation sont présentés dans le tableau IV.

A 0 h de conservation, les fonctions des PN sont normales par rapport à nos valeurs de référence.

A 24 h de conservation, toutes les fonctions sont significativement altérées (cf tableau IV). Toutefois, la formation d'agrégats macroscopiques reste très modérée. Dans ces conditions, ce milieu est néanmoins inadapté à la conservation des PN.

Tableau IV : Conservation des PN durant 24 h dans le milieu Plasmion.

Paramètre	Durée de conservation			
	0 h		24 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	% 0h	P
Chimiotactisme (mm)	1.90 $\pm$ 0.30	0.2 $\pm$ 0.10	11	0.001
Migration spontanée (mm)	1.00 $\pm$ 0.30	0.20 $\pm$ 0.10	20	0.001
NBT (%)	89 $\pm$ 3	73 $\pm$ 4	82	0.01
Phagocytose (%)	95 $\pm$ 2	79 $\pm$ 4	83	0.01
			Δ 0 h	
Lysozyme (ug/mL)	3 $\pm$ 1	19 $\pm$ 5	16	0.001
Bêta-glucuronidase(US/mL)	13 $\pm$ 4	34 $\pm$ 9	21	0.001

$\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart type, % 0h : pourcentage de l'activité à 0h, Δ 0h : différence d'activité par rapport à 0h,
NBT : nitrobleu de tétrazolium, U.S. : Unité Sigma

2.1.1.6.6. Analyse des résultats obtenus.

Aucun des modèles étudiés ne présente des performances satisfaisantes. Pour tenter d'améliorer cette étude, nous avons décidé de sélectionner les deux milieux les moins mauvais (notamment sur le critère de formation d'agrégats macroscopiques), c'est-à-dire le Plasmion^R et le Plasmagel^R et de leur ajouter du bicarbonate de sodium 9 mmol/ L (Gibco, U.K.), afin de tenter de discerner la meilleure solution. En effet, l'étude bibliographique nous montre que le bicarbonate de sodium est l'un des additifs essentiels à une bonne conservation (187).

2.1.1.6.7. Plasmagel^R + bicarbonate de sodium 9 mmol/ L.

La température de conservation est de 22 ± 1 °C.

La numération de leucocytes, de PN, d'érythrocytes et de plaquettes est de $6.8 \pm 14 \cdot 10^9/ L$, $5.6 \pm 1.0 \cdot 10^9/ L$, $40 \pm 10 \cdot 10^9/ L$ et $51 \pm 18 \cdot 10^9/ L$, respectivement.

Le tableau V présente les résultats à 0 h et 24 h de conservation pour le Plasmagel^R + bicarbonate de sodium 9 mmol/ L.

Au bout de 24 h de conservation, nous ne remarquons plus la présence d'agrégats macroscopiques, mais toutes les fonctions sont significativement altérées (cf tableau V) et le chimiotactisme n'est maintenu qu'à 25 %.

Tableau V : Conservation des PN durant 24 h dans le milieu Plasmagel/bicarbonate.

Paramètre	Durée de conservation			
	0 h		24 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	% 0h	P
Chimiotactisme (mm)	2.00 ± 0.30	0.50 ± 0.20	25	0.001
Migration spontanée (mm)	1.00 ± 0.20	0.30 ± 0.10	30	0.001
NBT (%)	88 ± 2	80 ± 2	91	0.01
Phagocytose (%)	97 ± 2	94 ± 3	97	NS
			$\Delta 0 h$	
Lysozyme (µg/mL)	4 ± 2	24 ± 7	20	0.001
Bêta-glucuronidase(US/mL)	20 ± 6	43 ± 6	23	0.05

$\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart type, % 0h : pourcentage de l'activité à 0h, $\Delta 0h$: différence d'activité par rapport à 0h,

2.1.1.6.8. Plasmion^R + bicarbonate de sodium 9 mmol/ L.

La température de conservation est de 22 ± 1 °C.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes est de $7.7 \pm 1.1 \cdot 10^9/ L$, $6.5 \pm 1.2 \cdot 10^9/ L$, $30 \pm 15 \cdot 10^9/ L$ et $44 \pm 10 \cdot 10^9/ L$, respectivement

Le tableau VI présente les résultats à 0 h et 24 h de conservation pour le Plasmion^R + bicarbonate de sodium 9 mmol/ L.

Au bout de 24 h de conservation, nous ne remarquons plus la présence d'agrégats macroscopiques, le chimiotactisme et la libération d'enzymes sont altérés alors que la phagocytose et la réduction du NBT restent normales (cf tableau VI). Toutefois, la diminution du chimiotactisme demeure assez modérée puisqu'il est conservé à 42 % au bout de 24 h.

Tableau VI : Conservation des PN durant 24 h dans le milieu Plasmion/bicarbonate.

Paramètre	Durée de conservation			
	0 h		24 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	% 0h	P
Chimiotactisme (mm)	2.20 ± 0.40	1.00 ± 0.30	45	0.001
Migration spontanée (mm)	1.20 ± 0.30	0.50 ± 0.20	42	0.001
NBT (%)	93 ± 3	90 ± 2	97	NS
Phagocytose (%)	98 ± 1	96 ± 2	98	NS
			$\Delta 0h$	
Lysozyme (ug/mL)	2 ± 1	14 ± 3	12	0.001
Bêta-glucuronidase(US/mL)	9 ± 3	29 ± 6	20	0.001

$\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart type, % 0h : pourcentage de l'activité à 0h, $\Delta 0h$: différence d'activité par rapport à 0h.

2.1.1.6.9. Conclusion.

Selon nos résultats expérimentaux, le Plasmion^R additionné de bicarbonate de sodium 9 mmol/ L constitue la meilleure base pour étudier un modèle de conservation des PN, principalement en raison du maintien à 42 % du chimiotactisme au bout de 24 h de conservation.

Nous avons donc décidé de retenir cette solution pour continuer notre étude expérimentale.

2.1.2. Influence de certains additifs de conservation.

2.1.2.1. Introduction - méthodologie.

Les résultats obtenus lors du choix du milieu de conservation confirment qu'il est impossible de réaliser une conservation des PN à partir d'un milieu synthétique "minimal". Le recours à un ou plusieurs additifs de conservation est indispensable puisque le meilleur milieu sélectionné (Plasmion^R) donne de très mauvais résultats concernant le maintien du chimiotactisme durant 24 h, sauf si du bicarbonate de sodium 9 mmol/ L est ajouté à ce milieu.

La littérature examinée est d'ailleurs sans ambiguïté à ce sujet: divers additifs, en particulier le bicarbonate de sodium, ont été utilisés par plusieurs auteurs qui améliorèrent ainsi nettement la conservation des PN (69,187).

Le choix et l'ordre des essais concernant les additifs examinés dans cette étude fut d'abord basé sur l'analyse de la littérature relative à ce sujet. En particulier, l'étude a d'abord porté sur l'influence de l'apport de bicarbonate de sodium, puis de glucose, au milieu de conservation. Chaque essai utilise les conclusions de l'essai précédent afin d'arriver le plus rapidement possible à un résultat satisfaisant. Nous avons vérifié l'action, bénéfique ou nuisible, de ces substances ajoutées au milieu Plasmion^R, sur la conservation des PN, d'après les fonctions des PN que nous avons mesurées. Ces fonctions sont le chimiotactisme, la migration spontanée, la réduction du NBT, la phagocytose, la chimiluminescence, le pH, le lysozyme et la bêta-glucuronidase, mesurés et exprimés comme précédemment.

Certains additifs (ou condition de conservation) étudiés ont déjà été testés précédemment par d'autres auteurs: bicarbonate de sodium, glucose, calcium, agitation, milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute), corticoïdes, type de récipient, désoxyribonucléase 1 (DNAse 1).

Les autres paramètres sélectionnés n'ont pas été étudiés dans la littérature examinée: stérilité de la séparation sur dextran, adénosine triphosphate (ATP), vitamine C, bullage d'azote et d'oxygène, nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH), acétate d'alpha-tocophérol, contamination en plaquettes, fluorure de sulfonylphénylméthane (PMSF), amikacine et ampicilline.

Pour toutes les solutions d'additifs, nous ajoutons 10 μ l d'une solution stock 100 X plus concentrée que la concentration finale désirée, par ml de milieu de conservation. Ceci permet d'éviter des variations importantes du volume de milieu de conservation. Toutes les solutions sont stérilisées par passage sur filtre Cathivex 0.22 μ m (Millipore, France), puis conservées à 4°C. L'ajout des additifs au milieu de conservation est réalisé stérilement, sous flux laminaire (cf sédimentation sur dextran).

En ce qui concerne l'étude statistique, le nombre de déterminations par essai est de cinq, les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type et nous utilisons le test d'analyse de variance.

2.1.2.2. Tampon bicarbonate.

2.1.2.2.1. Mode opératoire.

Nous utilisons le bicarbonate de sodium (Gibco, UK) pour tenter de maintenir le pH du milieu de conservation à des valeurs proche de 7.4. La concentration finale de bicarbonate de sodium est de 9 mmol/ L. Les modalités pratiques d'utilisation de ce composé sont détaillées dans l'annexe 9.

La libération d'acide lactique a également été mesurée dans le milieu de conservation. Celui-ci est dosé à l'aide d'un Hitachi 717 (Hitachi, Japon), selon la méthode du coffret-réactif Hitachi.

2.1.2.2.2. Résultats.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes donne les résultats suivants: $5.1 \pm 1.4 \cdot 10^9$ /L; $3.1 \pm 1.0 \cdot 10^9$ /L; $30 \pm 10 \cdot 10^9$ /L; $19 \pm 9 \cdot 10^9$ /L, respectivement.

Pour le contrôle, la concentration en acide lactique est de 0.2 ± 0.1 mmol/ L à 0 h de conservation et de 4.8 ± 0.7 mmol/ L à 24 h.

Pour l'essai, la concentration en acide lactique est de 0.2 ± 0.1 mmol/ L au bout de 0 h de conservation et de 5.4 ± 0.7 mmol/ L à 24 h (différence non significative avec le contrôle).

La température de conservation est de 20 ± 1 °C.

Les autres résultats sont repris dans le tableau VII.

Les figures 1a et 1b illustrent les modifications significatives apportées par le tampon bicarbonate au bout de 24 h de conservation.

2.1.2.1.3. Discussion.

Après 24 h de conservation, lorsque le pH du milieu de conservation chute en-dessous de 7.0, les fonctions des PN s'altèrent nettement (surtout le

chimiotactisme) et nous observons la formation d'agrégats macroscopiques. Ces résultats sont en accord avec la littérature (187).

En effet, des études ont été menées pour des zones de pH variant entre 5.5 et 8.5 (69). Il s'avère que le pH de 7.2 serait optimal pour éviter la lyse des PN et que l'intervalle de pH compris entre 7.0 et 7.5 serait l'optimum pour le maintien du chimiotactisme (69). En présence de bicarbonate, au bout de 24 h, le pH observé est de 7.20, ce qui semble satisfaisant. L'utilisation de bicarbonate limite nettement l'abaissement du pH lié à la libération d'acide lactique par les PN (observé dans cet essai). Il serait intéressant de vérifier si ce phénomène est également observé lorsque le pH est ajusté au bout de 24 h, ou tous les jours de la conservation (chapitres 2.1.2.20 et 2.1.2.21). Un pH maintenu constamment proche de 7.4 permettrait peut-être une conservation beaucoup plus longue des PN (plusieurs jours).

Nous avons mesuré la concentration en acide lactique dans le milieu de conservation, et ces résultats sont proches de ceux obtenus par d'autres auteurs, dans des conditions expérimentales proches (187,192,211). Le lactate libéré dans le milieu de conservation aurait deux origines: le glucose ajouté (éventuellement) à celui-ci ou la glycogénolyse au niveau des PN (187).

La relation entre la chute du chimiotactisme et celle du pH est très nette, mais son mécanisme reste mal connu. Lane et coll. suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une relation de cause à effet, la diminution du pH en dessous de 7.0 engendrant plusieurs effets nocifs vis-à-vis du PN (187):

d'une part, une modification de certains constituants du PN (protéines de membrane, structures intracellulaires, récepteurs aux cytotoxines);

d'autre part, des altérations biochimiques, en particulier au niveau de la phosphofructokinase, une enzyme de la glycolyse inhibée en cas d'acidose.

L'inhibition de la phosphofructokinase par les ions H_3O^+ en excès pourrait également expliquer la chute de l'ATP intragranulocytaire (187). De plus, l'accumulation d'ions H_3O^+ intracellulaires pourrait provoquer, soit

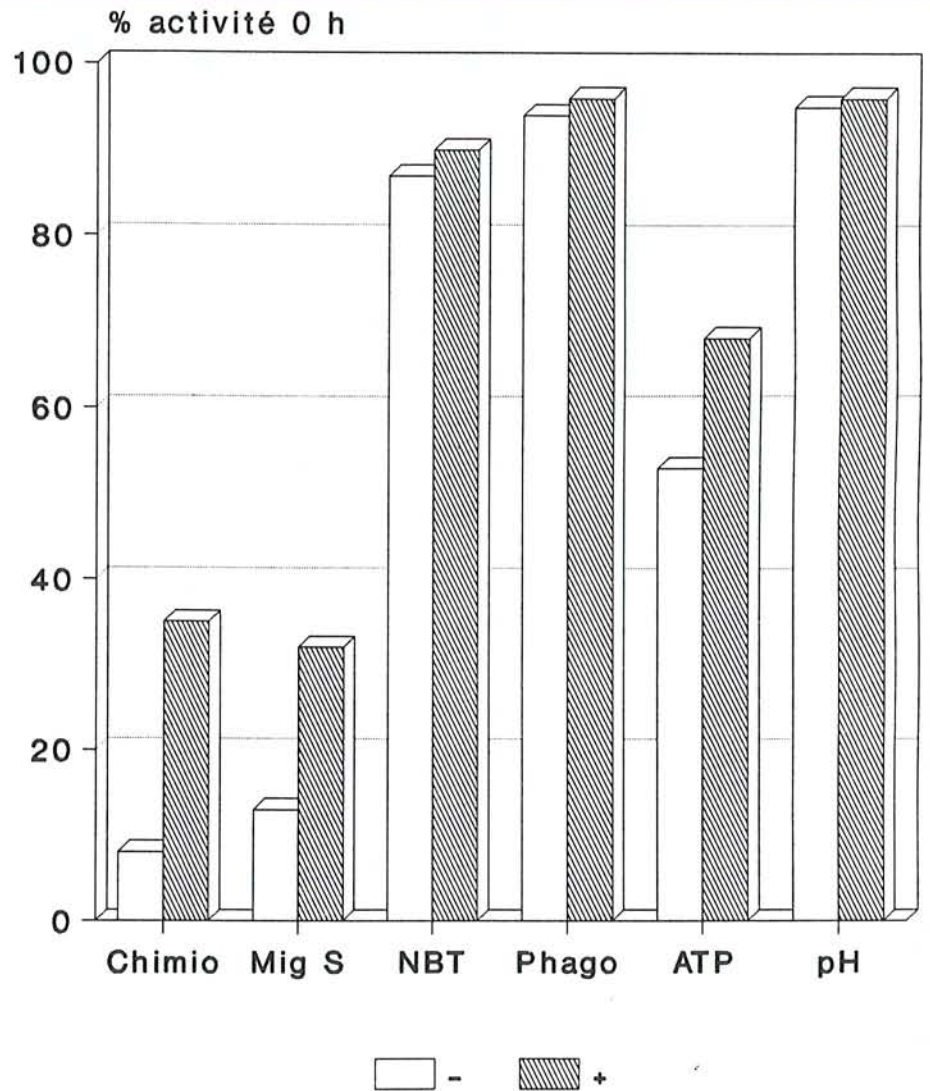
directement, soit par la diminution d'ATP, le dysfonctionnement des pompes Na^+/K^+ membranaires et donc permettre l'entrée d'eau et de sodium dans le PN.

Tableau VII : Conservation des PN durant 24 h en présence d'un tampon bicarbonate.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+	P	—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% Oh	$\bar{X} \pm SD$	% Oh
Chimiotactisme (mm)	1.93 ± 0.07	1.94 ± 0.10	NS	0.16 ± 0.07	8	0.68 ± 0.14	35
Migration spontanée (mm)	0.96 ± 0.04	1.08 ± 0.07	NS	0.13 ± 0.10	13	0.35 ± 0.08	32
NBT (%)	92 ± 2	94 ± 1	NS	79 ± 2	87	85 ± 2	90
Phagocytose (%)	97 ± 1	98 ± 1	NS	91 ± 2	94	94 ± 1	96
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2	NS	0.8 ± 0.2	53	1.1 ± 0.1	68
ATP EG (μmol/ L)	—	—	—	—	—	—	—
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN	5.8 ± 2.1	5.3 ± 3.0	NS	3.0 ± 0.3	52	2.9 ± 0.7	55
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN	3.4 ± 1.0	3.1 ± 1.4	NS	1.7 ± 0.3	50	1.6 ± 0.3	57
pH	6.81 ± 0.04	7.52 ± 0.03	0.001	6.45 ± 0.03	96	7.20 ± 0.01	96
					Δ Oh		Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	12 ± 4	10 ± 5	NS	45 ± 6	33	26 ± 4	16
Bêta-glucuronidase (US/mL)	56 ± 13	46 ± 8	NS	125 ± 27	69	79 ± 14	33

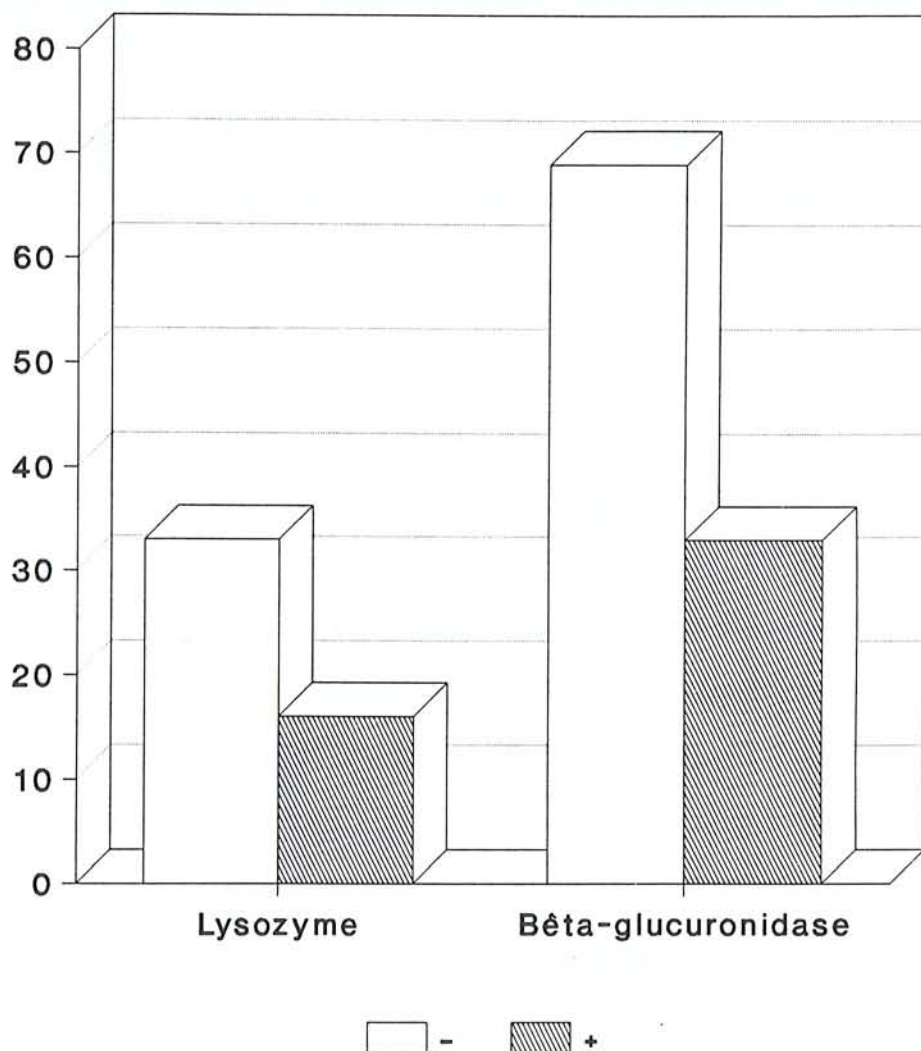
PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité de Oh; — : absence de bicarbonate; + : présence de bicarbonate. NS : non significatif; $\bar{X} \pm SD$: moyenne ± écart-type

Figure 1a : Modifications significatives apportées par le tampon bicarbonate au bout de 24 h.



- : Absence de bicarbonate
 + : Présence de bicarbonate
 Chimio : Chimiotactisme
 Mig S : Migration spontanée
 NBT : Nitrobleu de tétrazolium
 Phago : Phagocytose
 ATP : Adénosine triphosphate

Figure 1b : Modifications significatives apportées par le tampon bicarbonate au bout de 24 h.



- : Absence de bicarbonate

+ : Présence de bicarbonate

Le lysozyme est exprimé en différence de concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre les conservations de 0 h et de 24 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/mL) entre les conservation de 0 h et de 24 h.

2.1.2.3. Glucose.

2.1.2.3.1. Mode opératoire.

Le glucose (Prolabo, France) est ajouté au milieu de conservation, à la concentration finale de 5.5 mmol/ L. Nous avons également mesuré la concentration en glucose dans le milieu de conservation. Le dosage du glucose est réalisé à l'aide d'un Hitachi 717 (Hitachi, Japon), selon la méthode du coffret-réactif Hitachi.

2.1.2.3.2. Résultats.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes donne les résultats suivants: $5.1 \pm 1.4 \cdot 10^9/\text{L}$; $3.1 \pm 1.0 \cdot 10^9/\text{L}$; $30 \pm 10 \cdot 10^9/\text{L}$; $19 \pm 9 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau VIII.

La figure 2 illustre les modifications significatives apportées par le glucose.

La concentration en glucose est de $5.3 \pm 0.2 \text{ mmol/ L}$ à 0 h de conservation et de $4.9 \pm 0.4 \text{ mmol/ L}$ au bout de 24 h de conservation.

2.1.2.3.3. Discussion.

Le maintien du chimiotactisme est amélioré par l'ajout de glucose à des concentrations physiologiques (192-194). Ceci est probablement dû à l'augmentation de la production d'ATP par la glycolyse des PN et au fait que le chimiotactisme soit un phénomène contractile nécessitant de l'énergie (69,192-194).

La concentration optimale de glucose reste difficile à définir. Les rares études disponibles proposent des concentrations proches de la glycémie physiologique (192-194). Toutefois, cette concentration dépend de la quantité de PN présents dans la poche de conservation (211). En effet, la métabolisation du glucose est

directement proportionnelle à la concentration en PN présente dans la poche de conservation, pour une gamme comprise entre 10^8 et 10^9 PN/ L. Elle dépend également de la contamination érythrocytaire, et surtout plaquettaire (249).

Une conservation prolongée (plus de 24 h) nécessiterait probablement un apport plus important en glucose, ou plutôt un apport continu en glucose (249).

Ceci sera vérifié dans des expériences ultérieures. Il est à noter que des concentrations plus élevées en glucose, de l'ordre de 55 mmol/ L seraient toxiques pour le PN (probablement par un effet osmotique) (69). Les résultats que nous observons sont en accord avec la littérature examinée (192-194).

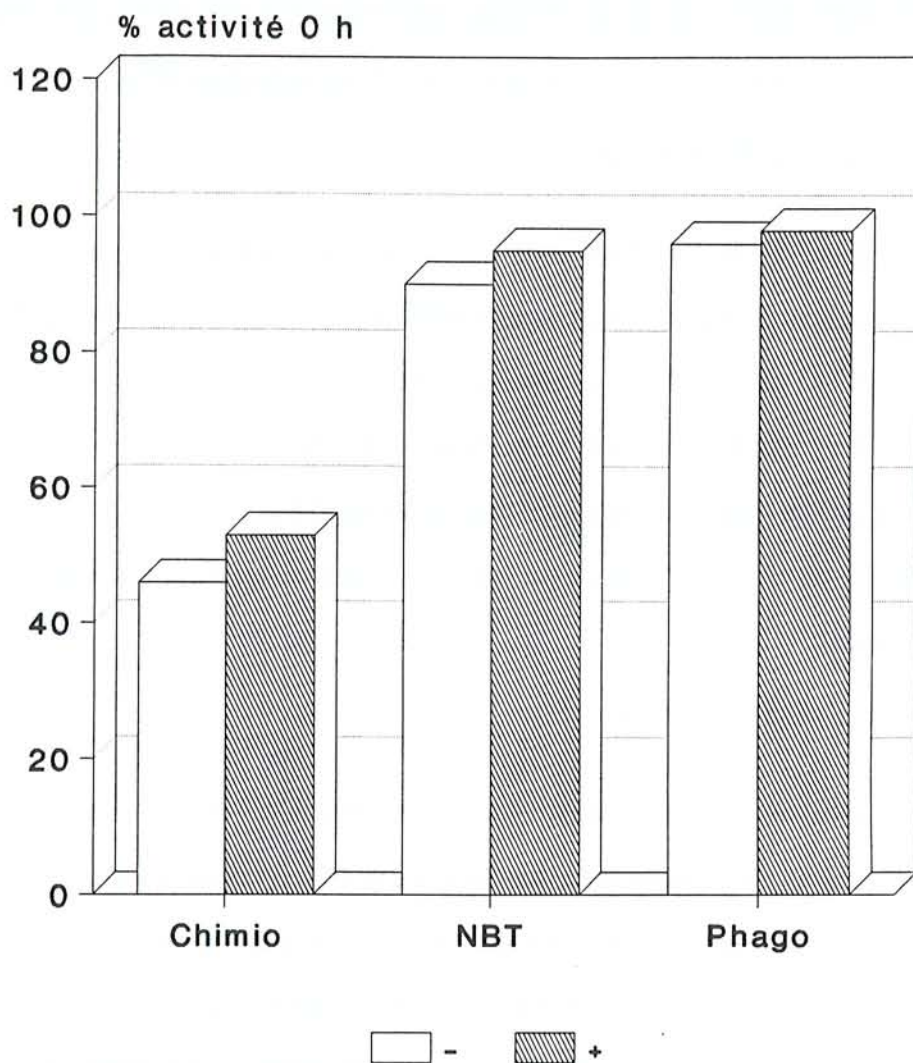
La consommation de glucose mesurée pour cet essai est proche de celle observée par d'autres auteurs (192-194).

Tableau VIII : Conservation des PN durant 24 h en présence de glucose.

Paramètre	0 h			P	24 h			P
	—	+	P		—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$			$\bar{X} \pm SD$	% Oh		
Chimiotactisme (mm)	1.9 ± 0.16	2.04 ± 0.14	NS	0.86 ± 0.07	46	1.08 ± 0.12	53	0.025
Migration spontanée (mm)	0.96 ± 0.08	1.03 ± 0.05	NS	0.46 ± 0.06	48	0.53 ± 0.08	51	NS
NBT (%)	92 ± 3	94 ± 2	NS	81 ± 1	90	89 ± 3	95	0.05
Phagocytose (%)	96 ± 1	98 ± 1	NS	92 ± 2	96	96 ± 1	98	0.025
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2	NS	1.0 ± 0.2	67	1.2 ± 0.2	75	NS
ATP EG (μmol/ L)	—	—	—	—	—	—	—	—
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN	4.9 ± 3.6	5.1 ± 3.5	NS	3.2 ± 2.3	65	3.8 ± 2.6	78	NS
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN	3.0 ± 2.1	3.1 ± 2.0	NS	1.9 ± 1.2	63	2.1 ± 1.3	68	NS
pH	7.52 ± 0.02	7.54 ± 0.03	NS	7.10 ± 0.20	94	7.20 ± 0.03	95	NS
					Δ Oh		Δ Oh	
Lysozyme (μg/mL)	19 ± 13	13 ± 7	NS	33 ± 8	14	26 ± 6	13	NS
Bêta-glucuronidase (US/mL)	19 ± 3	17 ± 6	NS	53 ± 11	34	42 ± 17	25	NS

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité

Figure 2 : Modifications significatives apportées par le glucose au bout de 24 h.



- : Absence de glucose
 + : Présence de glucose
 Chimio : Chimiotactisme
 NBT : Nitrobleu de tétrazolium
 Phago : Phagocytose

2.1.2.4.Calcium.

2.1.2.4.1.Mode opératoire.

Le calcium est ajouté au milieu de conservation à la concentration finale de 1 mmol/ L, sous la forme de chlorure de calcium dihydraté (Prolabo, France).

2.1.2.3.2.Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.8 \pm 0.9 \cdot 10^9 / L$; $4.2 \pm 0.6 \cdot 10^9 / L$; $17 \pm 6 \cdot 10^9 / L$; $62 \pm 13 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

La température de conservation est de $28 \pm 1 ^\circ C$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau IX.

Les figures 3a et 3b illustrent les modifications significatives apportées par le calcium.

2.1.2.4.3.Discussion.

Le calcium altère presque toutes les fonctions des PN, avec formation d'agrégats macroscopiques particulièrement importants, ce qui est en accord avec la littérature (195). Ce cation divalent pourrait accélérer l'agrégation leucocytaire (195). Aucun auteur n'a déterminé la concentration en calcium à partir de laquelle les effets toxiques deviennent détectables. Cet ion est toutefois indispensable, en faibles quantités, au fonctionnement des PN où il est impliqué, par exemple, au niveau de très nombreuses réactions enzymatiques, par exemple (10,12).

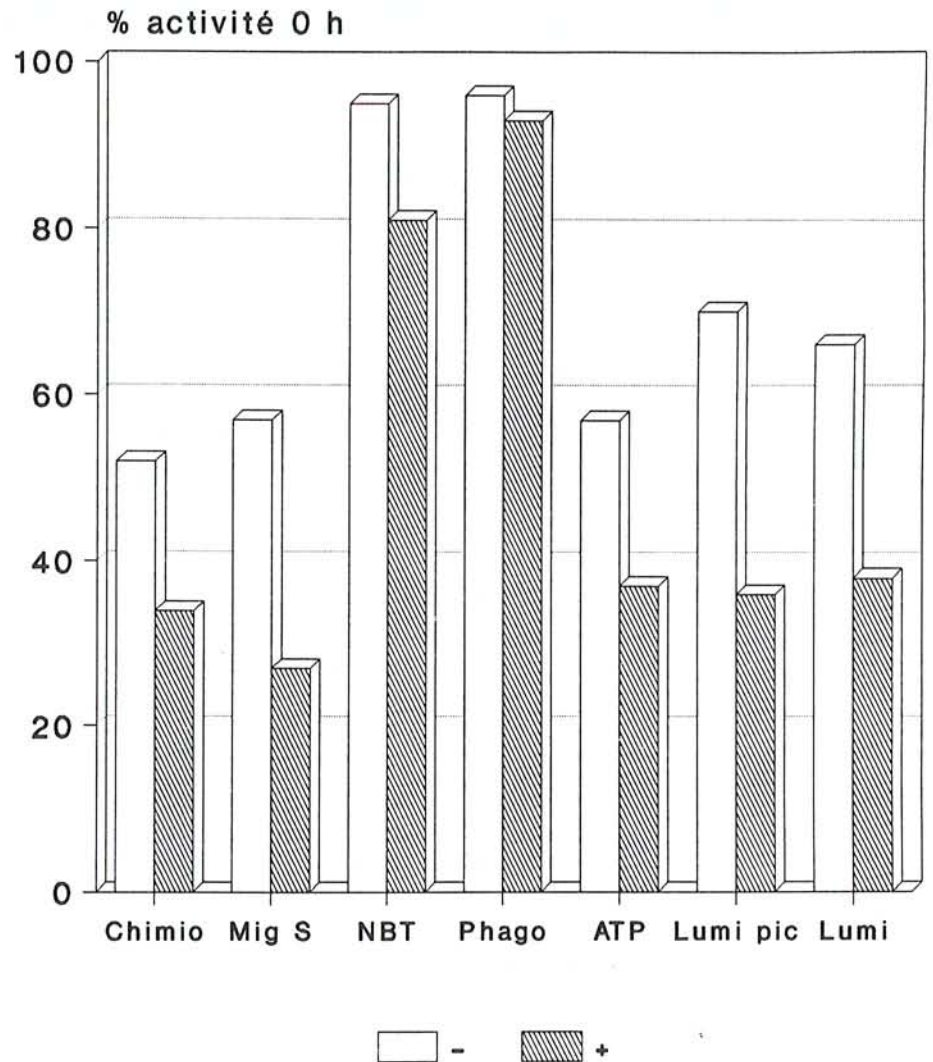
Il est à noter que le milieu de conservation utilisé, le Plasmion^R, ne contient pas de calcium, mais contient du magnésium, un autre cation divalent. Toutefois, ce dernier ne semble pas nuire de façon significative à la conservation des PN, tout du moins dans le cadre de notre étude.

Tableau IX : Conservation de 24 h en présence de calcium.

Paramètre	0 h			24 h				
	—	+		P	—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% 0h	$\bar{X} \pm SD$	% 0h
Chimiotactisme (mm)	2.12 $\pm$ 0.20		2.04 $\pm$ 0.18	NS	1.12 $\pm$ 0.07	52	0.49 $\pm$ 0.07	34
Migration spontanée (mm)	1.03 $\pm$ 0.11		0.98 $\pm$ 0.07	NS	0.59 $\pm$ 0.12	57	0.26 $\pm$ 0.04	27
NBT (%)	92 $\pm$ 2		92 $\pm$ 1	NS	87 $\pm$ 2	95	75 $\pm$ 4	81
Phagocytose (%)	98 $\pm$ 1		98 $\pm$ 1	NS	95 $\pm$ 1	96	92 $\pm$ 1	93
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	2.1 $\pm$ 0.4		1.6 $\pm$ 0.3	NS	1.2 $\pm$ 0.5	57	0.7 $\pm$ 0.2	37
ATP EG (μmol/ L)	—		—	—	—	—	—	—
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	6.0 $\pm$ 1.7		5.9 $\pm$ 1.8	NS	4.2 $\pm$ 1.0	70	2.1 $\pm$ 0.5	36
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	3.0 $\pm$ 0.6		2.9 $\pm$ 0.6	NS	1.9 $\pm$ 0.3	66	1.1 $\pm$ 0.1	38
pH	7.48 $\pm$ 0.02		7.47 $\pm$ 0.02	NS	7.20 $\pm$ 0.02	96	7.18 $\pm$ 0.02	96
						Δ 0h		Δ 0h
Lysozyme (μg/mL)	6 $\pm$ 1		6 $\pm$ 1	NS	18 $\pm$ 3	12	27 $\pm$ 3	21
Bêta-glucuronidase (US/mL)	17 $\pm$ 5		15 $\pm$ 7	NS	29 $\pm$ 1	12	55 $\pm$ 5	40

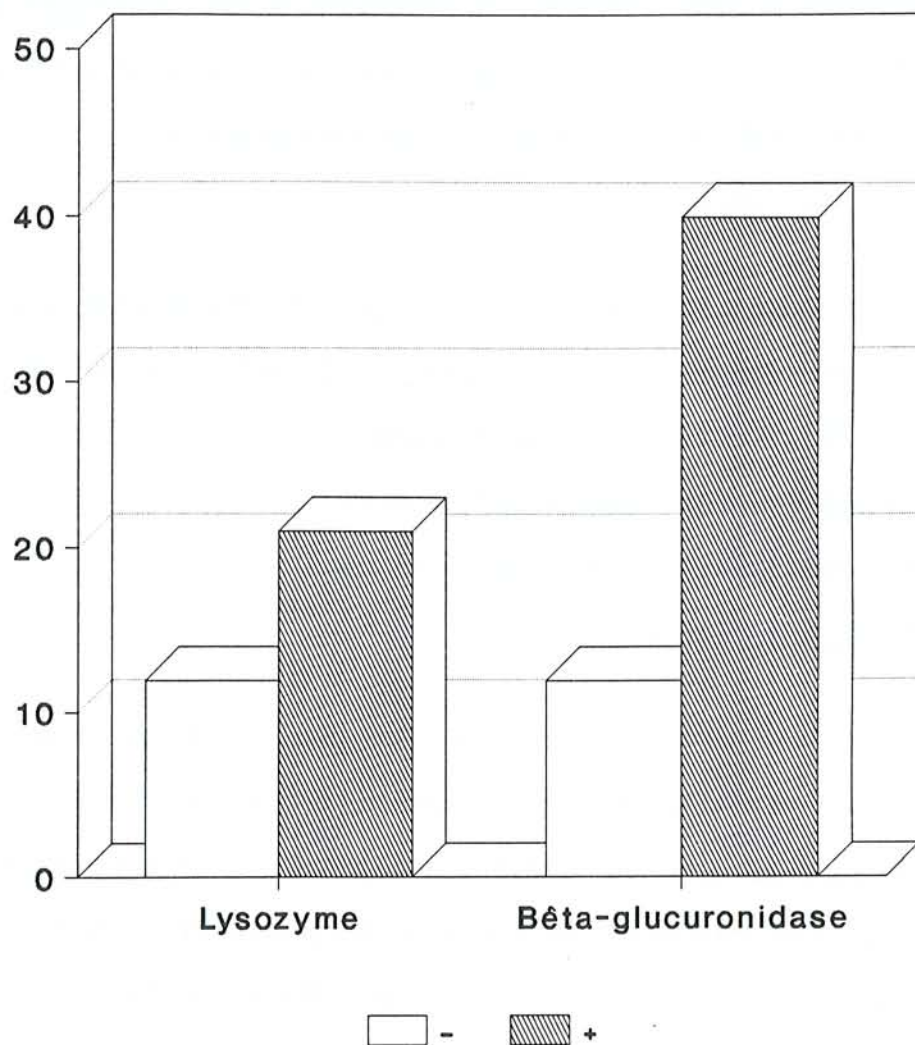
PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; Δ 0h : différence par rapport à l'activité de 0h; — : absence de calcium; + : présence de calcium; NS : non significatif; $\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart-type

Figure 3a : Modifications significatives apportées par le calcium au bout de 24 h.



- : Absence de calcium
 + : Présence de calcium
 Chimio : Chimiotactisme
 Mig S : Migration spontanée
 NBT : Nitrobleu de tétrazolium
 Phago : Phagocytose
 ATP : Adénosine triphosphate
 Lumi pic : Chimiluminescence pic
 Lumi : Chimiluminescence

Figure 3b : Modifications significatives apportées par le calcium au bout de 24 h.



- : Absence de calcium

+ : Présence de calcium

Le lysozyme est exprimé en différence de concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre les conservations de 0 h et de 24 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/mL) entre les conservation de 0 h et de 24 h.

2.1.2.5. Stérilité de la séparation des PN.

2.1.2.5.1. Mode opératoire.

Cet essai consiste à comparer une séparation de PN rigoureusement stérile (stérilisation des réactifs, manipulations sous flux laminaire) avec une séparation non stérile au niveau de la séparation sur dextran.

2.1.2.5.2. Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $7.5 \pm 2.1 \cdot 10^9 / L$; $5.8 \pm 1.3 \cdot 10^9 / L$; $23 \pm 19 \cdot 10^9 / L$; $43 \pm 12 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

La température de conservation est de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau X.

2.1.2.5.3. Discussion.

La stérilité de la procédure de séparation sur dextran n'apporte pas d'améliorations significatives. Toutefois, il est clair qu'une utilisation thérapeutique de ces PN conservés impliquerait automatiquement une stérilité totale. Ceci est d'autant plus crucial que les patients qui pourraient bénéficier d'une transfusion de PN possèdent des défenses immunitaires affaiblies (chimiothérapies lourdes, granulomatose chronique...) et sont donc particulièrement sensibles à des infections (10,12,79).

La procédure consistant à apporter les additifs de conservation un par un augmente le risque de contamination du milieu. Si le modèle expérimental pouvait aboutir à une utilisation transfusionnelle, des systèmes de connexions stériles entre la poche de conservation et le conteneur des additifs devraient être mis au point.

A notre connaissance, aucun autre auteur de la littérature examinée n'a mesuré l'influence de la stérilité de la procédure de séparation des PN sur la conservation de ceux-ci.

Tableau X : Conservation de 24 h après séparation stérile.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+	P	—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	P	$\bar{X} \pm SD$	% 0h	$\bar{X} \pm SD$	% 0h
Chimiotactisme (mm)	2.03 ± 0.10	2.12 ± 0.11	NS	1.02 ± 0.05	50	1.20 ± 0.06	56
Migration spontanée (mm)	1.01 ± 0.08	1.07 ± 0.09	NS	0.49 ± 0.04	49	0.60 ± 0.01	56
NBT (%)	92 ± 1	93 ± 1	NS	82 ± 4	89	88 ± 2	95
Phagocytose (%)	98 ± 1	98 ± 1	NS	92 ± 1	94	95 ± 2	97
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.8 ± 0.3	1.9 ± 0.3	NS	1.2 ± 0.2	67	1.4 ± 0.2	73
ATP EG (μmol/ L)	—	—	—	—	—	—	—
Chimiluminescence pic M/sec/10 ⁶ PN)	5.1 ± 1.2	5.0 ± 1.3	NS	3.2 ± 0.9	63	3.6 ± 0.9	72
Chimiluminescence intégrée M/sec/10 ⁶ PN)	3.1 ± 0.9	3.1 ± 0.8	NS	1.7 ± 0.6	55	2.2 ± 0.6	71
pH	7.56 ± 0.05	7.56 ± 0.05	NS	7.23 ± 0.04	96	7.24 ± 0.03	96
					Δ 0h		Δ 0h
Lysozyme (μg/mL)	8 ± 1	8 ± 2	NS	25 ± 6	17	14 ± 5	6
Bêta-glucuronidase (US/mL)	22 ± 8	23 ± 9	NS	43 ± 14	21	42 ± 9	19

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extra-granulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; Δ 0h : différence par rapport à l'activité

2.1.2.6. Adénosine triphosphate (ATP).

2.1.2.6.1. Mode opératoire.

L'ATP est utilisé à la concentration finale de 1 $\mu\text{mol/L}$, sous la forme d'ATP trihydrate (Boehringer, Allemagne).

2.1.2.6.2. Résultats.

La numération des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes donne les résultats suivants: $10.2 \pm 3.2 \cdot 10^9/\text{L}$; $7.1 \pm 2.6 \cdot 10^9/\text{L}$; $47 \pm 15 \cdot 10^9/\text{L}$; $68 \pm 17 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XI.

La figure 4 illustre les modifications significatives apportées par l'ATP.

2.1.2.6.3. Discussion.

Pour cet essai, l'ajout d'ATP améliore significativement le maintien du chimiotactisme (249).

L'altération du chimiotactisme a été corrélée dans un premier temps avec la chute du taux d'ATP intragranulocytaire (69). Un abaissement à moins de 60 % du taux basal d'ATP correspondrait à une diminution du chimiotactisme (211). Le chimiotactisme est un processus contractile faisant intervenir des filaments d'actine et de myosine, l'ATP servant de source d'énergie pour la contraction de ces filaments (12).

Le mécanisme d'action de l'ATP ajouté au milieu de conservation sera précisé dans des essais ultérieurs (252).

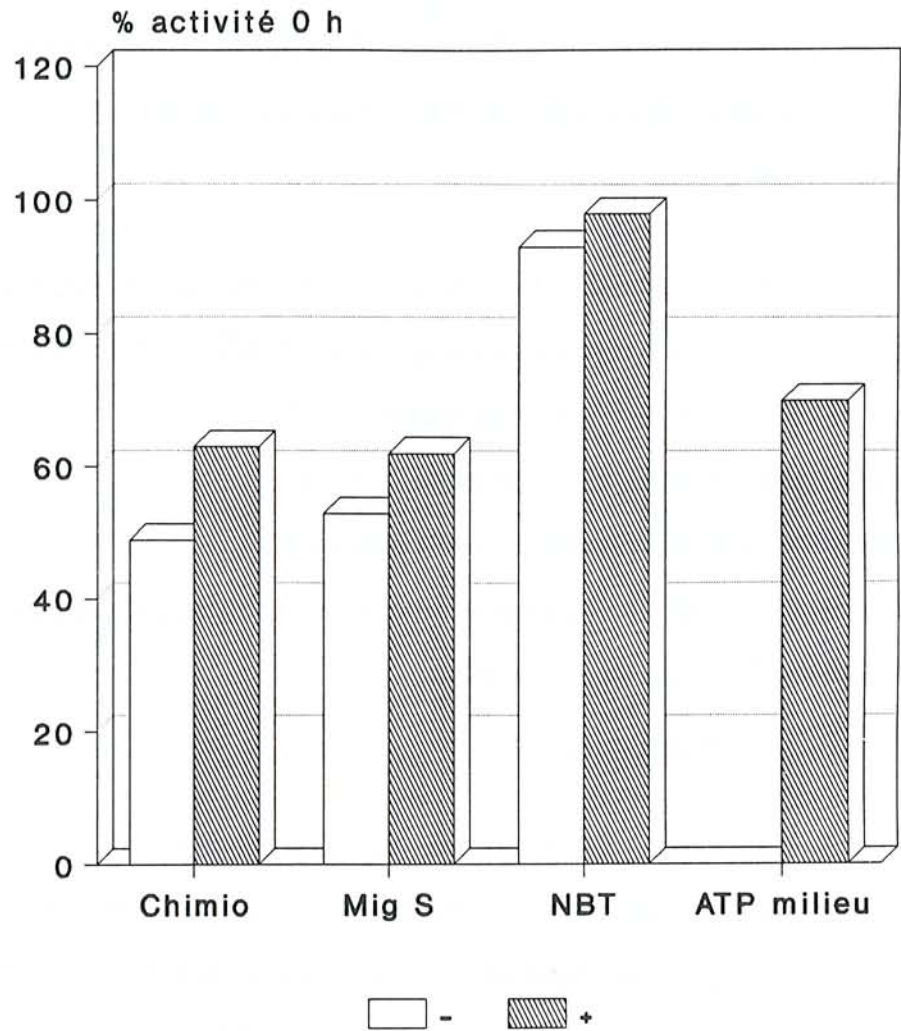
A notre connaissance, aucun autre auteur de la littérature examinée n'utilise l'ATP comme additif de conservation.

Tableau XI : Conservation de 24 h en présence d'ATP.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+		P	—		
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% 0h	% 0h
Chimiotactisme (mm)	2.24 ± 0.24	2.21 ± 0.28		NS	1.10 ± 0.06	49	63
Migration spontanée (mm)	1.10 ± 0.18	1.10 ± 0.16		NS	0.58 ± 0.02	53	62
NBT (%)	91 ± 3	93 ± 1		NS	84 ± 3	93	98
Phagocytose (%)	98 ± 1	98 ± 1		NS	96 ± 2	98	99
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.9 ± 0.4	2.1 ± 0.3		NS	1.4 ± 0.2	74	76
ATP EG (μmol/ L)	0 ± 0	0.8 ± 0.1		0.001	0 ± 0	—	70
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	3.4 ± 1.4	3.3 ± 1.2		NS	2.3 ± 0.9	68	79
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	2.0 ± 1.0	2.1 ± 1.0		NS	1.3 ± 0.7	65	81
pH	7.41 ± 0.02	7.42 ± 0.05		NS	7.17 ± 0.05	97	98
						Δ 0h	Δ 0h
Lysozyme (μg/mL)	8 ± 1	8 ± 1		NS	16 ± 4	8	5
Bêta-glucuronidase (US/mL)	29 ± 7	30 ± 9		NS	52 ± 16	23	17

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; Δ 0h : différence par rapport à l'activité

Figure 4 : Modifications significatives apportées par l'ATP au bout de 24 h.



- : Absence d'ATP

+ : Présence d'ATP

Chimio : Chimiotactisme

Mig S : Migration spontanée

NBT : Nitrobleu de tétrazolium

ATP milieu : Adénosine triphosphate dans le milieu de conservation

2.1.2.7. Agitation.

2.1.2.7.1. Mode opératoire.

Dans cet essai, nous étudions l'influence d'une agitation rotative (plateau de 20 cm de diamètre, incliné à 45°, 20 rpm) sur la conservation des PN.

2.1.2.7.2. Résultats.

La numération cellulaire des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes donne les résultats suivants: $6.6 \pm 3.3 \cdot 10^9/L$; $4.5 \pm 2.4 \cdot 10^9/L$; $17 \pm 12 \cdot 10^9/L$; $27 \pm 5 \cdot 10^9/L$, respectivement.

La température de conservation est de $29 \pm 2^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XII.

Les figures 5a et 5b illustrent les modifications significatives apportées par l'agitation du milieu de conservation.

2.1.2.7.3. Discussion.

Pour la conservation des plaquettes, l'agitation rotative s'avère indispensable, puisqu'il permet de limiter l'agrégation de celles-ci (69). Au contraire, l'agitation rotative des concentrés granulocytaires engendre une altération du chimiotactisme, une dégranulation et une lyse cellulaire accrues (69,184,185). C'est également ce que nous retrouvons au niveau expérimental (249,250). Par contre, le fait d'agiter très doucement les PN, sporadiquement (toutes les 12 h, par exemple), ne semble pas nuisible et permet peut-être de limiter leur agrégation.

Miyamoto et coll., à l'inverse des autres auteurs, trouvent que le maintien du chimiotactisme lors d'une conservation de 48 h, est meilleur lorsque les PN sont agités (183). Toutefois, leur modèle expérimental est différent du nôtre puisqu'il utilise des leucoconcentrés (buffycoats) obtenus à partir d'une poche de sang total au lieu d'une suspension de leucocytes séparés sur dextran (183).

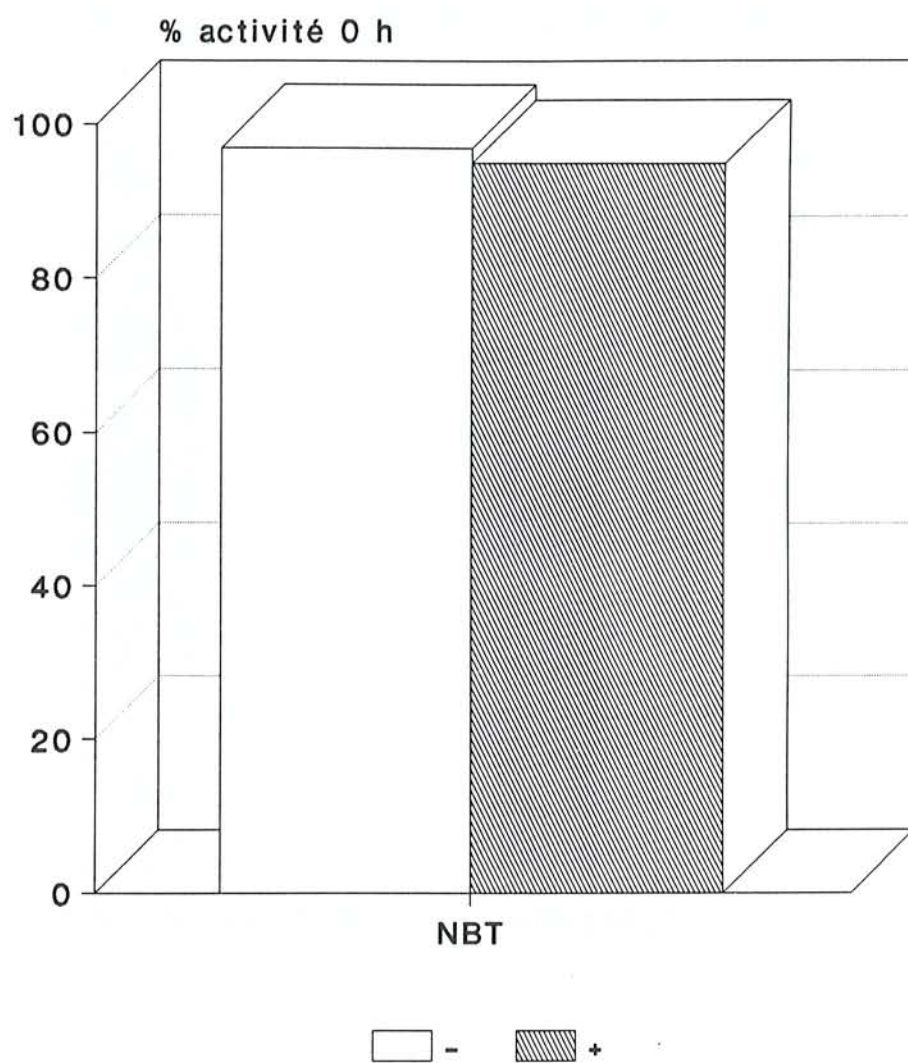
Le système d'agitation est également différent du nôtre puisqu'il s'agit d'un plateau rotatif horizontal dont le nombre de rpm est plus élevé (80 au lieu de 20).

Tableau XII : Conservation de 24 h avec agitation rotative.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+	P	—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% 0h	$\bar{X} \pm SD$	% 0h
Chimiotactisme (mm)	1.99 ± 0.13	2.04 ± 0.12	NS	1.39 ± 0.05	69	1.30 ± 0.08	63
Migration spontanée (mm)	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.06	NS	0.68 ± 0.07	69	0.62 ± 0.04	62
NBT (%)	95 ± 1	94 ± 1	NS	93 ± 2	97	89 ± 2	95
Phagocytose (%)	98 ± 1	98 ± 1	NS	97 ± 1	99	97 ± 1	99
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	2.1 ± 0.5	1.9 ± 0.2	NS	1.8 ± 0.5	86	1.3 ± 0.2	69
ATP EG (μmol/ L)	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	NS	0.7 ± 0.1	79	0.8 ± 0.1	45
Chimiluminescence pic M/sec/10 ⁶ PN)	4.3 ± 1.5	4.3 ± 1.6	NS	3.8 ± 1.3	88	3.7 ± 1.1	86
Chimiluminescence intégrée M/sec/10 ⁶ PN)	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.9	NS	2.1 ± 0.7	78	1.9 ± 0.7	70
pH	7.61 ± 0.08	7.60 ± 0.06	NS	7.29 ± 0.18	96	7.30 ± 0.14	96
				7.30 ± 0.14	$\Delta 0h$		$\Delta 0h$
Lysozyme (μg/mL)	11 ± 4	11 ± 2	NS	15 ± 4	4	24 ± 4	13
Bêta-glucuronidase (US/mL)	20 ± 7	23 ± 3	NS	26 ± 7	6	41 ± 3	18
							0.025
							0.01

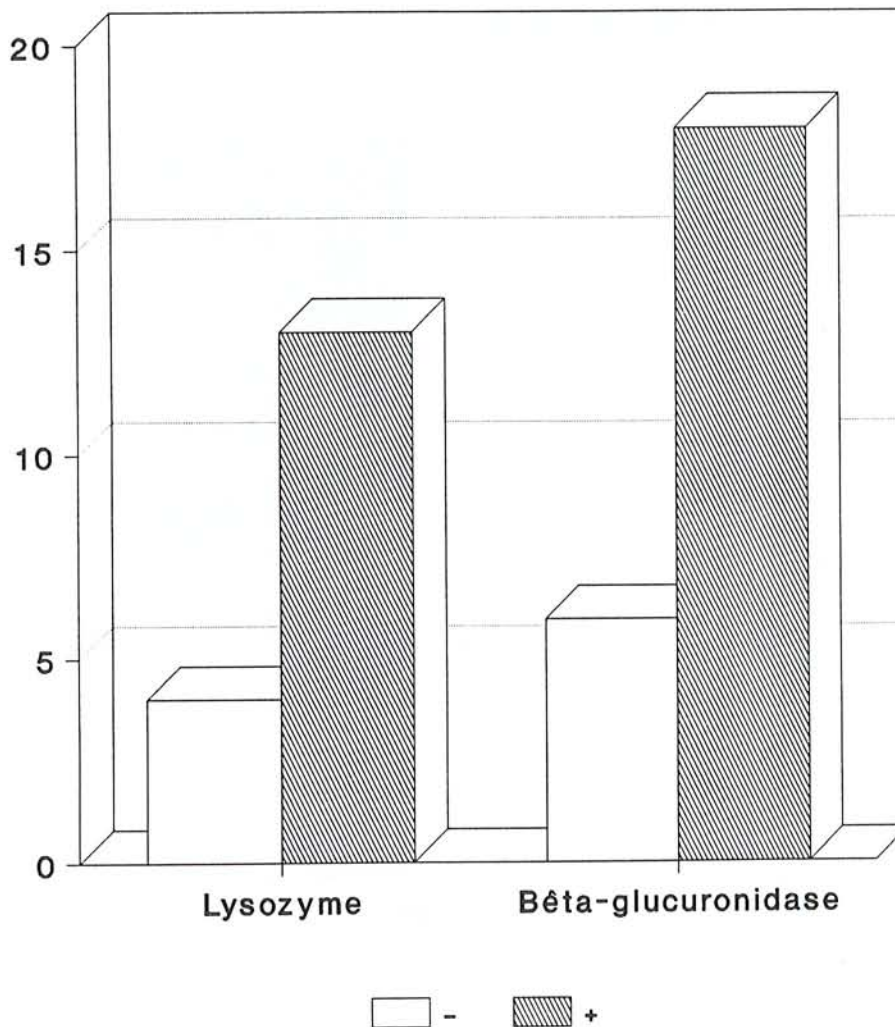
PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; $\Delta 0h$: différence par rapport à l'activité à 0h.

*Figure 5a : Modifications significatives
apportées par l'agitation au bout de 24 h.*



- : Absence d'agitation
+ : Présence d'agitation
NBT : Nitrobleu de tétrazolium

Figure 5b : Modifications significatives apportées par l'agitation au bout de 24 h.



- : Absence d'agitation

+ : Présence d'agitation.

Le lysozyme est exprimé en différence de concentration (µg/ mL) entre les conservations de 0 h et de 24 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/ mL) entre les conservations de 0 h et de 24 h.

2.1.2.8. Obscurité.

2.1.2.8.1. Mode opératoire.

Dans cet essai, nous étudions l'influence d'une exposition à la lumière (tube néon 220 v, 60 watt, placé à la distance de 60 cm de la solution de PN) sur la conservation des PN.

2.1.2.8.2. Résultats.

La numération cellulaire des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes donne les résultats suivants: $5.4 \pm 1.1 \cdot 10^9 / L$; $3.7 \pm 0.5 \cdot 10^9 / L$; $17 \pm 6 \cdot 10^9 / L$; $51 \pm 8 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

La température de conservation est de $27 \pm 1^\circ C$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XIII.

La figure 6 illustre les modifications significatives apportées par l'obscurité.

2.1.2.8.3. Discussion.

L'obscurité améliore le maintien du chimiotactisme.

L'axe général du choix des additifs utilisés dans le cadre de cette étude vise à fournir un milieu aussi stable, riche et dépourvu en facteurs agressifs vis-à-vis du PN (249). Peut-être la lumière doit-elle être considérée comme un facteur d'agression ou d'activation des PN.

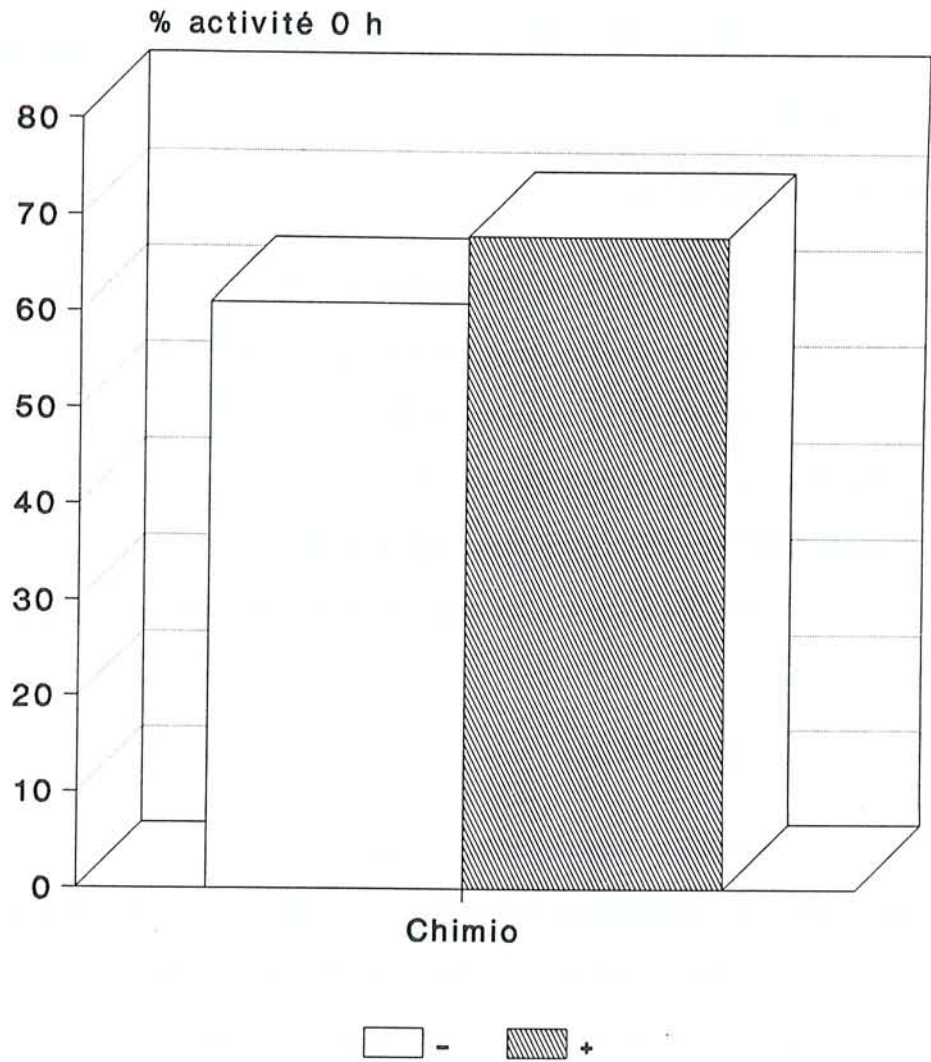
A notre connaissance, aucun auteur de la littérature examinée n'a étudié l'effet de l'obscurité sur la conservation des PN.

Tableau XIII : Conservation de 24 h à l'obscurité.

Paramètre	0 h			24 h				
	—	+	P	—		+		P
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% Oh	$\bar{X} \pm SD$	% Oh	
Chimiotactisme (mm)	2.02 ± 0.11	1.99 ± 0.14	NS	1.22 ± 0.04	61	1.36 ± 0.04	68	0.025
Migration spontanée (mm)	0.97 ± 0.04	1.00 ± 0.07	NS	0.59 ± 0.01	60	0.64 ± 0.04	64	NS
NBT (%)	93 ± 2	94 ± 2	NS	91 ± 1	98	92 ± 3	98	NS
Phagocytose (%)	98 ± 1	98 ± 1	NS	96 ± 1	98	97 ± 1	98	NS
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	2.1 ± 0.4	1.7 ± 0.3	NS	1.4 ± 0.2	67	1.4 ± 0.2	82	NS
ATP EG (μmol/ L)	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	NS	6.3 ± 12	63	7.7 ± 15	83	NS
Chimiluminescence pic M/sec/10 ⁶ PN)	5.1 ± 0.9	5.2 ± 0.7	NS	3.9 ± 0.9	77	4.3 ± 0.6	81	NS
Chimiluminescence intégrée M/sec/10 ⁶ PN)	3.1 ± 0.6	3.2 ± 0.8	NS	2.2 ± 0.5	71	2.4 ± 0.4	75	NS
pH	7.37 ± 0.01	7.38 ± 0.01	NS	7.19 ± 0.01	98	7.18 ± 0.03	97	NS
					$\Delta 0h$		$\Delta 0h$	
Lysozyme (μg/mL)	9 ± 1	8 ± 1	NS	16 ± 4	7	11 ± 2	3	NS
Bêta-glucuronidase (US/mL)	24 ± 6	25 ± 3	NS	35 ± 6	11	31 ± 2	6	NS

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; $\Delta 0h$: différence par rapport à l'activité

*Figure 6 : Modifications significatives
apportées par l'obscurité au bout de 24 h.*



- : Absence d'obscurité
+ : Présence d'obscurité
Chimio : Chimiotactisme

2.1.2.9. Vitamine C.

2.1.2.9.1. Mode opératoire.

La vitamine C (Laroscorbine^R, Roche, Suisse) est utilisée à la concentration finale de 10 $\mu\text{mol/L}$.

2.1.2.9.2. Résultats.

La numération cellulaire des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes donne les résultats suivants: $5.6 \pm 1.4 \cdot 10^9/\text{L}$; $3.9 \pm 1.1 \cdot 10^9/\text{L}$; $24 \pm 15 \cdot 10^9/\text{L}$; $26 \pm 16 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XIV.

Les figures 7a et 7b illustrent les modifications significatives apportées par la vitamine C.

2.1.2.9.3. Discussion.

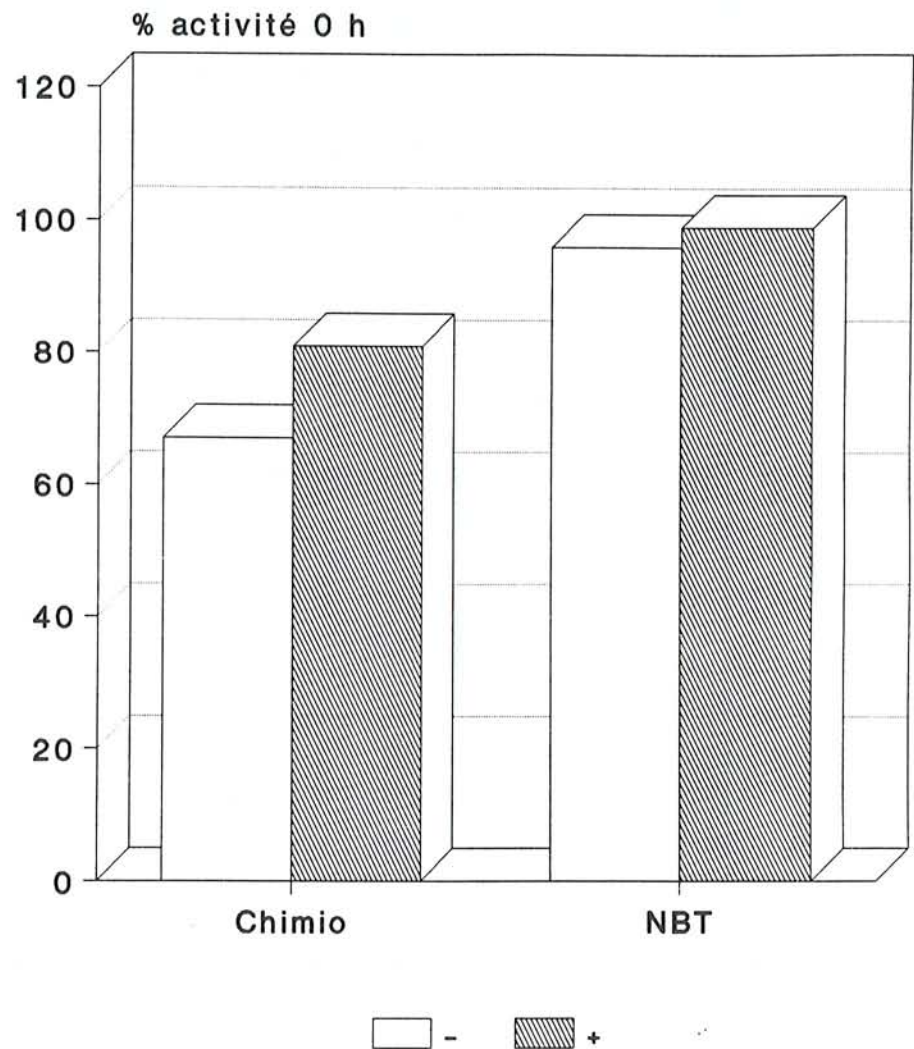
Dans notre modèle expérimental, l'ajout d'acide ascorbique améliore le maintien du chimiotactisme et du NBT; il diminue également la libération de bêta-glucuronidase. L'action bénéfique de l'acide ascorbique pourrait être expliquée par ses propriétés réductrices. En effet, au cours de son activation; le PN libère de nombreuses substances oxygénées: ions superoxyde, oxygène singulet, radicaux libres oxygénés..., qui vont s'attaquer aux protéines présentes dans le milieu, notamment en oxydant leurs groupements thiols (63-66). Le PN activé risquerait donc de s'oxyder lui-même dans le milieu de conservation. Le fait d'ajouter dans le milieu une substance réductrice capable de neutraliser l'action de ces oxydants pourrait donc être favorable à la conservation des PN. L'ensemble des auteurs de la littérature examinée estime qu'un milieu relativement réducteur semble favorable à la conservation des PN (69).

Tableau XIV : Conservation de 24 h en présence de vitamine C.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+	P	—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% 0h	$\bar{X} \pm SD$	% 0h
Chimiotactisme (mm)	2.42 ± 0.40	2.44 ± 0.30	NS	1.62 ± 0.03	67	1.97 ± 0.17	81
Migration spontanée (mm)	1.22 ± 0.23	1.19 ± 0.10	NS	0.85 ± 0.07	71	0.96 ± 0.11	81
NBT (%)	95 ± 2	96 ± 1	NS	91 ± 1	96	95 ± 1	99
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	NS	98 ± 1	98	99 ± 1	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	2.0 ± 0.4	1.5 ± 0.3	NS	1.5 ± 0.4	75	1.3 ± 0.1	86
ATP EG (μmol/ L)	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	NS	0.7 ± 0.1	69	0.7 ± 0.1	75
Chimiluminescence pic M/sec/10 ⁶ PN)	5.0 ± 2.7	4.9 ± 2.4	NS	3.9 ± 2.2	78	4.1 ± 2.0	84
Chimiluminescence intégrée M/sec/10 ⁶ PN)	2.9 ± 1.7	2.9 ± 1.4	NS	2.4 ± 1.4	83	2.6 ± 1.2	90
pH	7.51 ± 0.08	7.52 ± 0.03	NS	7.22 ± 0.11	96	7.22 ± 0.13	96
					$\Delta 0h$		$\Delta 0h$
Lysozyme (μg/mL)	10 ± 2	11 ± 2	NS	18 ± 1	8	16 ± 2	5
Bêta-glucuronidase (US/mL)	19 ± 3	19 ± 4	NS	28 ± 2	9	21 ± 4	2
							0.01

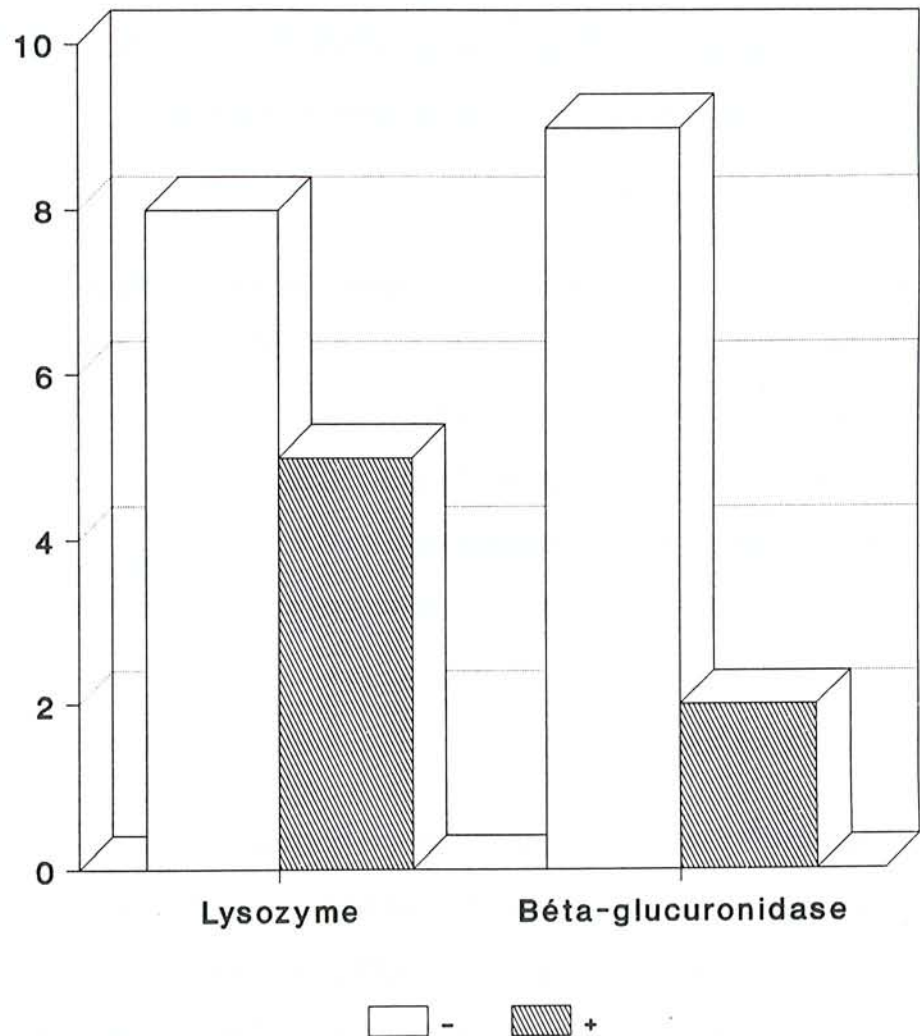
PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; $\Delta 0h$: différence par rapport à l'activité de 0h; — : absence de vitamine C; + : présence de vitamine C; NS : non significatif; $\bar{X} \pm SD$: moyenne + écart-type

Figure 7a : Modifications significatives apportées par l'acide ascorbique au bout de 24 h.



- : Absence d'acide ascorbique
 + : Présence d'acide ascorbique
 Chimio : Chimiotactisme
 NBT : Nitrobleu de tétrazolium

Figure 7b : Modifications significatives apportées par l'acide asorbique au bout de 24 h.



- : Absence d'acide asorbique

+ : Présence d'acide asorbique

Le lysozyme est exprimé en différence de concentrations (ug/ mL) entre les conservations de 0 h et de 24 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/ mL) entre les conservations de 0 h et 24 h.

2.1.2.10. Milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute).

2.1.2.10.1. Mode opératoire.

Dans cet essai, nous comparons le milieu RPMI 1640 1 X (Gibco, UK) avec le milieu Plasmion^R, pourvu des mêmes additifs de conservation.

2.1.2.10.2. Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.9 \pm 0.9 \cdot 10^9 / L$; $4.1 \pm 0.4 \cdot 10^9 / L$; $37 \pm 6 \cdot 10^9 / L$; $32 \pm 5 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

La température de conservation est de $23 \pm 1^\circ C$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XV.

Les figures 8a et 8b illustrent les modifications significatives apportées par le milieu RPMI.

2.1.2.10.3. Discussion.

Le Plasmion^R s'avère être un milieu de conservation supérieur au RPMI, dans les conditions d'utilisation étudiées, bien que certains auteurs obtiennent d'excellents résultats avec le milieu RPMI additionné de bicarbonate de sodium, de glucose et d'albumine (174). En effet, Glasser obtient un maintien du chimiotactisme de 94 % au bout de 24 h de conservation et de 60 % au bout de 48 h (174). Son modèle de conservation utilise des PN prélevés par cytophérèse à l'aide d'un Haemonetics 30, conservés stérilement à $22^\circ C$, sans agitation. Bien que notre modèle expérimental soit proche du sien, le maintien du chimiotactisme dans le milieu RPMI est nettement inférieur à celui obtenu par Glasser: 63 % au lieu de 94 %.

Le milieu Plasmion^R, outre ses performances supérieures dans le cadre de cet essai, possède l'avantage sur le RPMI d'être injectable.

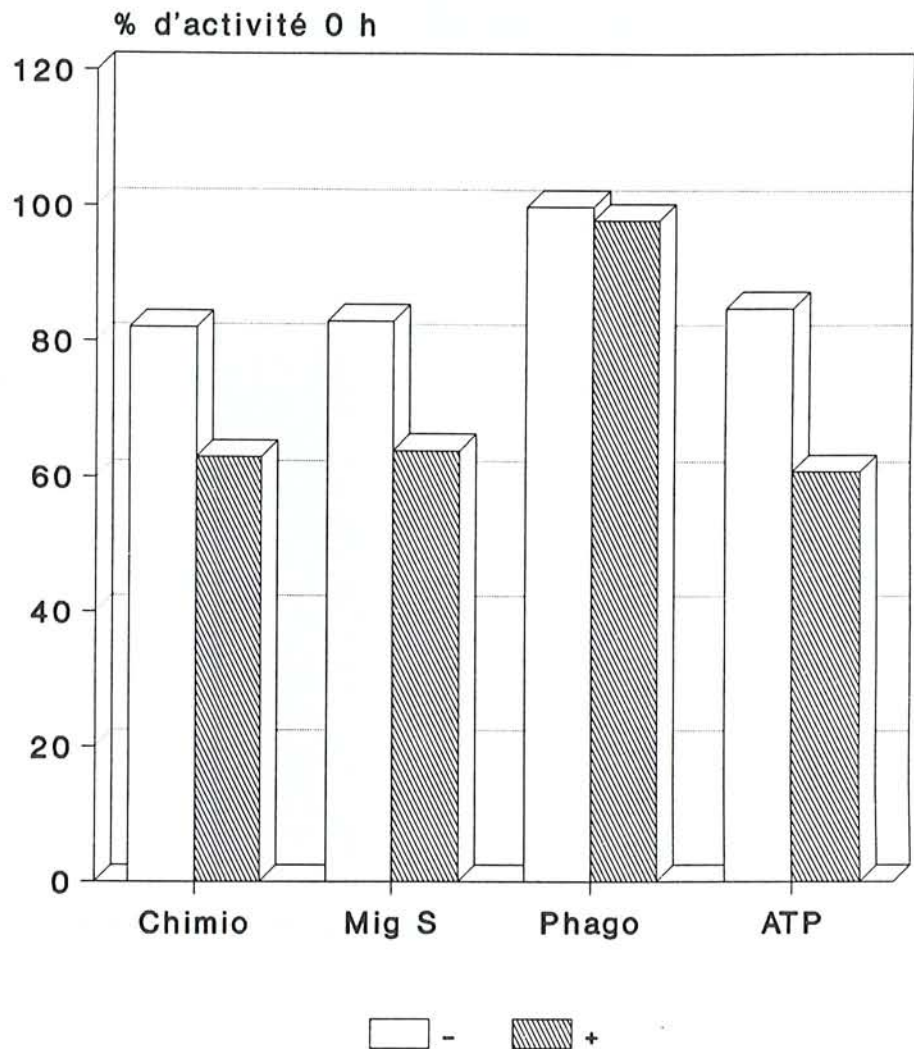
A notre connaissance, aucun auteur de la littérature examinée n'utilise le Plasmion^R comme milieu de conservation.

Tableau XV : Conservation de 24 h dans le milieu RPMI.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+		—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	P	$\bar{X} \pm SD$	% Oh	$\bar{X} \pm SD$	% Oh
Chimiotactisme (mm)	2.60 ± 0.38	2.74 ± 0.13	NS	2.15 ± 0.12	82	1.74 ± 0.13	63
Migration spontanée (mm)	1.30 ± 0.22	1.34 ± 0.13	NS	1.08 ± 0.08	83	0.84 ± 0.08	64
NBT (%)	95 ± 1	95 ± 1	NS	92 ± 2	97	89 ± 3	94
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	NS	99 ± 1	100	97 ± 1	98
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.6	NS	1.7 ± 0.2	85	1.2 ± 0.2	61
ATP EG (μmol/ L)	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	NS	0.7 ± 0.2	64	0.5 ± 0.2	55
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	3.9 ± 0.6	3.9 ± 0.6	NS	3.4 ± 0.6	87	3.1 ± 0.6	79
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	2.3 ± 0.5	2.4 ± 0.5	NS	1.9 ± 0.3	83	1.7 ± 0.2	71
pH	7.43 ± 0.07	7.51 ± 0.11	NS	7.21 ± 0.10	97	7.30 ± 0.08	97
					Δ Oh		Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	8 ± 2	8 ± 3	NS	15 ± 3	24 ± 8	24 ± 8	16
Bêta-glucuronidase (US/mL)	14 ± 7	16 ± 5	NS	24 ± 4	37 ± 2	37 ± 2	21
							NS

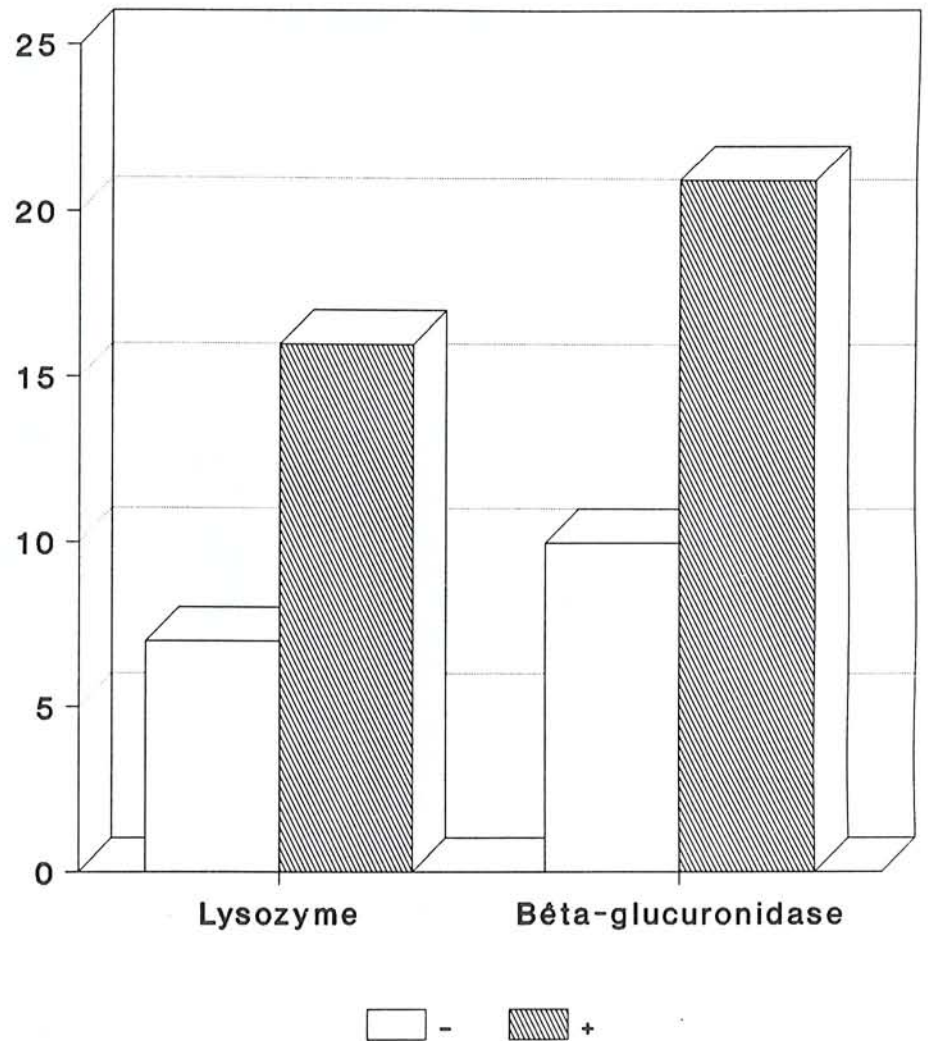
PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité

Figure 8a : Modifications significatives apportées par le milieu RPMI au bout de 24 h.



- : Plasmion
 + : RPMI
 Chimio : Chimiotactisme
 Mig S : Migration spontanée
 Phago : Phagocytose
 ATP : Adénosine triphosphate

Figure 8b : Modifications significatives apportées par le milieu RPMI au bout de 24 h.



- : Plasmion

+ : RPMI

Le lysozyme est exprimé en différence de concentration (µg/ mL) entre les conservations de 0 h et 24 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/ mL) entre les conservations de 0 h et 24 h.

2.1.2.11. Barbotage d'azote.

2.1.2.11.1. Mode opératoire.

Dans cet essai, nous faisons barboter de l'azote à une pression de 0.5 Bar dans le milieu de conservation des PN.

2.1.2.11.2. Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $4.8 \pm 0.7 \cdot 10^9/L$; $3.2 \pm 0.4 \cdot 10^9/L$; $30 \pm 10 \cdot 10^9/L$; $20 \pm 13 \cdot 10^9/L$, respectivement.

La température de conservation est de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XVI.

Les figures 9a et 9b illustrent les modifications significatives apportées par le barbotage d'azote.

2.1.2.11.3. Discussion.

Le barbotage d'azote dans le milieu de conservation apparaît comme nuisible au maintien du chimiotactisme, probablement par un effet physique des bulles. Celles-ci doivent agresser de façon permanente la membrane des PN et nuire considérablement à la stabilité du milieu de conservation.

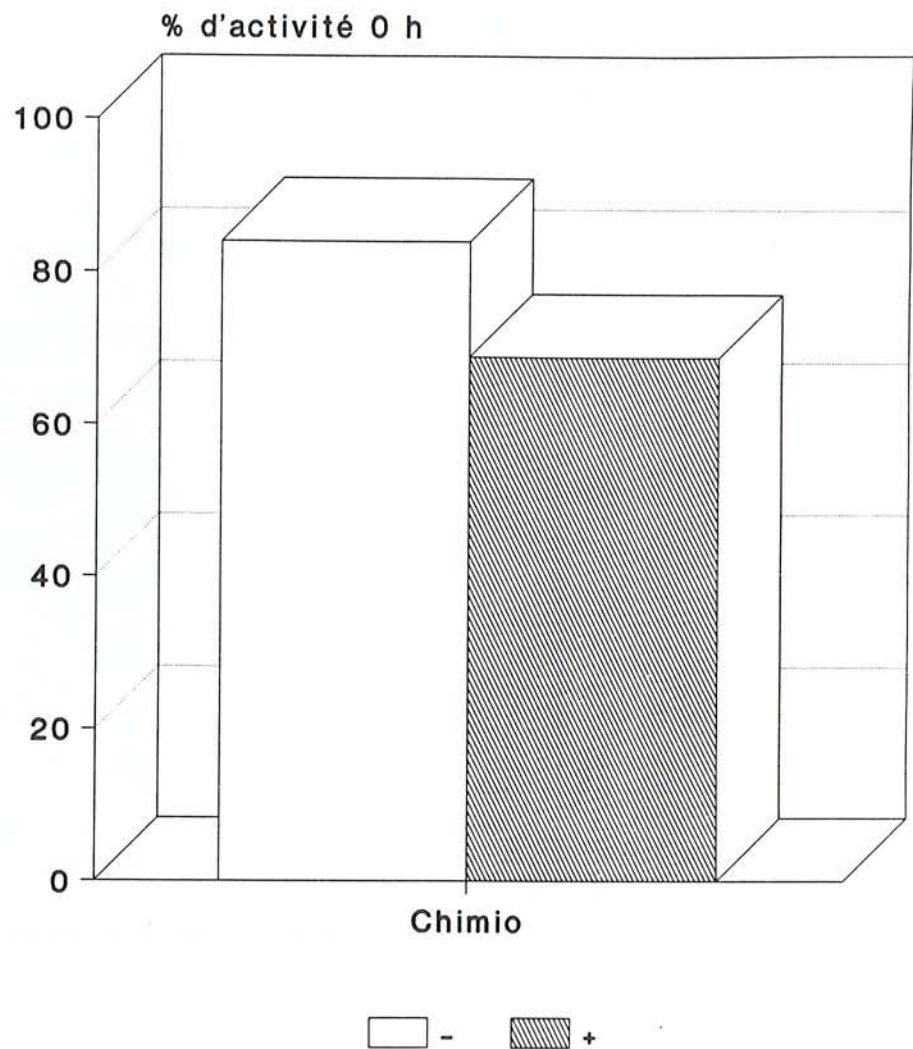
Il faut noter que des atteintes fonctionnelles sont observées avec l'azote qui possède pourtant un caractère réducteur (facteur globalement reconnu comme favorable à la conservation des PN). Aucun auteur de la littérature examinée n'a étudié l'influence des gaz (réducteurs ou oxydants) sur la conservation des PN.

Tableau XVI : Conservation de 24 h en présence d'azote.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+		P	—		
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% 0h	% 0h
Chimiotactisme (mm)	1.68 ± 0.12	1.60 ± 0.16		NS	1.41 ± 0.18	84	69
Migration spontanée (mm)	0.92 ± 0.16	0.92 ± 0.12		NS	0.78 ± 0.08	85	72
NBT (%)	95 ± 2	94 ± 1		NS	92 ± 1	97	91
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1		NS	98 ± 1	99	98
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.2		NS	1.3 ± 0.3	68	56
ATP EG (μmol/L)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1		NS	0.8 ± 0.2	82	68
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN	4.7 ± 1.7	5.1 ± 1.1		NS	3.6 ± 1.1	77	60
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN	4.1 ± 1.3	4.3 ± 0.9		NS	2.8 ± 0.9	68	44
pH	7.44 ± 0.07	7.39 ± 0.06		NS	7.20 ± 0.05	97	97
						$\Delta 0h$	$\Delta 0h$
Lysozyme (μg/mL)	6 ± 3	9 ± 4		NS	13 ± 3	7	12
Bêta-glucuronidase (US/mL)	18 ± 7	24 ± 9		NS	28 ± 5	10	17
							0.01

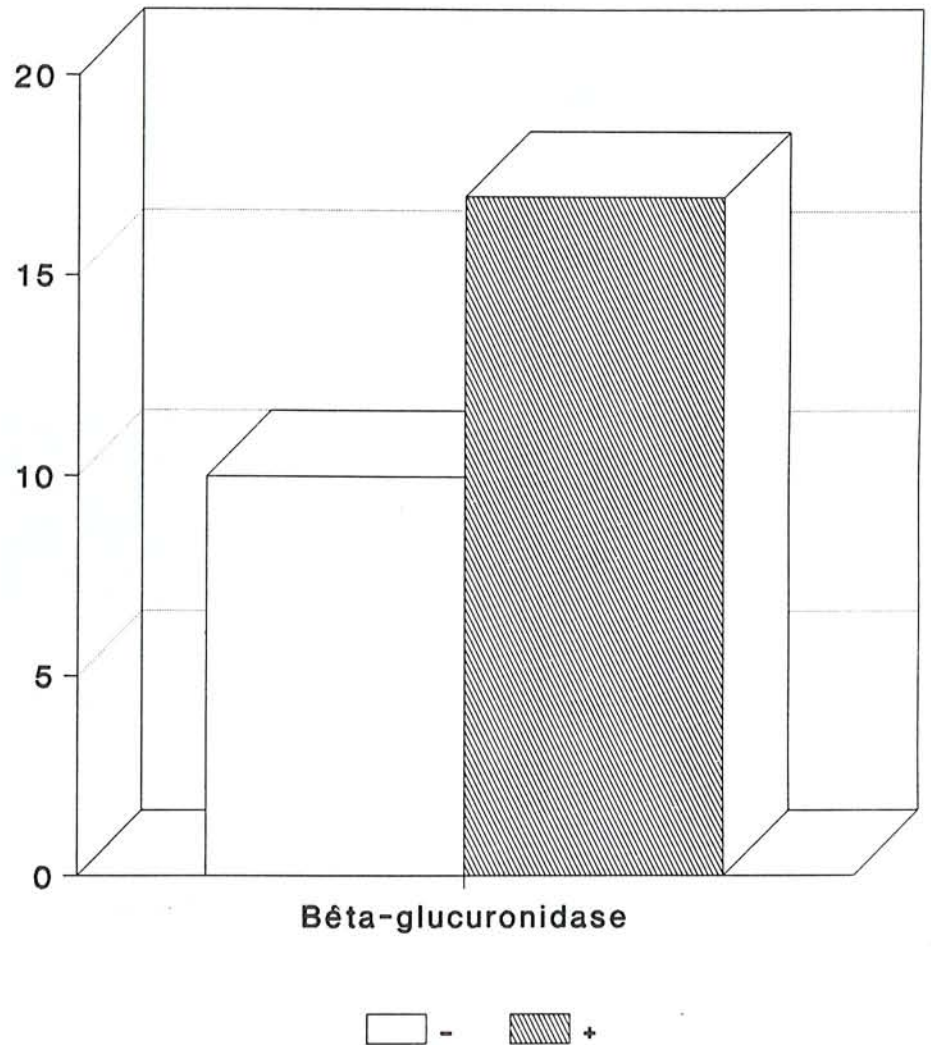
PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; $\Delta 0h$: différence par rapport à l'activité

Figure 9a : Modifications significatives apportées par le barbotage d'azote au bout de 24 h.



- : Absence d'azote
 + : Présence d'azote
 Chimio : Chimiotactisme

Figure 9b : Modifications significatives apportées par le barbotage d'azote au bout de 24 h.



- : Absence d'azote

+ : Présence d'azote

Le lysozyme est exprimé en différence de concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre les conservations de 0 h et 24 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/mL) entre les conservations de 0 h et 24 h.

2.1.2.12. Barbotage d'oxygène.

2.1.2.12.1. Mode opératoire.

Dans cet essai, nous étudions l'influence du barbotage d'oxygène à une pression de 0.25 Bar sur la conservation des PN.

2.1.2.12.2. Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $4.8 \pm 0.7 \cdot 10^9 / L$; $3.2 \pm 0.4 \cdot 10^9 / L$; $30 \pm 10 \cdot 10^9 / L$; $20 \pm 13 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

La température de conservation est de $23 \pm 1^\circ C$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XVII.

Les figures 10a et 10b illustrent les modifications significatives apportées par le barbotage d'oxygène.

2.1.2.12.3. Discussion.

Le barbotage d'oxygène dans le milieu de conservation apparaît extrêmement nuisible, vraisemblablement pour les mêmes raisons que pour le barbotage d'azote (effet physique des bulles). En outre, l'ajout d'oxygène dans le milieu de conservation risque d'augmenter la génération de radicaux oxygénés qui peuvent altérer les protéines du PN. En effet, l'oxygène est un substrat pour la NADPH oxydase, génératrice d'ion superoxyde.

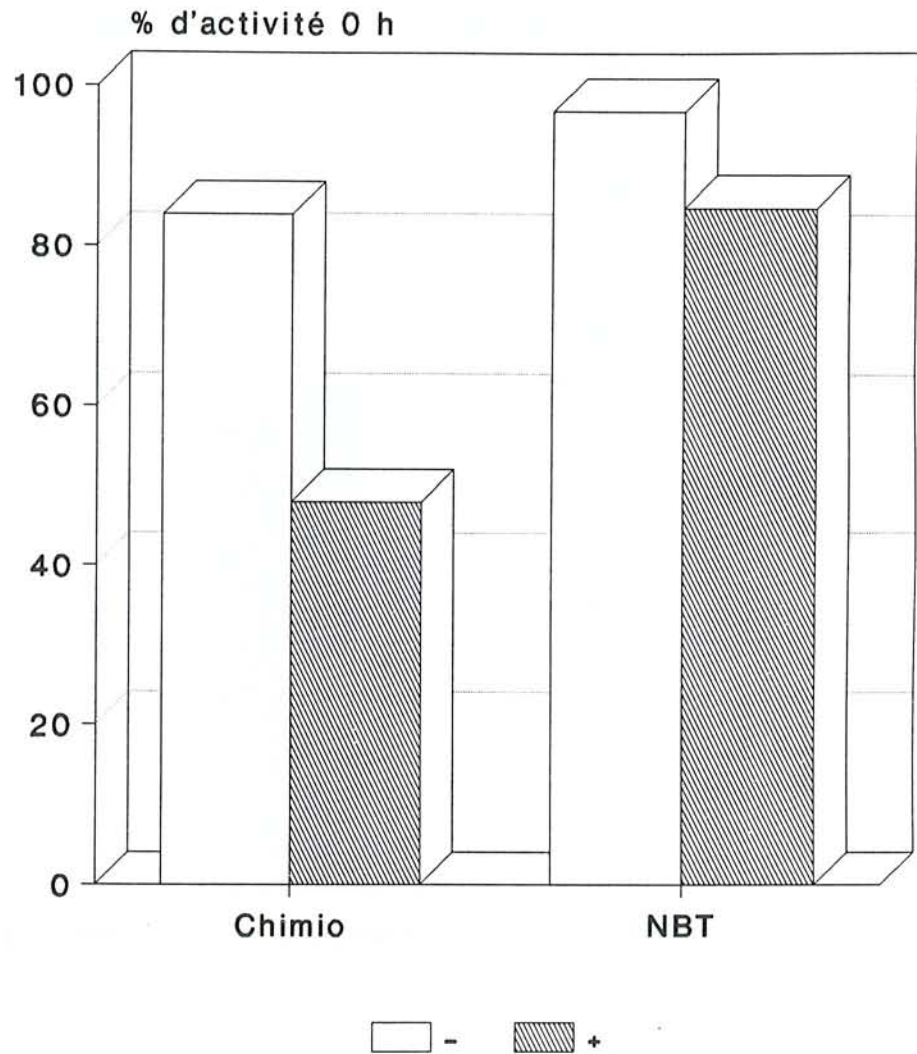
Le bullage d'oxygène cumule donc probablement deux facteurs négatifs pour la conservation des PN.

Tableau XVII : Conservation de 24 h en présence d'oxygène.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+		—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	P	$\bar{X} \pm SD$	% Oh	$\bar{X} \pm SD$	% Oh
Chimiotactisme (mm)	1.68 ± 0.12	1.72 ± 0.22	NS	1.41 ± 0.18	84	0.82 ± 0.18	48
Migration spontanée (mm)	0.92 ± 0.16	1.00 ± 0.34	NS	0.78 ± 0.08	85	0.54 ± 0.20	54
NBT (%)	95 ± 2	94 ± 1	NS	92 ± 1	97	80 ± 5	85
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	NS	98 ± 1	99	96 ± 2	97
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	NS	1.3 ± 0.3	68	0.8 ± 0.2	42
ATP EG (μmol/ L)	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	NS	0.8 ± 0.2	82	0.6 ± 0.1	70
Chimiluminescence pic M/sec/10 ⁶ PN)	4.7 ± 1.7	5.0 ± 1.7	NS	3.6 ± 1.1	77	2.4 ± 0.9	48
Chimiluminescence intégrée M/sec/10 ⁶ PN)	4.1 ± 1.3	4.7 ± 0.8	NS	2.8 ± 0.9	68	1.6 ± 1.1	34
pH	7.44 ± 0.07	7.40 ± 0.06	NS	7.20 ± 0.05	97	7.16 ± 0.05	97
				Δ Oh	Δ Oh		Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	6 ± 3	10 ± 4	NS	13 ± 3	7	28 ± 9	18
Bêta-glucuronidase (US/mL)	18 ± 7	21 ± 4	NS	28 ± 5	10	49 ± 8	28

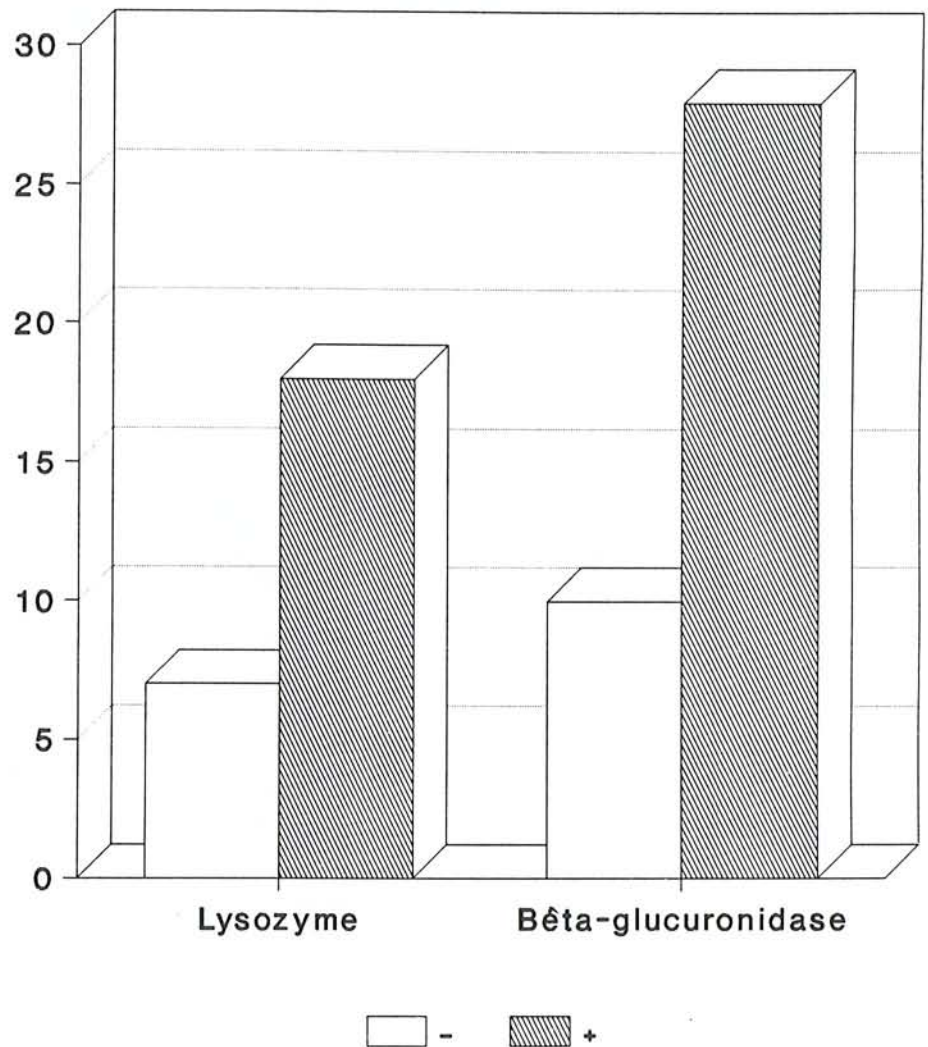
PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité

Figure 10a : Modifications significatives apportées par le barbotage d'oxygène au bout de 24 h.



- : Absence d'oxygène
 + : Présence d'oxygène
 Chimio : Chimiotactisme
 NBT : Nitrobleu de tétrazolium

Figure 10b : Modifications significatives apportées par le barbotage d'oxygène au bout de 24 h.



- : Absence d'oxygène

+ : Présence d'oxygène

Le lysozyme est exprimé en différence de concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre les conservations de 0 h et 24 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/mL) entre les conservations de 0 h et de 24 h.

2.1.2.13.NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) réduit.

2.1.2.13.1.Mode opératoire.

Ce coenzyme (Boehringer, Allemagne) est utilisé à la concentration finale de 1 $\mu\text{mol/L}$.

2.1.2.13.2.Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.1 \pm 1.4 \cdot 10^9/\text{L}$; $3.1 \pm 1.0 \cdot 10^9/\text{L}$; $30 \pm 10 \cdot 10^9/\text{L}$; $19 \pm 9 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XVIII.

La figure 11 illustre les modifications significatives apportées par le NADH.

2.1.2.13.3.Discussion.

Le NADH augmente le maintien du chimiotactisme dans notre étude. Ces résultats confirment que globalement, il semblerait qu'un milieu de conservation réducteur serait favorable à la conservation des PN (69).

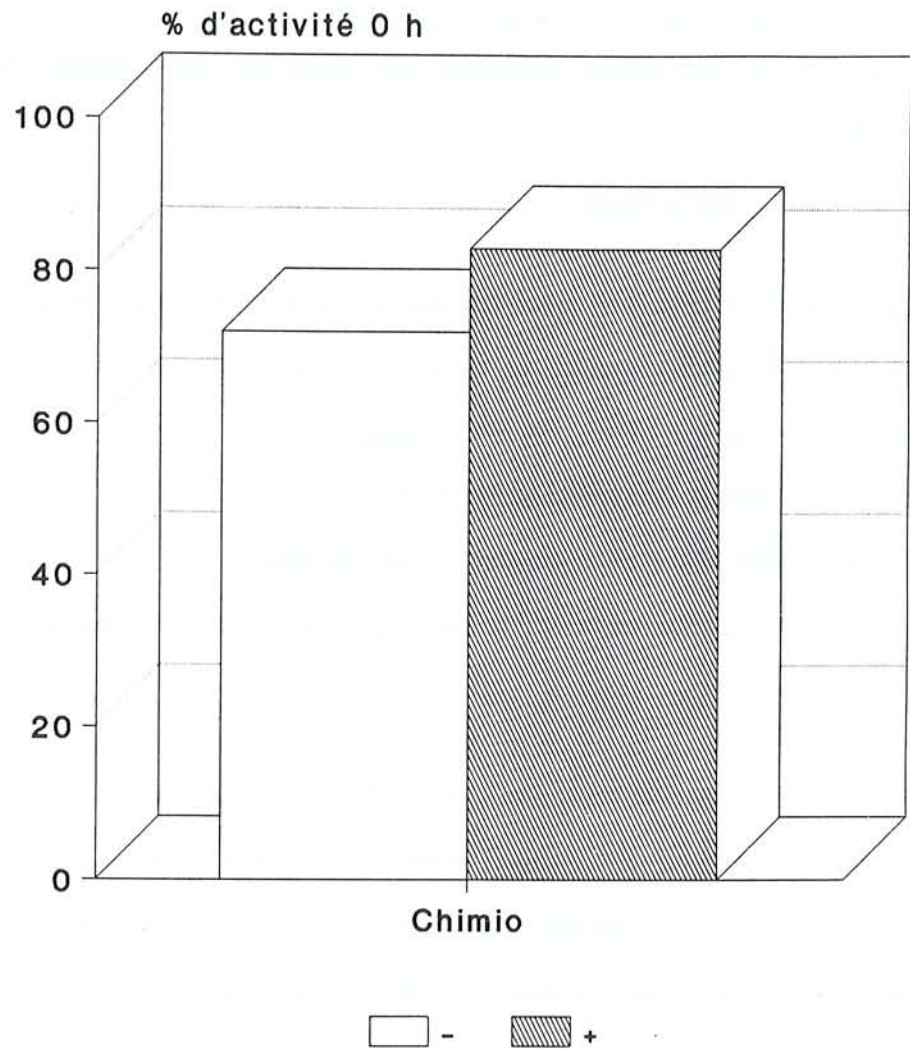
A notre connaissance, aucun autre auteur de la littérature n'utilise le NADH comme additif de conservation.

Tableau XVIII : Conservation de 24 h en présence de NADH.

Paramètre	0 h			24 h		
	—	+	P	—	+	P
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
Chimiotactisme (mm)	1.64 ± 0.12	1.76 ± 0.12	NS	1.18 ± 0.06	1.46 ± 0.12	83
Migration spontanée (mm)	0.82 ± 0.12	0.84 ± 0.12	NS	0.68 ± 0.12	0.72 ± 0.12	86
NBT (%)	94 ± 2	94 ± 2	NS	92 ± 1	91 ± 3	97
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	NS	99 ± 1	99 ± 1	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.3 ± 0.6	1.4 ± 0.5	NS	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.4	71
ATP EG (μmol/ L)	1.1 ± 0.9	1.1 ± 0.1	NS	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	80
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	3.9 ± 0.9	4.0 ± 1.2	NS	3.4 ± 0.5	3.5 ± 0.7	88
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	3.3 ± 0.8	3.5 ± 0.8	NS	2.4 ± 0.4	2.7 ± 0.5	77
pH	7.38 ± 0.04	7.40 ± 0.05	NS	7.21 ± 0.04	7.19 ± 0.04	97
				$\Delta 0h$	$\Delta 0h$	$\Delta 0h$
Lysozyme (μg/mL)	7 ± 3	7 ± 4	NS	10 ± 2	11 ± 4	4
Bêta-glucuronidase (US/mL)	22 ± 6	21 ± 5	NS	35 ± 4	35 ± 5	14

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; $\Delta 0h$: différence par rapport à l'activité

Figure 11 : Modifications significatives apportées par le NADH au bout de 24 h.



- : Absence de NADH
+ : Présence de NADH
Chimio : Chimiotactisme

2.1.2.14.NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) réduit.

2.1.2.14.1.Mode opératoire.

Ce coenzyme (Boehringer, Allemagne) est utilisé à la concentration finale de 1 $\mu\text{mol/L}$.

2.1.2.14.2.Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.1 \pm 1.4 \cdot 10^9/\text{L}$, $3.1 \pm 1.0 \cdot 10^9/\text{L}$, $30 \pm 10 \cdot 10^9/\text{L}$ et $19 \pm 9 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XIX.

La figure 12 illustre les modifications significatives apportées par le NADPH.

2.1.2.14.3.Discussion.

Le NADPH augmente le maintien de la chimiluminescence des PN. Ce résultat concorde avec celui de Ginsburg et coll. qui observent que l'ajout du NADPH dans le milieu de conservation réactive la génération d'ion superoxyde par les leucocytes, probablement suite à l'action de la NADPH oxydase leucocytaire (196).

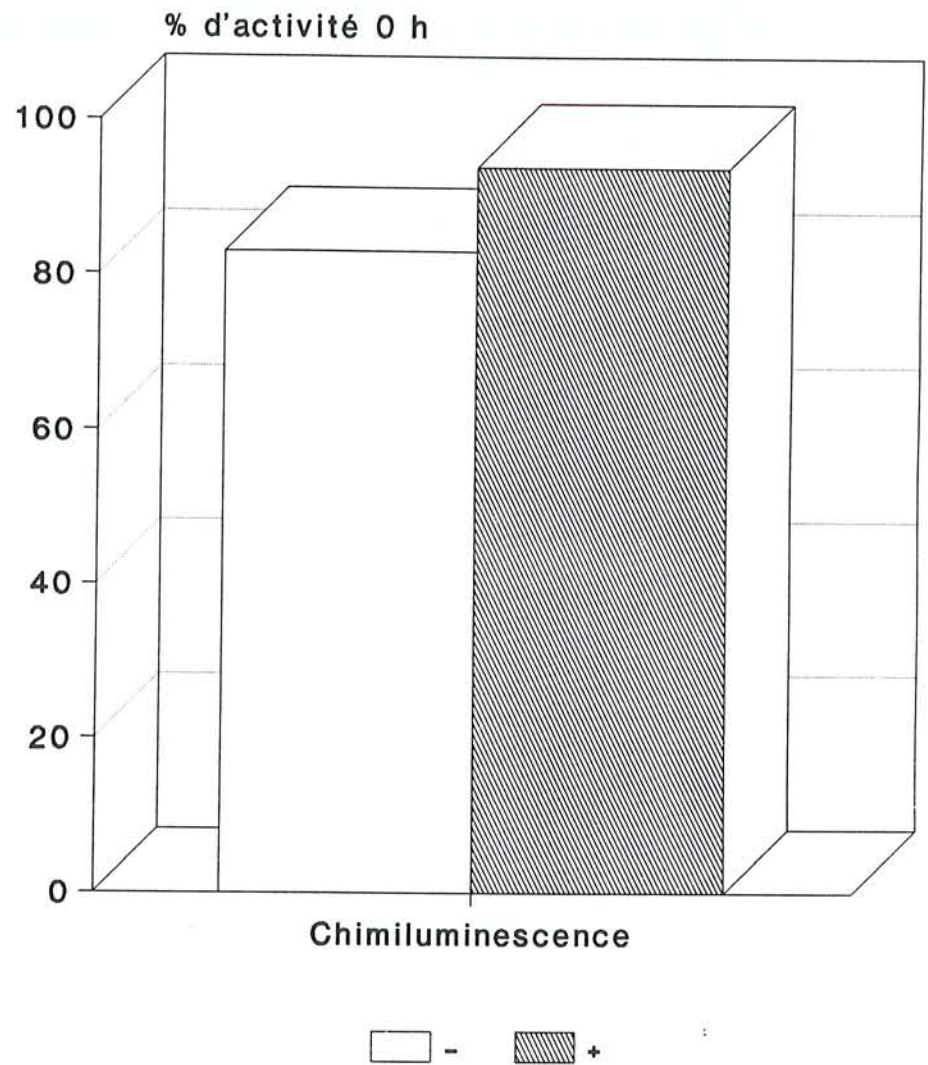
Nous n'observons plus l'effet favorable sur le maintien du chimiotactisme observé avec le NADH.

Tableau XIX : Conservation de 24 h en présence de NADPH.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+	P	—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% 0h	$\bar{X} \pm SD$	% 0h
Chimiotactisme (mm)	1.64 $\pm$ 0.12	1.80 $\pm$ 0.16	NS	1.40 $\pm$ 0.12	85	1.46 $\pm$ 0.12	89
Migration spontanée (mm)	0.80 $\pm$ 0.12	0.82 $\pm$ 0.06	NS	0.70 $\pm$ 0.12	87	0.72 $\pm$ 0.06	88
NBT (%)	94 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2	NS	92 $\pm$ 2	98	93 $\pm$ 3	98
Phagocytose (%)	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1	NS	99 $\pm$ 1	100	99 $\pm$ 1	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.1 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.4	NS	0.9 $\pm$ 0.3	82	1.0 $\pm$ 0.5	83
ATP EG (μmol/ L)	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	NS	0.8 $\pm$ 0.1	82	0.8 $\pm$ 0.1	73
Chimiluminescence pic M/sec/10 ⁶ PN)	3.7 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 0.5	NS	3.0 $\pm$ 0.2	81	3.4 $\pm$ 0.2	94
Chimiluminescence intégrée M/sec/10 ⁶ PN)	3.0 $\pm$ 1.0	3.2 $\pm$ 0.8	NS	2.5 $\pm$ 0.3	83	3.0 $\pm$ 0.2	94
pH	7.40 $\pm$ 0.05	7.39 $\pm$ 0.03	NS	7.20 $\pm$ 0.04	97	7.20 $\pm$ 0.05	97
					Δ 0h		Δ 0h
Lysozyme (μg/mL)	6 $\pm$ 4	6 $\pm$ 3	NS	9 $\pm$ 3	3	12 $\pm$ 4	6
Bêta-glucuronidase (US/mL)	23 $\pm$ 6	20 $\pm$ 6	NS	38 $\pm$ 5	15	37 $\pm$ 4	17

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; Δ 0h : différence par rapport à l'activité de 0h; — : absence de NADPH; + : présence de NADPH; NS : non significatif; $\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart-type

*Figure 12 : Modifications significatives
apportées avec le NADPH au bout de 24 h.*



- : Absence de NADPH
+ : Présence de NADPH
Lumi : Chimiluminescence

2.1.2.15.Acétate d'alpha-tocophérol.

2.1.2.15.1.Mode opératoire.

Dans cet essai, nous étudions l'influence de l'acétate d'alpha-tocophérol (Ephynal^R, Roche, Suisse) à la concentration finale de 46 $\mu\text{mol/L}$.

2.1.2.15.2.Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.7 \pm 0.8 \cdot 10^9/\text{L}$; $3.4 \pm 1.1 \cdot 10^9/\text{L}$; $30 \pm 10 \cdot 10^9/\text{L}$; $34 \pm 8 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XX.

La figure 13 illustre les modifications significatives apportées par l'acétate d'alpha-tocophérol.

2.1.2.15.3.Discussion.

Dans cet essai, l'ajout d'acétate d'alpha-tocophérol améliore le maintien du chimiotactisme. Cet additif réagit avec les radicaux libres en formant un radical tocophéryl qui, en raison de sa stabilité, arrête la chaîne de réaction radicalaire. Un abaissement du taux de tocophérol dans un tissu vivant est considéré comme une preuve de formation de radicaux au sein de celui-ci (57).

La vitamine C, ou ascorbate, réagit avec le radical tocophéryl en devenant le radical ascorbyle, également très stable (57). Cette dernière réaction explique le rôle d'anti-oxydant indirect joué par la vitamine C in vivo, et suggère que sa consommation doit augmenter lorsque se déclenche un des phénomènes liés à l'activation de l'oxygène (57). L'effet de l'acétate d'alpha-tocophérol pourrait être expliqué par une synergie d'action entre la vitamine C et celui-ci, conduisant à un effet antioxydant efficace. (57).

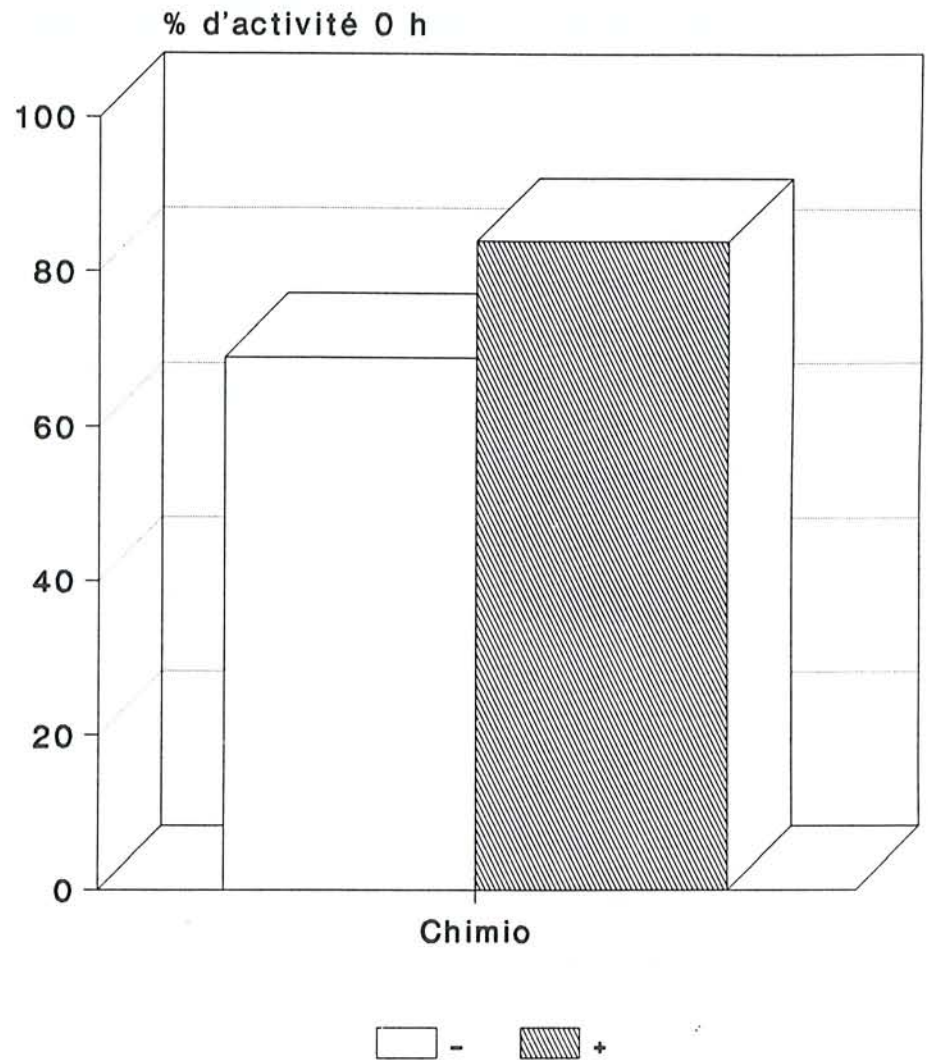
A notre connaissance, aucun auteur de la littérature examinée n'utilise ces vitamines comme additifs, dans le cadre de la conservation des PN.

Tableau XX : Conservation de 24 h en présence d'acétate d'alpha-tocophérol.

Paramètre	0 h			24 h		
	—	+	P	—		+
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% Oh	% Oh
Chimiotactisme (mm)	1.98 ± 0.14	1.88 ± 0.22	NS	1.36 ± 0.06	69	84
Migration spontanée (mm)	0.98 ± 0.08	1.02 ± 0.16	NS	0.72 ± 0.12	73	75
NBT (%)	95 ± 3	95 ± 4	NS	92 ± 1	97	99
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	NS	99 ± 1	100	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.5	NS	1.4 ± 0.1	78	80
ATP EG (μmol/ L)	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	NS	0.8 ± 0.2	75	77
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	5.1 ± 1.8	5.3 ± 1.2	NS	4.4 ± 1.3	86	89
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	4.4 ± 1.1	4.0 ± 0.7	NS	3.0 ± 0.8	68	85
pH	7.44 ± 0.03	7.41 ± 0.04	NS	7.21 ± 0.04	97	97
					Δ Oh	Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	8 ± 4	9 ± 3	NS	15 ± 2	7	3
Bêta-glucuronidase (US/mL)	31 ± 10	30 ± 5	NS	40 ± 3	9	10

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité de Oh; — : absence d'alpha-tocophérol; présence d'alpha-tocophérol. NS : non significatif; X $\pm$ SD : moyenne $\pm$ écart-type

Figure 13 : Modifications significatives apportées par l'acétate d'alpha-tocophérol au bout de 24 h.



- : Absence d'alpha-tocophérol
+ : Présence d'alpha-tocophérol
Chimio : Chimiotactisme

2.1.2.16. Antibiotiques.

2.1.2.16.1. Mode opératoire.

Dans cet essai, nous étudions l'influence de deux antibiotiques: l'ampicilline (Totapen^R, Bristol, France) et l'amikacine (Amiklin^R, Bristol, France) aux concentrations finales de 34 $\mu\text{mol/L}$ et 41 $\mu\text{mol/L}$, respectivement.

2.1.2.16.2. Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $6.1 \pm 1.5 \cdot 10^9/\text{L}$; $4.7 \pm 1.3 \cdot 10^9/\text{L}$; $60 \pm 20 \cdot 10^9/\text{L}$; $41 \pm 17 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXI.

La figure 14 illustre les modifications significatives apportées par les antibiotiques.

2.1.2.16.3. Discussion.

Les deux antibiotiques utilisés ont été choisis en raison de leur large spectre d'activité: gram négatifs pour l'amikacine, gram positifs et négatifs pour l'ampicilline, afin de limiter les contaminations bactériennes au cours de la conservation.

Dans cet essai, ils améliorent également le maintien du chimiotactisme et de la chimiluminescence (249). L'élimination de toute contamination bactérienne par ces antibiotiques serait peut-être un facteur de stabilité important (absence d'activation des PN par les bactéries), qui expliquerait les améliorations observées.

Les concentrés de PN conservés devraient être rigoureusement stériles en cas d'utilisation thérapeutique et les antibiotiques seraient donc utiles dans ce cas.

Toutefois, l'apport des additifs d'une manière stérile, par un système de connexion ad hoc, constitue probablement une mesure plus importante encore.

Il faut noter que les antibiotiques utilisés exercent une action antibactérienne, mais ne sont d'aucune utilité vis-à-vis d'autres agents pathogènes tels que des virus.

Il faudrait également tenir compte de la toxicité de ces antibiotiques si ceux-ci devaient être utilisés dans un cadre thérapeutique (phénomènes allergiques, par exemple).

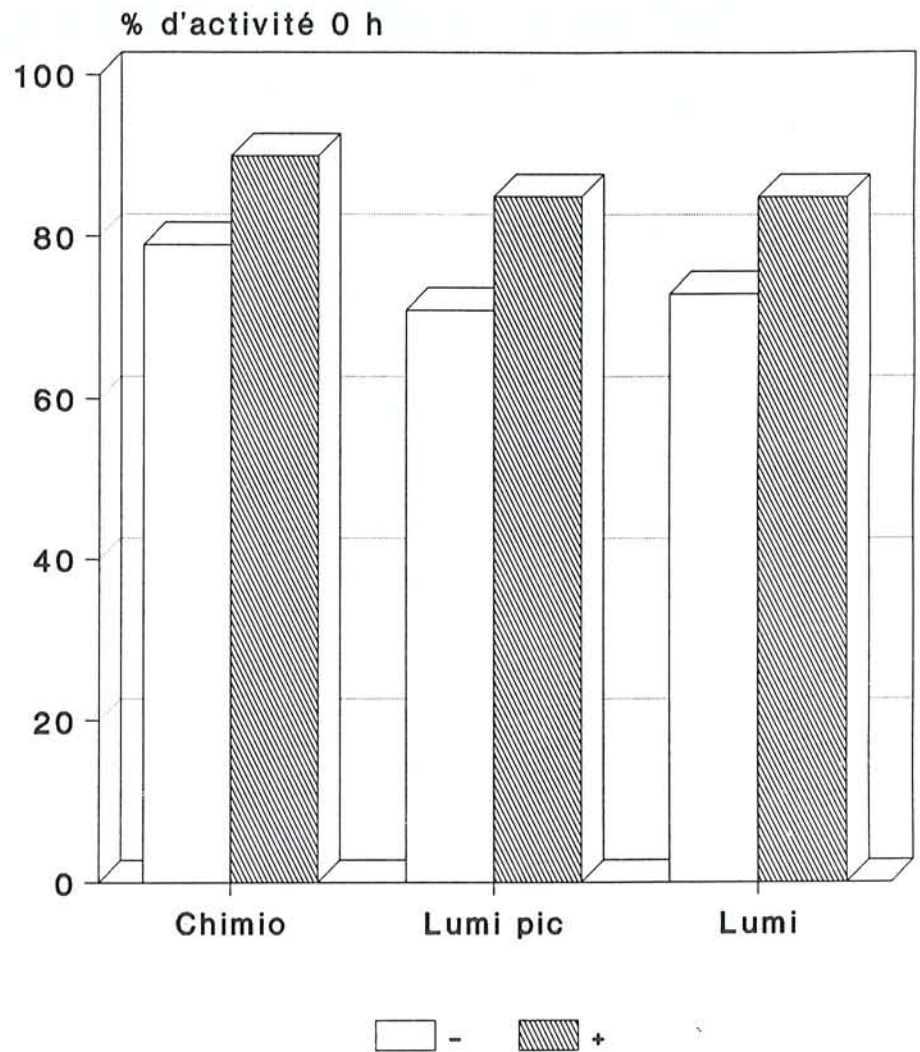
A notre connaissance, aucun auteur de la littérature examinée n'utilise les antibiotiques comme additif de conservation.

Tableau XXI : Conservation de 24 h en présence d'antibiotiques.

Paramètre	0 h			24 h		
	—	+	P	—		+
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% Oh	% Oh
Chimiotactisme (mm)	2.12 $\pm$ 0.22	2.08 $\pm$ 0.06	NS	1.68 $\pm$ 0.06	79	90
Migration spontanée (mm)	1.16 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.12	NS	0.82 $\pm$ 0.12	71	86
NBT (%)	90 $\pm$ 3	92 $\pm$ 4	NS	88 $\pm$ 1	98	99
Phagocytose (%)	99 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2	NS	98 $\pm$ 1	99	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	2.2 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.2	NS	1.7 $\pm$ 0.4	77	80
ATP EG (μmol/ L)	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	NS	1.0 $\pm$ 0.1	84	85
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	3.1 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.8	NS	2.2 $\pm$ 0.2	71	85
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	2.6 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 1.1	NS	1.9 $\pm$ 0.5	73	85
pH	7.42 $\pm$ 0.07	7.40 $\pm$ 0.03	NS	7.21 $\pm$ 0.05	97	98
					Δ Oh	Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	7 $\pm$ 2	8 $\pm$ 4	NS	10 $\pm$ 2	3	2
Bêta-glucuronidase (US/mL)	24 $\pm$ 7	27 $\pm$ 5	NS	41 $\pm$ 12	17	9

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité de Oh; — : absence d'antibiotiques; + : présence d'antibiotiques; NS : non significatif; $\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart-type

Figure 14 : Modifications significatives apportées par les antibiotiques.



- : Absence d'antibiotiques
 + : Présence d'antibiotiques
 Chimio : Chimiotactisme
 Lumi pic : Chimiluminescence pic
 Lumi : Chimiluminescence

2.1.2.17.Corticoides.

2.1.2.17.1.Mode opératoire.

Dans cet essai, nous utilisons l'acétate d'hydrocortisone (Hydrocortisone injectable, Roussel, France) à la concentration finale de 300 $\mu\text{mol/L}$.

2.1.2.17.2.Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $4.9 \pm 0.6 \cdot 10^9/\text{L}$; $3.2 \pm 1.1 \cdot 10^9/\text{L}$; $50 \pm 40 \cdot 10^9/\text{L}$; $33 \pm 12 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $23 \pm 3^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXII.

2.1.2.17.3.Discussion.

L'ajout de corticoides dans le milieu de conservation n'apporte aucune amélioration, dans le cadre de cette étude.

Les stéroïdes sont habituellement utilisés comme prémédication pour augmenter le rendement des cytophères (69). Ce sont des agents anti-inflammatoires qui pourraient potentiellement perturber le métabolisme des PN, mais ceci n'est pas observé pour les doses utilisées pour les prémédications (123,129,133,134). Un effet bénéfique intéressant pourrait être expliqué par leurs propriétés de stabilisation membranaire et par une limitation de l'effet agrégant du C5a vis-à-vis des PN.

Contreras avait utilisé ce type d'additif, à la même concentration que celle utilisée pour cet essai (179). Toutefois, l'effet favorable de l'hydrocortisone n'était significatif que pour la viabilité cellulaire, paramètre peu sensible pour détecter les altérations des PN (179). Cet auteur n'avait pas mesuré les fonctions des PN retenues dans le cadre de cet essai.

Tableau XXII : Conservation de 24 h en présence de corticoïdes.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+		—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% Oh	$\bar{X} \pm SD$	% Oh
Chimiotactisme (mm)	1.64 ± 0.06	1.72 ± 0.06		1.36 ± 0.12	83	1.42 ± 0.08	83
Migration spontanée (mm)	0.88 ± 0.08	0.82 ± 0.12		0.76 ± 0.08	86	0.82 ± 0.12	88
NBT (%)	95 ± 4	94 ± 2		92 ± 2	97	92 ± 1	98
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1		99 ± 1	100	99 ± 1	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.6 ± 0.7	1.5 ± 0.4		1.1 ± 0.2	69	1.1 ± 0.3	73
ATP EG (μmol/ L)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1		0.9 ± 0.1	84	0.9 ± 0.2	81
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	4.7 ± 1.0	4.5 ± 0.8		3.8 ± 0.8	81	3.5 ± 0.5	78
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	4.2 ± 1.1	4.0 ± 0.6		3.1 ± 0.7	74	3.0 ± 0.3	75
pH	7.43 ± 0.05	7.41 ± 0.04		7.19 ± 0.06	97	7.20 ± 0.07	97
					Δ Oh		Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	6 ± 2	7 ± 3		11 ± 3	5	11 ± 4	4
Bêta-glucuronidase (US/mL)	20 ± 6	24 ± 8		34 ± 6	14	36 ± 5	8

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh:Δ Oh : différence par rapport à l'activité à 0 h.

2.1.2.18.Centrifugation à basse vitesse (220 g).

2.1.2.18.1.Mode opératoire.

Dans cet essai, nous étudions l'influence d'une centrifugation de 10 min à 220 g, à température ambiante, visant à réduire la contamination plaquettaire, sur la conservation des PN.

2.1.2.18.2.Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.1 \pm 1.4 \cdot 10^9/L$; $3.1 \pm 1.0 \cdot 10^9/L$; $30 \pm 10 \cdot 10^9/L$; $19 \pm 9 \cdot 10^9/L$, respectivement. La contamination plaquettaire pour un même groupe de prélèvements, mais non traités par cette centrifugation est de $30 \pm 9 \cdot 10^9/L$.

La température de conservation est de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXIII.

2.1.2.18.3.Discussion.

La diminution d'un tiers (environ) de la contamination plaquettaire par centrifugation à basse vitesse, n'apporte aucune amélioration dans le cadre de cet essai.

L'effet nuisible de la contamination plaquettaire dépend probablement de la quantité de plaquettes présentes dans le milieu de conservation. La diminution du taux de plaquettes par la technique de centrifugation à basse vitesse n'est peut-être pas suffisante, ce qui explique peut-être les résultats non significatifs observés. D'autre part, une conservation de plus longue durée pourrait éventuellement mettre en évidence une éventuelle tendance à l'agrégation des PN initiée par les plaquettes ou une consommation des additifs par les plaquettes.

A notre connaissance, aucun auteur de la littérature examinée n'a tenté de diminuer la contamination plaquettaire par cette méthode pour améliorer la conservation des PN.

Tableau XXIII : Conservation de 24 h avec diminution de la contamination plaquettaire.

Paramètre	0 h			24 h		
	—	+	P	—		+
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% Oh	% Oh
Chimiotactisme (mm)	2.12 ± 0.06	2.02 ± 0.12	NS	1.68 ± 0.12	79	77
Migration spontanée (mm)	1.08 ± 0.16	0.98 ± 0.12	NS	0.78 ± 0.06	72	70
NBT (%)	97 ± 2	95 ± 2	NS	94 ± 1	97	98
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	NS	99 ± 1	100	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.5	NS	1.0 ± 0.2	77	73
ATP EG (μmol/ L)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	NS	0.9 ± 0.1	83	76
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	4.1 ± 0.8	4.4 ± 1.0	NS	3.0 ± 0.9	73	75
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	3.4 ± 0.5	3.3 ± 0.9	NS	2.5 ± 0.7	74	76
pH	7.45 ± 0.02	7.42 ± 0.05	NS	7.18 ± 0.04	96	97
					Δ Oh	Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	8 ± 4	10 ± 5	NS	13 ± 5	5	5
Bêta-glucuronidase (US/mL)	27 ± 6	29 ± 4	NS	39 ± 4	12	13

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité de Oh; — : absence de centrifugation; + : présence de centrifugation; NS : non significatif; $\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart-type

2.1.2.19.Essai relatif à la composition de récipients.

2.1.2.19.1.Mode opératoire.

Dans cet essai, nous comparons la conservation de PN contenus dans un tube en polypropylène (Falcon 2059, Becton Dickinson, USA) à celle de PN conservés dans les mêmes conditions, mais dans un tube en polystyrène (Falcon 2027, Becton Dickinson, USA). Le mode opératoire est détaillé dans l'annexe 9.

2.1.2.19.2.Résultats.

La numération cellulaire des leucocytes, des PN, des érythrocytes et des plaquettes donne les résultats suivants: $7.0 \pm 1.5 \cdot 10^9 / L$; $5.1 \pm 1.1 \cdot 10^9 / L$; $50 \pm 20 \cdot 10^9 / L$; $32 \pm 13 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

La température de conservation est de $24 \pm 2^\circ C$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXIV.

2.1.2.19.3.Discussion.

Le polystyrène n'offre pas d'avantage par rapport au polypropylène, dans le cadre de cet essai.

Le type de conteneur est néanmoins un choix important puisque le chlorure de polyvinyle (PVC) donne de meilleurs résultats de conservation que les polyoléfines, par exemple (179,180).

D'autre part, il semblerait qu'une éventuelle supériorité d'un conteneur ne soit manifeste que pour des conservations de longue durée, ce qui n'est pas le cas ici (24 h).

Tableau XXIV : Conservation de 24 h avec deux types de réipients.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+	P	—		+	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% Oh	$\bar{X} \pm SD$	% Oh
Chimiotactisme (mm)	2.02 ± 0.06	2.08 ± 0.06	NS	1.55 ± 0.06	77	1.60 ± 0.12	77
Migration spontanée (mm)	0.98 ± 0.12	0.98 ± 0.06	NS	0.82 ± 0.12	84	0.84 ± 0.18	88
NBT (%)	90 ± 7	93 ± 2	NS	89 ± 2	99	90 ± 2	97
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	NS	99 ± 1	100	99 ± 1	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.5	NS	1.3 ± 0.3	76	1.2 ± 0.4	75
ATP EG (μmol/ L)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	NS	0.8 ± 0.1	78	0.8 ± 0.1	77
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	4.5 ± 1.0	4.4 ± 0.8	NS	3.9 ± 0.8	87	3.7 ± 0.7	84
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	3.8 ± 0.7	3.7 ± 0.9	NS	3.1 ± 1.0	82	2.9 ± 0.5	78
pH	7.43 ± 0.05	7.41 ± 0.03	NS	7.19 ± 0.02	97	7.21 ± 0.04	97
					Δ Oh		Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	8 ± 4	8 ± 4	NS	13 ± 5	5	15 ± 5	7
Béta-glucuronidase (US/mL)	17 ± 8	19 ± 7	NS	35 ± 12	18	38 ± 8	19

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité de Oh; — : polypyrène; + : polystyrène; NS : non significatif; $\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart-type

2.1.2.20. Antiprotéases (fluorure de sulfonyl-phenylméthane ou PMSF).

2.1.2.20.1. Mode opératoire.

Dans cet essai, nous étudions l'influence du PMSF Merck, Allemagne) utilisé à la concentration finale de 100 $\mu\text{mol/L}$, sur la conservation des PN.

2.1.2.20.2. Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.5 \pm 0.7 \cdot 10^9/\text{L}$; $3.9 \pm 0.9 \cdot 10^9/\text{L}$; $40 \pm 20 \cdot 10^9/\text{L}$; $23 \pm 6 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

La température de conservation est de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXV.

2.1.2.20.3. Discussion.

L'ajout de PMSF n'apporte aucune amélioration, dans le cadre de notre étude.

Ce type d'additif avait été testé pour observer si une éventuelle stabilisation des protéines (de membrane, par exemple) pouvait apporter une amélioration de la conservation des PN.

L'innocuité de ce produit en cas d'une éventuelle utilisation thérapeutique n'est pas prouvée.

A notre connaissance, hormis les corticoïdes, aucun auteur de la littérature examinée n'utilise d'additif en vue de stabiliser les protéines de PN au cours de la conservation de ceux-ci.

Tableau XXV : Conservation de 24 h en présence de PMSF.

Paramètre	0 h			24 h			
	—	+		P	—		
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% 0h	% 0h
Chimiotactisme (mm)	1.82 ± 0.12	1.88 ± 0.06		NS	1.44 ± 0.12	79	77
Migration spontanée (mm)	0.86 ± 0.12	0.92 ± 0.06		NS	0.72 ± 0.06	84	78
NBT (%)	95 ± 2	95 ± 3		NS	94 ± 1	99	98
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1		NS	99 ± 1	100	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.4		NS	1.1 ± 0.2	73	79
ATP EG (μmol/ L)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1		NS	0.8 ± 0.1	91	79
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	3.5 ± 1.0	3.7 ± 1.1		NS	2.8 ± 0.5	80	78
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	2.7 ± 0.9	2.8 ± 0.6		NS	2.0 ± 0.3	74	75
pH	7.45 ± 0.04	7.39 ± 0.03		NS	7.19 ± 0.03	97	98
						$\Delta 0h$	$\Delta 0h$
Lysozyme (μg/mL)	6 ± 3	7 ± 2		NS	11 ± 5	5	4
Bêta-glucuronidase (US/mL)	19 ± 5	21 ± 7		NS	31 ± 6	12	16

PN : polynucléaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % 0h : pourcentage de l'activité à 0h; $\Delta 0h$: différence par rapport à l'activité

de 0h; — : absence de PMSF; + : présence de PMSF; NS : non significatif; $\bar{X} \pm SD$: moyenne $\pm$ écart-type

2.1.2.21. Désoxyribonucléase 1 (DNase 1).

2.1.2.21.1. Mode opératoire.

Dans cet essai, nous étudions l'influence d'une désoxyribonucléase 1 (Sigma, USA) à la concentration de 25 UI/ml sur la conservation des PN.

2.1.2.21.2. Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $6.1 \pm 1.5 \cdot 10^9/L$; $4.9 \pm 1.2 \cdot 10^9/L$; $50 \pm 10 \cdot 10^9/L$; $37 \pm 13 \cdot 10^9/L$, respectivement.

La température de conservation est de $22 \pm 3^\circ\text{C}$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXVI.

2.1.2.21.3. Discussion.

L'utilisation de la DNase 1 n'apporte aucune amélioration, dans le cadre de cet essai.

La DNase retarderait, voire éliminerait, la formation d'agrégats fibrineux et de matériel précipitable formé par la libération d'acides nucléiques liés à des protéines, lors de la lyse cellulaire survenant durant la conservation (179).

Contreras avait utilisé la même DNase 1 (179), à la même concentration, mais cet additif améliorait seulement le maintien de la viabilité cellulaire, paramètre que nous n'avons pas retenu en raison de sa faible sensibilité.

2.1.2.22. Conclusion.

Sur la base des essais précédents, les additifs (ou conditions de conservation) par rapport au milieu de base Plasmion^R, qui ont amené une amélioration significative du maintien d'une ou plusieurs fonctions du PN sont le bicarbonate de sodium, le glucose, l'ATP, l'obscurité, la vitamine C, la vitamine E, le NADH et le NADPH, les antibiotiques.

L'ajout de calcium, l'agitation, l'utilisation du RPMI, le barbotage d'azote et d'oxygène détériorent le maintien d'une ou plusieurs fonctions des PN au cours de la conservation de ceux-ci.

Les essais dont les résultats ne sont pas significatifs, dans les conditions expérimentales utilisées sont la stérilité de la sédimentation sur dextran, la centrifugation à basse vitesse, les conteneurs, le PMSF, les corticoïdes, la DNase.

Nous observons également que certains paramètres mesurés pour évaluer les fonctions des PN (chimiotactisme, migration spontanée, libération de lysozyme et de bêta-glucuronidase) sont plus sensibles que d'autres (NBT, phagocytose, chimiluminescence) pour détecter les dommages causés au PN par la conservation de ceux-ci. Néanmoins, en raison de l'absence de critère de bonne conservation reconnu efficace par l'ensemble des auteurs, il nous a paru plus adéquat de mesurer une série de paramètres.

Les résultats de ces essais sont résumés dans le tableau XXVII. Nous résumons les résultats significatifs dans le tableau XXVIII.

Tableau XXVI : Conservation de 24 h en présence de DNAse 1.

Paramètre	0 h			24 h		
	—	+	P	—		+
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	% Oh	% Oh
Chimiotactisme (mm)	2.12 ± 0.06	2.08 ± 0.88	NS	1.58 ± 0.12	70	79
Migration spontanée (mm)	1.04 ± 0.08	1.02 ± 0.10	NS	0.86 ± 0.06	83	88
NBT (%)	92 ± 3	94 ± 3	NS	90 ± 2	98	97
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	NS	99 ± 1	100	100
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.6	NS	1.4 ± 0.5	78	83
ATP EG (μmol/ L)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	NS	0.8 ± 0.1	83	82
Chimiluminescence pic N/sec/10 ⁶ PN)	4.1 ± 0.8	4.0 ± 0.7	NS	3.6 ± 0.5	87	93
Chimiluminescence intégrée N/sec/10 ⁶ PN)	3.4 ± 0.6	3.6 ± 0.4	NS	2.9 ± 0.6	85	81
pH	7.40 ± 0.04	7.42 ± 0.03	NS	7.18 ± 0.04	97	97
					Δ Oh	Δ Oh
Lysozyme (μg/mL)	9 ± 4	7 ± 4	NS	15 ± 3	6	10
Bêta-glucuronidase (US/mL)	16 ± 7	17 ± 8	NS	36 ± 6	20	20

PN : polynucéaire neutrophile; NBT : nitrobleu de tetrazolium; ATP IG : adénosine triphosphate intragranulocytaire; ATP EG : adénosine triphosphate extragranulocytaire; US : unité Sigma; % Oh : pourcentage de l'activité à Oh; Δ Oh : différence par rapport à l'activité

TABLEAU XXVI: Additifs apportant des modifications significatives à la conservation des P.N.

Paramètres			Chimio- tactisme (mm)	Migration spontanée (mm)	NBT (%)	Phago- cytose (%)	ATP IG (nmol/ 10 ⁶ PN)	Chimilumi- nescence intégrée (V/sec/ 10 ⁶ PN)	pH	Lysozyme (µg/mL)	Beta- glucose- nidase (US/mL)
HCO_3^-	0 h	-	1.93 ± 0.07	0.96 ± 0.04	92 ± 2	97 ± 1	1.6 ± 0.2	3.4 ± 1.0	6.81 ± 0.04	12 ± 4	56 ± 13
		+	1.94 ± 0.10	1.08 ± 0.07	94 ± 1	98 ± 1	1.6 ± 0.2	3.1 ± 1.4	7.52 ± 0.03	10 ± 5	46 ± 8
	24 h	-	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.10	79 ± 2	91 ± 2	0.8 ± 0.2	1.7 ± 0.3	6.45 ± 0.03	45 ± 6	125 ± 27
		+	0.68 ± 0.14	0.35 ± 0.08	85 ± 2	94 ± 1	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.3	7.20 ± 0.01	26 ± 4	79 ± 14
Glucose	0 h	-	1.90 ± 0.16	0.96 ± 0.08	92 ± 3	96 ± 1	1.5 ± 0.1	3.0 ± 2.1	7.52 ± 0.02	19 ± 13	19 ± 3
		+	2.04 ± 0.14	1.03 ± 0.05	94 ± 2	98 ± 1	1.6 ± 0.2	3.1 ± 2.0	7.54 ± 0.03	13 ± 7	17 ± 6
	24 h	-	0.86 ± 0.07	0.46 ± 0.06	81 ± 1	92 ± 2	1.0 ± 0.2	1.9 ± 1.2	7.10 ± 0.20	33 ± 8	53 ± 11
		+	1.08 ± 0.12	0.53 ± 0.08	89 ± 3	96 ± 1	1.2 ± 0.2	2.1 ± 1.3	7.20 ± 0.03	26 ± 6	42 ± 17
Calcium	0 h	-	2.12 ± 0.20	1.03 ± 0.11	92 ± 2	98 ± 1	2.1 ± 0.4	3.0 ± 0.6	7.48 ± 0.02	6 ± 1	17 ± 5
		+	2.04 ± 0.18	0.98 ± 0.07	92 ± 1	98 ± 1	1.6 ± 0.3	2.9 ± 0.6	7.47 ± 0.02	6 ± 1	15 ± 7
	24 h	-	1.12 ± 0.07	0.59 ± 0.12	87 ± 2	95 ± 1	1.2 ± 0.7	1.9 ± 0.3	7.20 ± 0.02	18 ± 3	29 ± 2
		+	0.40 ± 0.07	0.26 ± 0.04	75 ± 4	92 ± 1	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.1	7.18 ± 0.02	27 ± 3	55 ± 5
ATP	0 h	-	2.24 ± 0.24	1.10 ± 0.18	91 ± 3	98 ± 1	1.4 ± 0.4	2.0 ± 1.0	7.41 ± 0.02	8 ± 1	29 ± 7
		+	2.21 ± 0.28	1.10 ± 0.16	93 ± 1	98 ± 1	2.1 ± 0.3	2.1 ± 1.0	7.42 ± 0.05	8 ± 1	30 ± 9
	24 h	-	1.10 ± 0.06	0.58 ± 0.02	84 ± 3	96 ± 2	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.7	7.17 ± 0.05	16 ± 4	52 ± 16
		+	1.40 ± 0.12	0.68 ± 0.07	91 ± 1	97 ± 1	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.7	7.24 ± 0.05	13 ± 2	47 ± 14
Agitation	0 h	-	1.99 ± 0.13	1.00 ± 0.04	95 ± 1	98 ± 1	2.1 ± 0.5	2.7 ± 0.8	7.61 ± 0.08	11 ± 4	20 ± 7
		+	2.04 ± 0.12	1.01 ± 0.06	94 ± 1	98 ± 1	1.9 ± 0.2	2.7 ± 0.9	7.60 ± 0.06	11 ± 2	23 ± 3
	24 h	-	1.39 ± 0.05	0.68 ± 0.07	93 ± 1	97 ± 1	1.8 ± 0.5	2.1 ± 0.1	7.29 ± 0.18	15 ± 4	26 ± 7
		+	1.30 ± 0.08	0.62 ± 0.04	89 ± 2	97 ± 1	1.3 ± 0.2	1.9 ± 0.7	7.30 ± 0.14	24 ± 4	41 ± 3
Obscurité	0 h	-	2.02 ± 0.11	0.97 ± 0.04	93 ± 2	98 ± 1	2.1 ± 0.4	3.1 ± 0.6	7.37 ± 0.01	9 ± 1	24 ± 6
		+	1.99 ± 0.14	1.00 ± 0.07	94 ± 2	98 ± 1	1.7 ± 0.3	3.2 ± 0.8	7.38 ± 0.01	8 ± 1	25 ± 3
	24 h	-	1.22 ± 0.04	0.59 ± 0.01	91 ± 1	96 ± 1	1.4 ± 0.2	2.2 ± 0.5	7.19 ± 0.01	16 ± 4	35 ± 6
		+	1.36 ± 0.04	0.64 ± 0.04	92 ± 3	97 ± 1	1.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4	7.18 ± 0.03	11 ± 2	31 ± 2
Vit C	0 h	-	2.42 ± 0.40	1.22 ± 0.23	95 ± 2	99 ± 1	2.0 ± 0.4	2.9 ± 1.7	7.51 ± 0.08	10 ± 2	19 ± 3
		+	2.44 ± 0.30	1.19 ± 0.10	96 ± 1	99 ± 1	1.5 ± 0.3	2.9 ± 1.4	7.52 ± 0.03	11 ± 2	19 ± 4
	24 h	-	1.62 ± 0.03	0.85 ± 0.07	91 ± 1	98 ± 1	1.5 ± 0.4	2.4 ± 1.4	7.22 ± 0.11	18 ± 1	28 ± 2
		+	1.97 ± 0.17	0.96 ± 0.11	95 ± 1	99 ± 1	1.3 ± 0.1	2.6 ± 1.2	7.22 ± 0.13	16 ± 2	21 ± 4
RPMI	0 h	-	2.60 ± 0.38	1.30 ± 0.22	95 ± 1	99 ± 1	2.0 ± 0.4	2.3 ± 0.5	7.43 ± 0.07	8 ± 2	14 ± 7
		+	2.74 ± 0.13	1.34 ± 0.13	95 ± 1	99 ± 1	1.8 ± 0.6	2.4 ± 0.5	7.51 ± 0.11	8 ± 3	16 ± 5
	24 h	-	2.15 ± 0.12	1.08 ± 0.08	92 ± 2	99 ± 1	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.3	7.21 ± 0.10	15 ± 3	24 ± 4
		+	1.74 ± 0.13	0.84 ± 0.06	89 ± 3	97 ± 1	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.2	7.30 ± 0.08	24 ± 8	37 ± 2
NADH/ NADPH	0 h	-	1.62 ± 0.06	0.84 ± 0.12	94 ± 2	99 ± 1	1.3 ± 0.4	3.2 ± 0.7	7.38 ± 0.03	6 ± 4	24 ± 7
		+	1.82 ± 0.18	0.84 ± 0.12	93 ± 2	99 ± 1	1.5 ± 0.3	3.6 ± 0.9	7.41 ± 0.02	7 ± 4	20 ± 5
	24 h	-	1.18 ± 0.06	0.68 ± 0.08	92 ± 1	98 ± 2	0.9 ± 0.2	2.5 ± 0.3	7.20 ± 0.05	9 ± 2	34 ± 3
		+	1.48 ± 0.06	0.72 ± 0.06	91 ± 3	99 ± 1	1.0 ± 0.3	2.6 ± 0.5	7.15 ± 0.06	11 ± 4	32 ± 4
Vit E	0 h	-	1.98 ± 0.14	0.98 ± 0.08	95 ± 3	99 ± 1	1.8 ± 0.4	4.4 ± 1.1	7.44 ± 0.03	8 ± 4	31 ± 10
		+	1.88 ± 0.22	1.02 ± 0.16	95 ± 4	99 ± 1	2.0 ± 0.5	4.0 ± 0.7	7.41 ± 0.04	9 ± 3	30 ± 5
	24 h	-	1.36 ± 0.06	0.72 ± 0.12	92 ± 1	99 ± 1	1.4 ± 0.1	3.0 ± 0.8	7.21 ± 0.04	15 ± 2	40 ± 3
		+	1.58 ± 0.06	0.76 ± 0.08	94 ± 2	99 ± 1	1.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3	7.22 ± 0.05	12 ± 2	46 ± 12
Anti- biotiques	0 h	-	2.12 ± 0.22	1.16 ± 0.08	90 ± 3	99 ± 1	2.2 ± 0.5	2.6 ± 0.9	7.42 ± 0.07	7 ± 2	24 ± 7
		+	2.08 ± 0.06	1.02 ± 0.12	92 ± 4	98 ± 2	2.0 ± 0.2	2.7 ± 1.1	7.40 ± 0.03	8 ± 4	27 ± 5
	24 h	-	1.68 ± 0.06	0.82 ± 0.12	88 ± 1	98 ± 1	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5	7.21 ± 0.05	10 ± 2	41 ± 12
		+	1.88 ± 0.06	0.88 ± 0.06	91 ± 3	98 ± 1	1.6 ± 0.3	2.3 ± 0.4	7.25 ± 0.04	10 ± 2	36 ± 3

Tableau XXVIII : additifs apportant des modifications significatives à la conservation des PN.

Essai	Amélioration	P	Détérioration	P
HCO ₃ ⁻	Chimio, NBT, pH, lys Mig ATP, B glu Phago	< 0.005 < 0.01 < 0.025 < 0.05	NS	—
Glucose	Chimio, Phago NBT	< 0.025 < 0.05	NS	—
Calcium	NS	—	Chimio, mig, NBT, phago, lys, B glu Lumi ATP	< 0.005 < 0.01 < 0.05
ATP	Chimio Mig NBT	< 0.005 < 0.025 < 0.05	NS	—
Agitation	NS	—	NBT, lys B glu	< 0.025 < 0.01
Obscurité	Chimio	< 0.025	NS	—
Vit C	Chimio, NBT B glu	< 0.05 < 0.025	NS	—
RPMI	NS	—	Chimio, ATP, B glu Mig, phago	< 0.005 < 0.025
NADH/NADPH	Chimio	< 0.05	NS	—
Vit E	Chimio	< 0.05	NS	—
Antibiotiques	Chimio, lumi	< 0.05	NS	—

Chimio: chimiotactisme; mig: migration spontanée; NBT: nitrobleu de tétrazolium; phago: phagocytose; ATP: adénosine triphosphate;

lumi: chimiluminescence; lys: lysozyme; B glu: bêta glucuronidase.

2.1.3.Modification du milieu au cours de la conservation des PN.

2.1.3.1.Addition de bicarbonate au milieu de conservation au bout de 0 h et de 24 h, au cours d'une conservation de 48 h.

Mode opératoire.

Il est identique à celui des essais précédents. Le milieu étudié comprend tous les additifs (ou conditions de conservation) utiles (cf paragraphe 2.1.2.20). De plus, pour l'essai (++), nous ajoutons 10 µl de bicarbonate de sodium 900 mmol/ L, par mL de milieu de conservation au bout de 24 h (249,250). Pour le contrôle (+), nous n'ajoutons pas le bicarbonate de sodium au bout de 24 h et pour le contrôle (-), nous n'ajoutons aucun additif de conservation (249,250).

Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type, le nombre d'essais est de cinq et nous utilisons l'analyse de variance comme test statistique.

Comme les conservations s'étalent ici sur une durée deux fois plus longue que précédemment, nous avons voulu vérifier l'absence d'endotoxines dans notre milieu de conservation, à l'aide du coffret-réactif IBF (IBF,France).

2.1.3.1.2.Résultats.

La recherche d'endotoxine est négative pour tous les essais.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $7.8 \pm 2.3 \cdot 10^9 / L$; $5.9 \pm 1.8 \cdot 10^9 / L$; $50 \pm 30 \cdot 10^9 / L$; $36 \pm 17 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

La température de conservation est de $24 \pm 2^\circ C$.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXIX.

Les améliorations significatives observées à 48 h de conservation par l'apport du bicarbonate au bout de 24 h sont illustrées par les figures 15a et 15b.

2.1.3.1.3.Discussion.

L'ajout de bicarbonate au milieu de conservation au bout de 24 h apporte une nette amélioration concernant le maintien de la plupart des fonction examinées du PN: pH, lysozyme, bêta-glucuronidase ($p < 0.001$), chimiotactisme, migration spontanée, NBT, chimiluminescence ($p < 0.01$) et phagocytose ($p < 0.05$) (249,250).

La génération d'acide lactique par la glycolyse des PN fait chuter le pH en-dessous de la valeur critique (estimée à 7.0) et entraîne l'altération de la plupart des fonctions des PN (69). Il est donc nécessaire d'ajouter le bicarbonate pour maintenir un pH de conservation proche 7.4 afin que le PN puisse survivre plusieurs jours in vitro.

Les essais ultérieurs vérifieront 1) si l'effet bénéfique de l'apport du bicarbonate au bout de 24 h peut être utilisé pour des durées de conservations de plusieurs jours; 2) si ce raisonnement est applicable aux autres additifs considérés comme utiles au cours des conservations de 24 h. Pour cet essai, au temps 24 h, le chimiotactisme est maintenu à 82 % de la valeur au temps 0 h, alors que Glasser (meilleur résultat de la littérature examinée) obtient 94 % (174). Après 48 h de conservation, le chimiotactisme est maintenu à 60 % (même résultat que Glasser). Il faut noter que cet auteur n'ajuste pas le pH du milieu au cours de la conservation des PN.

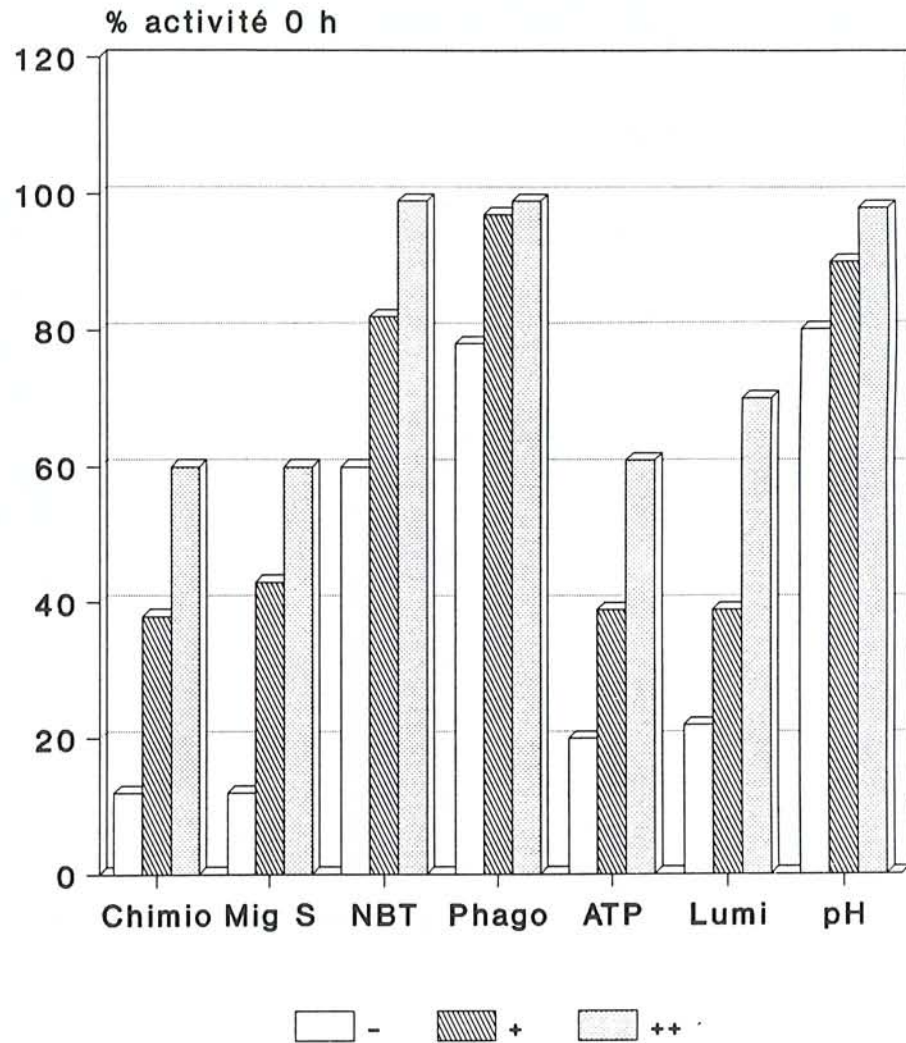
Tableau XXIX : conservation de 48 h avec correction du pH au bout de 24 h.

Parameter	0 h		24 h		48 h		
	-	+	-	+	-	+	++
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Chimiotactisme (mm)	2.24 ± 0.06	2.18 ± 0.12	0.72 ± 0.24	1.88 ± 0.12	0.24 ± 0.06	0.81 ± 0.06	1.32 ± 0.06
Migration spontanée (mm)	1.14 ± 0.12	1.08 ± 0.06	0.38 ± 0.06	0.92 ± 0.06	0.12 ± 0.06	0.48 ± 0.12	0.66 ± 0.12
NBT (%)	94 ± 3	92 ± 2	78 ± 2	91 ± 2	55 ± 7	76 ± 4	88 ± 2
Phagocytose (%)	99 ± 1	99 ± 1	96 ± 1	99 ± 1	76 ± 10	92 ± 3	98 ± 1
ATP IG (nmol/10 ⁶ PN)	1.7 ± 0.5	1.6 ± 0.4	0.8 ± 0.4	1.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.3
Chimiluminescence (1/sec.10 ⁶ PN)	3.8 ± 1.1	3.4 ± 0.7	2.0 ± 0.4	3.2 ± 0.4	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.5	2.4 ± 0.3
pH	6.80 ± 0.04	7.42 ± 0.05	6.40 ± 0.05	7.19 ± 0.05	6.12 ± 0.03	6.70 ± 0.07	7.17 ± 0.03
Lysozyme (µg/ mL)	8 ± 2	10 ± 3	30 ± 5	12 ± 4	102 ± 18	89 ± 15	21 ± 3
Béta-glucuronidase (US/mL)	23 ± 7	30 ± 8	69 ± 2	32 ± 7	182 ± 23	176 ± 23	54 ± 7

PN: polynucléaire neutrophile; NBT: nitrobleu de tétrazolium; ATP IG: adénosine triphosphate intragranulocytaire;

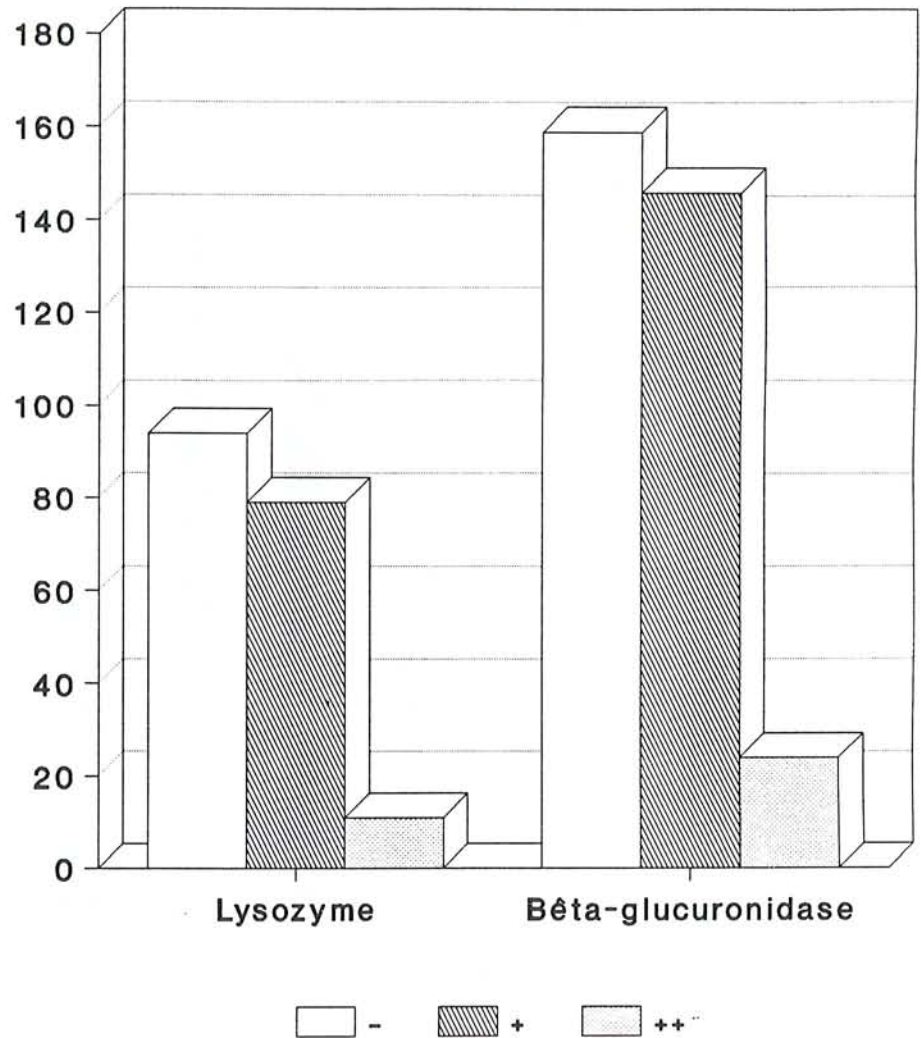
US: unité Sigma; - : absence d'additifs; + : additifs ajoutés à 0 h; ++: additifs ajoutés à 0 h et pH réajusté à 24 h;

Figure 15a : Modifications significatives observées après 48 h de conservation, observées après apport de bicarbonate au bout de 0 h et 24 h.



- : Absence de bicarbonate
 + : Bicarbonate ajouté à 0 h
 ++ : Bicarbonate ajouté à 0 h et à 24 h
 Chimio : Chimiotactisme
 Mig S : Migration spontanée
 NBT : Nitrobleu de tétrazolium
 Phago : Phagocytose
 ATP : Adénosine triphosphate
 Lumi : Chimiluminescence

Figure 15b : Modifications significatives observées au bout de 48 h de conservation, observées après apport de bicarbonate au bout de 0 h et de 24 h.



- : Absence de bicarbonate

+ : Bicarbonate ajouté à 0 h

++ : Bicarbonate ajouté à 0 h et à 24 h

Le lysozyme est exprimé en différence de concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre les conservations de 0 h, 24 h et 48 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/mL) entre les conservations de 0 h, 24 h et 48 h.

2.1.3.2. Influence de l'ajout quotidien de tous les additifs utiles sur le maintien du chimiotactisme.

2.1.3.2.1. Introduction.

L'ajout des additifs de conservation précédemment étudiés, ajoutés uniquement au temps 0 h ne donne pas de résultats satisfaisants. En effet, le maintien du chimiotactisme demeure insuffisant pour des délais dépassant 24 h. Par contre, le fait d'ajouter une quantité adéquate de bicarbonate au bout de 24 h de conservation permet d'améliorer les performances du modèle (249,250).

Nous avons essayé de développer cette approche en ajoutant quotidiennement tous les additifs utiles de conservation (251). Nous avons également choisi d'utiliser le chimiotactisme comme critère de bonne conservation (car il est le plus sensible), et ce pour une conservation s'étalant sur 96 h (250,251).

2.1.3.2.2. Mode opératoire.

Il est identique à celui de l'essai précédent. Pour l'essai (+), nous ajoutons quotidiennement tous les additifs utiles, soit au bout de 24 h, 48 h et 72 h (250,251).

Pour le contrôle (-), nous n'ajoutons aucun additif.

La recherche d'endotoxine est réalisée à l'aide du coffret-réactif IBF (IBF, France).

Le nombre d'essais est de huit, les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type et nous utilisons l'analyse de variance comme test statistique.

2.1.3.2.3. Résultats.

La recherche d'endotoxine est négative pour tous les essais.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.8 \pm 1.2 \cdot 10^9/L$; $4.2 \pm 1.2 \cdot 10^9/L$; $16 \pm 7 \cdot 10^9/L$; $27 \pm 11 \cdot 10^9/L$, respectivement.

La température de conservation est de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

L'évolution du chimiotactisme durant 96 h pour le contrôle et pour l'essai est illustrée par la figure 16.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXX.

A 0 h de conservation, le chimiotactisme n'est pas significativement amélioré par l'apport des additifs.

A 24 h ($p < 0.05$), 48 h ($p < 0.001$), 72 h ($p < 0.001$) et 96 h ($p < 0.001$), le maintien du chimiotactisme est significativement amélioré par l'ajout des additifs (250,251). Avec le milieu pourvu d'additifs, le chimiotactisme n'est significativement diminué ($p < 0.01$) qu'après 48 h de conservation. Avec le milieu dépourvu d'additifs, le chimiotactisme est déjà significativement ($p < 0.01$) diminué au bout de 24 h.

2.1.3.2.4.Discussion.

Une conservation adéquate des PN est actuellement impossible pour des périodes dépassant 24 h (69). Des études antérieures montrent que les meilleurs résultats ont été obtenus avec un milieu RPMI additionné de bicarbonate de sodium, de protéines et de glucose (174). Dans ce cas, le maintien du chimiotactisme est de 94 % au bout de 24 h et de 60 % au bout de 48 h (174).

L'ajout des additifs augmente significativement le maintien du chimiotactisme au bout de 1, 2, 3 et 4 jours de conservation (250,251). Aucun agrégat macroscopique ne fut observé durant cette période. Le chimiotactisme est maintenu à 83 % au bout de 24 h (Glasser: 94 %) (174,250,251). A 48 h de conservation, notre modèle donne des résultats comparables à ceux de Glasser (59 % contre 60 %) (174,250,251). Ces résultats sont quasi identiques à ceux de l'essai précédent (2.1.3.), ce qui pourrait signifier que l'additif le plus efficace pour maintenir le chimiotactisme est le bicarbonate de sodium.

Avec le modèle pourvu d'additifs, le chimiotactisme décroît selon une relation linéaire (figure 16) (250,251). Avec le modèle dépourvu d'additifs, le chimiotactisme décroît beaucoup plus rapidement, selon une relation exponentielle (figure 16).

De par ces résultats, nous estimons que les additifs consommés chaque jour par le métabolisme des PN devraient être remplacés chaque jour par une quantité équivalente d'additifs, pour que le modèle puisse permettre une conservation de plusieurs jours (250,251).

Cette procédure permet une meilleure stabilité du milieu de conservation et par conséquence un meilleur maintien des principales fonctions du PN, en particulier le chimiotactisme (250,251).

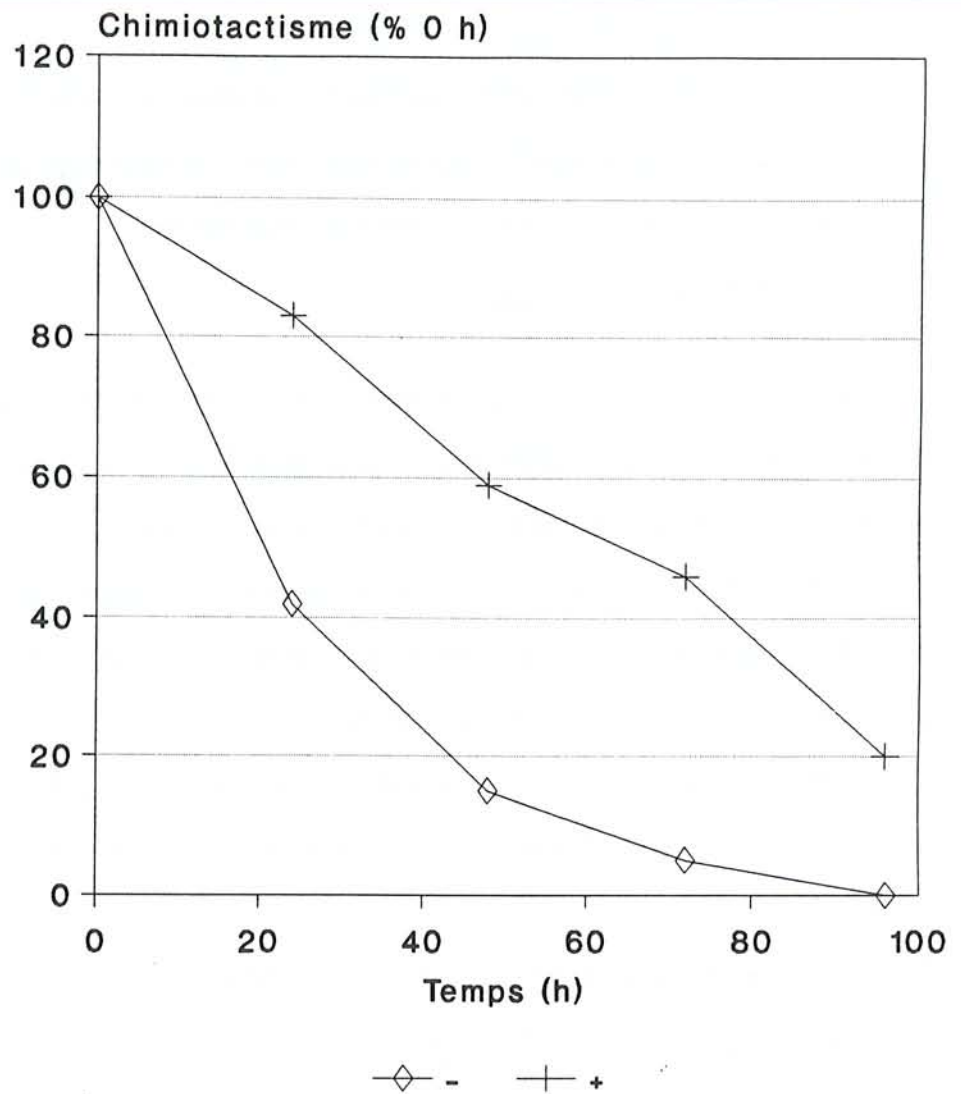
La stérilité du milieu est un point absolument capital, surtout pour des conservations dépassant plusieurs jours (250,251). L'apport des antibiotiques utilisés limite la contamination bactérienne, mais toutes les procédures d'apport des additifs chaque jour de conservation doivent être absolument stériles (249-251).

Pour des essais ultérieurs, il serait utile d'utiliser des systèmes de connexion stérile pour permettre l'apport des additifs chaque jour avec une stérilité satisfaisante (250,251).

Tableau XXX : conservation de 96 h avec ajout quotidien de tous les additifs utiles.

Temps (h)	Chimiotactisme (mm) ($\bar{x} \pm SD$)		Chimiotactisme Maintien (% 0 h)	
	–	+	–	+
0	1.72 $\pm$ 0.34	1.75 $\pm$ 0.39	100	100
24	0.72 $\pm$ 0.32	1.42 $\pm$ 0.29	42	83
48	0.25 $\pm$ 0.19	1.03 $\pm$ 0.17	15	59
72	0.08 $\pm$ 0.14	0.70 $\pm$ 0.15	5	46
96	0.00 $\pm$ 0.00	0.36 $\pm$ 0.14	0	20

Figure 16 : Evolution du chimiotactisme au cours d'une conservation de 96 h avec apport journalier des additifs.



- : Absence d'additifs
 + : Présence d'additifs

2.1.3.3. Ajout quotidien de tous les additifs utiles; influence sur les fonctions du PN.

2.1.3.3.1. Introduction.

Les résultats de l'essai précédent concernant le maintien du chimiotactisme pour une conservation de quatre jours nous ont incité à étudier l'évolution des autres fonctions du PN, pour un même protocole expérimental.

2.1.3.3.2. Mode opératoire.

Il est identique à celui de l'essai précédent. Pour l'essai (+), nous ajoutons quotidiennement tous les additifs utiles, soit au bout de 0 h, 24 h, 48 h ou 72 h de conservation. Pour le contrôle, nous n'ajoutons aucun additif.

Les fonctions du PN mesurées sont le chimiotactisme, la migration spontanée, le NBT, la phagocytose, le pH, la chimiluminescence, le lysozyme et la bêta-glucuronidase, selon les méthodes préalablement décrites.

Le nombre d'essais est de cinq, les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type et nous utilisons l'analyse de variance comme test statistique.

Le dosage d'acide lactique et de glucose a été réalisé dans le cadre de cette étude, aux temps 0 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h de conservation.

La recherche d'endotoxines a été réalisée à l'aide du coffret-réactif IBF (IBF, France).

2.1.3.3.3. Résultats.

La température de conservation est de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ et la recherche d'endotoxines est négative pour tous les essais.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $6.5 \pm 1.5 \cdot 10^9/\text{L}$, $5.3 \pm 1.0 \cdot 10^9/\text{L}$, $30 \pm 10 \cdot 10^9/\text{L}$ et $25 \pm 12 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

Pour le contrôle, la concentration en acide lactique est de 0.2 ± 0.1 mmol/ L à 0 h, de 2.9 ± 0.4 mmol/ L à 24 h, de 5.9 ± 1.4 mmol/ L à 48 h, de 8.5 ± 1.2 mmol/ L à 72 h et de 10.8 ± 1.5 mmol/ L à 96 h.

Pour l'essai, la concentration en acide lactique est de 0.2 ± 0.1 mmol/ L à 0 h, , de 3.6 ± 0.5 mmol/ L à 24 h, de 6.9 ± 0.6 mmol/ L à 48 h, de 12.0 ± 1.0 mmol/ L à 72 h et de 16.1 ± 1.2 mmol/ L à 96 h.

Les concentrations en glucose (essai) sont de 5.4 ± 0.3 mmol/ L à 0 h, de 4.9 ± 0.4 mmol/ L à 24 h, de 4.4 ± 0.5 mmol/ L à 48 h, de 4.1 ± 0.5 mmol/ L à 72 h et de 3.8 ± 0.3 mmol/ L à 96 h.

Les autres résultats sont repris dans le tableau XXXI. Les figures 17a, 17b et 17c illustrent l'évolution des fonctions des PN mesurées au cours de la conservation de 96 h.

Pour le contrôle, le chimiotactisme, la migration spontanée, le NBT, la chimiluminescence, le pH, le lysozyme et la bêta-glucuronidase ($p < 0.001$) s'altèrent significativement au bout de 24 h de conservation. La phagocytose s'altère significativement ($p < 0.01$) au bout de 48 h de conservation. Au bout de 24 h de conservation, des agrégats macroscopiques sont observés.

Pour l'essai, le pH diminue significativement ($p < 0.001$) au bout de 24 h. Au bout de 48 h, le chimiotactisme et la migration spontanée ($p < 0.001$), la chimiluminescence, le lysozyme et la bêta-glucuronidase ($p < 0.01$) s'altèrent significativement. Le NBT diminue significativement au bout de 96 h ($p < 0.01$).

L'utilisation d'additifs améliore significativement ($p < 0.001$) le maintien de toutes les fonctions du PN dès 24 h de conservation, à l'exception de la phagocytose pour laquelle l'effet des additifs se manifeste à 48 h de conservation ($p < 0.001$).

2.1.3.4.4.Discussion.

L'effet favorable des additifs utilisés se manifeste ici clairement, pour toutes les fonctions étudiées, dès 24 h de conservation.

Les résultats obtenus concernant l'évolution du chimiotactisme sont proches de celles observées pour l'essai précédent (2.1.3.3.), ce qui pouvait être attendu, puisque les conditions opératoires sont identiques. L'évolution des autres fonctions montre une décroissance moins rapide que celle du chimiotactisme, ce qui confirme les résultats de la littérature (69).

L'évolution des concentrations en acide lactique suit une relation linéaire aussi bien pour le contrôle que pour l'essai, proche des valeurs obtenues par d'autres auteurs pour des concentrations en PN similaires (187). A 72 h et 96 h de conservation, les concentrations en acide lactique obtenues sont significativement ($p < 0.001$) plus élevées pour l'essai que pour le contrôle. En effet, le glucose extracellulaire apporté par les additifs est métabolisé en acide lactique par l'intermédiaire de la glycolyse. Ces observations sont rapportées par d'autres auteurs (187).

L'évolution de la concentration en glucose suit également une décroissance d'allure linéaire. Glasser, sans réajuster le pH au cours de la conservation, observait aussi une décroissance de type linéaire (174). On observe une utilisation accrue du glucose par la glycolyse des PN, si ceux-ci sont conservés à un pH constamment maintenu dans les valeurs physiologiques (174). En effet, l'inhibition de certaines enzymes de la glycolyse comme la phosphofructokinase n'est pas observée si le pH est maintenu au-dessus de 7.0 (187).

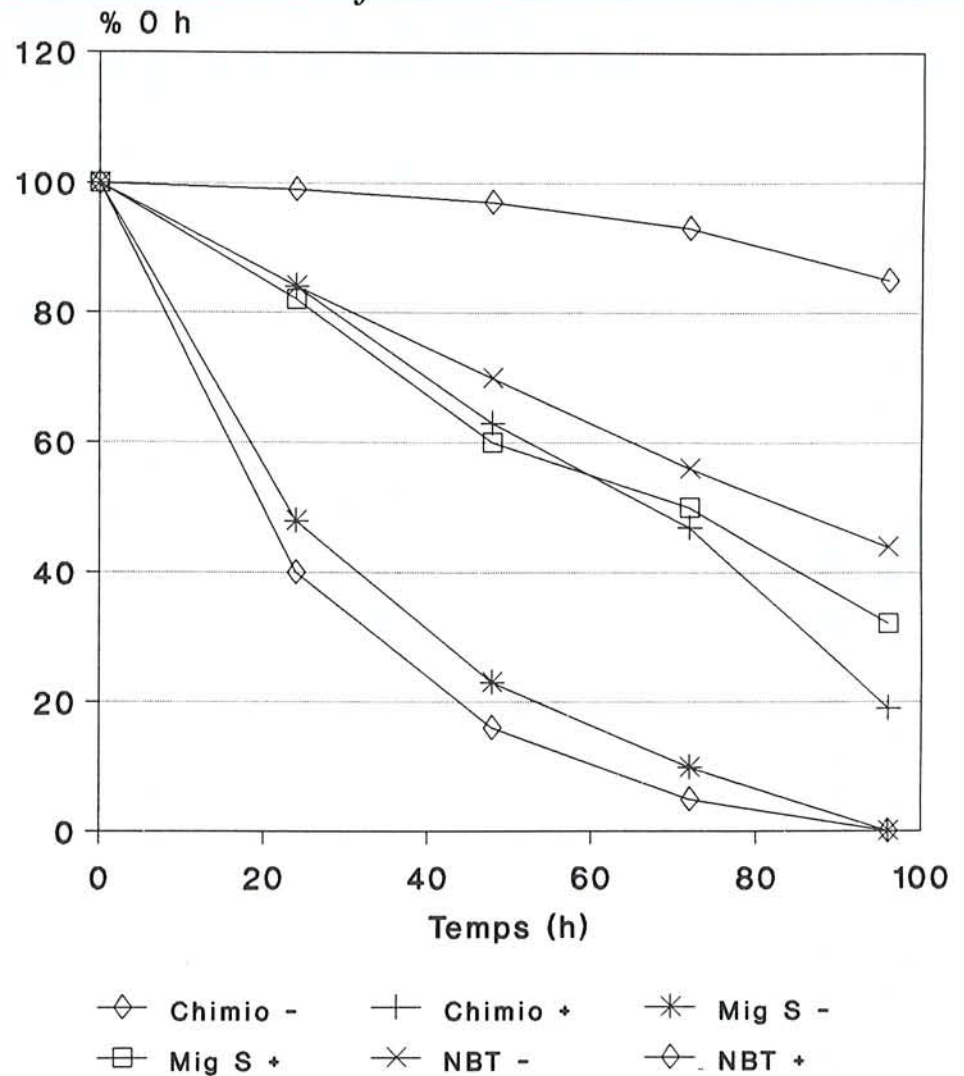
Tableau XXXI : Evolution des fonctions du PN au cours d'une conservation de 96 h avec ajout quotidien de tous les additifs utiles.

Fonction mesurée	Durée de conservation											
	0 h				24 h				48 h			
	-		+		-		+		-		+	
	2.22 ± 0.22	% 0 h 100 NS	2.12 ± 0.18	% 0 h 100 NS	0.88 ± 0.12	% 0 h 40 0.001	1.79 ± 0.18	% 0 h 84 NS	0.36 ± 0.06	% 0 h 16 0.001	1.34 ± 0.12	% 0 h 63 0.001
Chimiotactisme (mm)												
	1.22 ± 0.14	% 0 h 100 NS	1.17 ± 0.12	% 0 h 100 NS	0.58 ± 0.18	% 0 h 48 0.001	0.96 ± 0.18	% 0 h 82 NS	0.28 ± 0.10	% 0 h 23 0.001	0.70 ± 0.12	% 0 h 60 0.001
Migration spontanée (mm)												
	96 ± 2	% 0 h 100 NS	96 ± 3	% 0 h 100 NS	80 ± 2	% 0 h 84 0.001	94 ± 3	% 0 h 99 NS	67 ± 4	% 0 h 70 0.001	92 ± 2	% 0 h 97 NS
NBT (%)												
	99 ± 1	% 0 h 100 NS	99 ± 1	% 0 h 100 NS	97 ± 1	% 0 h 98 0.001	99 ± 1	% 0 h 100 NS	82 ± 3	% 0 h 83 0.001	99 ± 1	% 0 h 100 NS
Phagocytose (%)												
	6.87 ± 0.06	% 0 h 100 NS	7.42 ± 0.07	% 0 h 100 NS	6.41 ± 0.07	% 0 h 94 0.001	7.25 ± 0.04	% 0 h 98 0.001	6.10 ± 0.04	% 0 h 89 0.001	7.13 ± 0.05	% 0 h 96 0.001
pH												
	6.1 ± 1.2	% 0 h 100 NS	6.4 ± 1.0	% 0 h 100 NS	3.9 ± 0.8	% 0 h 64 0.001	5.4 ± 1.0	% 0 h 84 NS	1.9 ± 0.6	% 0 h 31 0.001	4.4 ± 0.9	% 0 h 69 0.001
Chimiluminescence pic (N/sec.106 PN)												
	3.9 ± 0.6	% 0 h 100 NS	3.4 ± 0.6	% 0 h 100 NS	2.0 ± 0.4	% 0 h 54 0.001	2.8 ± 0.9	% 0 h 83 NS	1.0 ± 0.5	% 0 h 26 0.001	2.4 ± 0.4	% 0 h 71 0.001
Chimiluminescence (N/sec.106 PN)												
	7 ± 3	% 0 h 0 NS	10 ± 4	% 0 h 0 NS	28 ± 5	% 0 h 21 0.001	15 ± 5	% 0 h 4 NS	78 ± 15	% 0 h 71 0.001	23 ± 8	% 0 h 13 0.001
Lysozyme (ug/mL)												
	24 ± 8	% 0 h 0 NS	34 ± 8	% 0 h 0 NS	48 ± 10	% 0 h 24 0.001	39 ± 10	% 0 h 5 NS	148 ± 21	% 0 h 100 0.001	56 ± 10	% 0 h 22 0.001
Bêta-glucuronidase (US/mL)												

Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne ± écart-type

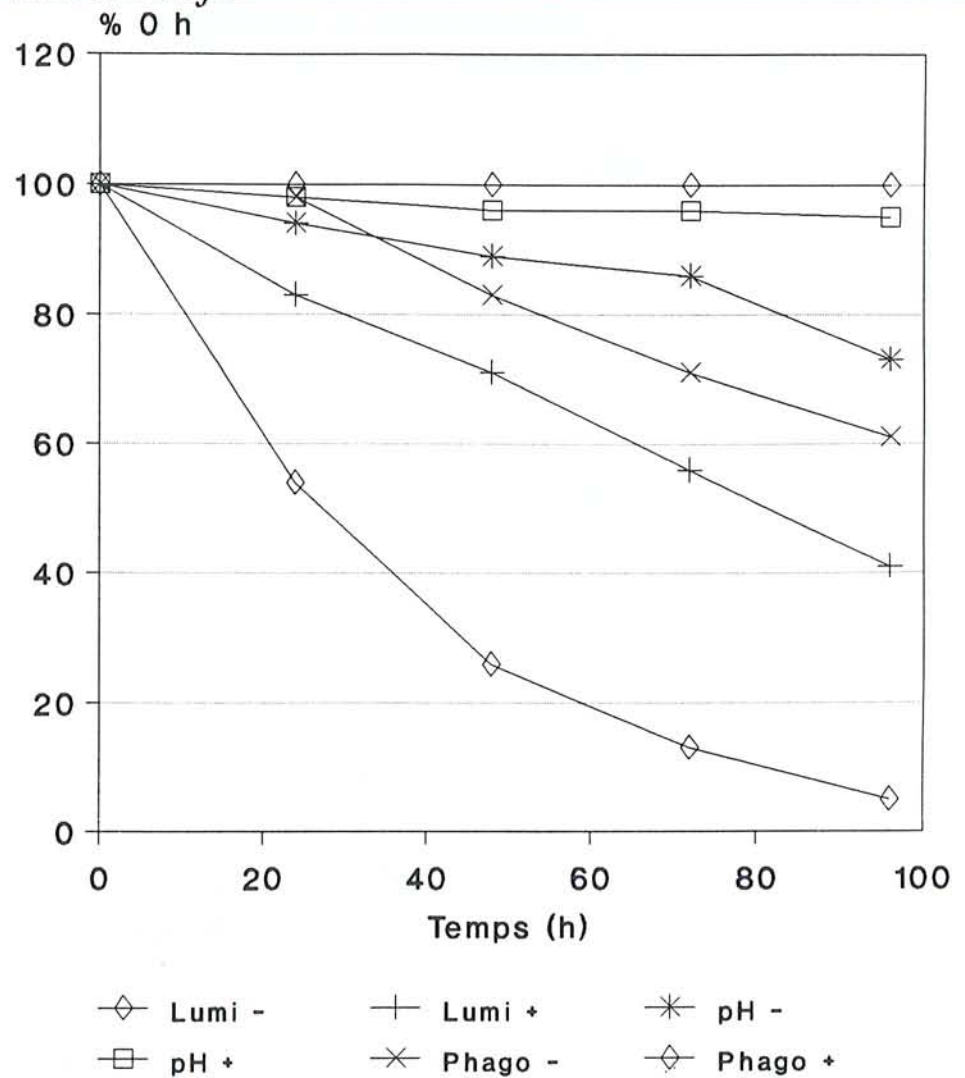
NBT : nitrobleu de tétrazolium; - : absence d'additifs; + : présence d'additifs.

Figure 17a : Evolution du chimiotactisme, de la migration spontanée et du NBT au cours d'une conservation de 96 h avec apport journalier de tous les additifs.



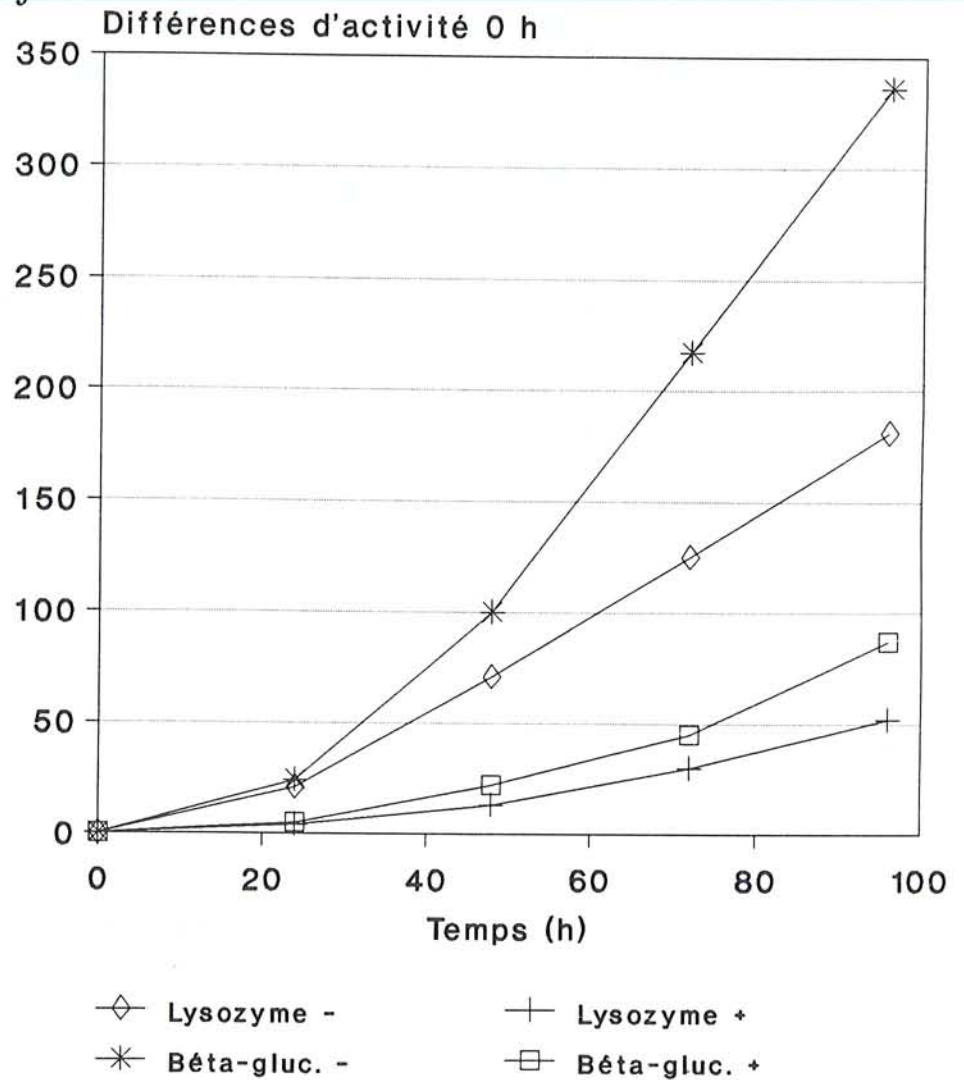
- : Absence d'additifs
 + : Présence d'additifs
 Chimio : Chimiotactisme
 Mig S : Migration spontanée
 NBT : Nitrobleu de tétrazolium

Figure 17b : Evolution de la phagocytose, du pH et de la chimiluminescence au cours d'une conservation de 96 h avec apport journalier des additifs.



- : Absence d'additifs
 + : Présence d'additifs
 Lumi : Chimiluminescence
 Phago : Phagocytose

Figure 17c : Evolution du lysozyme et de la bêta-glucuronidase au cours d'une conservation de 96 h avec apport journalier des additifs.



- : Absence d'additifs
 + : Présence d'additifs

Le lysozyme est exprimé en différence de concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) entre les conservations de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h.

La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/ mL) entre les conservations de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h.

2.1.4.Action de l'adénosine triphosphate sur le chimiotactisme.

2.1.4.1.Introduction.

Les essais précédents ont montré que pour assurer une conservation correcte, il était indispensable d'apporter de nombreux additifs au milieu de base Plasmion^R. Parmi ceux-ci, l'adénosine triphosphate s'est avérée être un additif intéressant, en particulier en vue du maintien optimal du chimiotactisme (249-251). Le chimiotactisme est un phénomène consommateur d'énergie, et l'ATP ajouté agit vraisemblablement en permettant un apport suffisant d'énergie au PN durant la conservation (69). Dans cette étude, nous avons tenté d'explorer plus en détail l'action de l'ATP. En particulier, nous avons voulu savoir si son action bénéfique sur le maintien du chimiotactisme était dû à l'ATP lui-même, ou à deux de ses constituants: l'adénosine et le phosphate.

2.1.4.2.Matériel et méthodes.

Les méthodes de séparation et de purification des PN ainsi que les conditions de conservation (température ambiante...) sont identiques à celles décrites précédemment (249-251). Nous avons utilisé le milieu de conservation précédemment décrit, basé sur l'emploi de Plasmion^R, additionné de bicarbonate de sodium, de glucose, de vitamine C, d'acétate d'alphatocophérol, de NADH, de NADPH, d'ampicilline et d'amikacine, aux concentrations préalablement décrites (249-251).

L'ATP 1 $\mu\text{mol/L}$, l'adénosine (Sigma, USA) 1 $\mu\text{mol/L}$ et le phosphate de sodium (Merck, Allemagne) 1 $\mu\text{mol/L}$ sont utilisés pour étudier l'influence de ces composés sur le chimiotactisme (252).

Le pH du milieu de conservation est ajusté après 24 h de conservation avec 10 μL de bicarbonate de sodium 900 mmol/L par mL de milieu de conservation (249,250).

Le chimiotactisme est déterminé par la technique décrite pour les essais précédents (249-251).

Le chimiotactisme est mesuré pour un milieu pourvu d'ATP, pour un milieu pourvu d'adénosine, pour un milieu pourvu de phosphate et pour un milieu contrôle dépourvu de ces additifs (252). La conservation des PN se déroule pendant 48 h à température ambiante.

Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type, l'analyse statistique des résultats est effectuée par analyse de variance et le nombre d'essais est de cinq.

Pour tous les essais, la recherche d'endotoxines est réalisée à l'aide du coffret-réactif IBF (IBF, France).

2.1.4.3. Résultats.

La température de conservation est de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ et la recherche d'endotoxines est négative pour tous les essais.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $5.5 \pm 1.0 \cdot 10^9/\text{L}$; $4.0 \pm 0.9 \cdot 10^9/\text{L}$; $30 \pm 12 \cdot 10^9/\text{L}$; $31 \pm 12 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

Les résultats de l'évolution du chimiotactisme au bout de 0 h, 24 h et 48 h de conservation sont repris dans le tableau XXXII.

La figure 18 illustre l'évolution du chimiotactisme au cours d'une conservation de 48 h pour le contrôle et les milieux pourvus d'ATP, d'adénosine et de phosphate.

A 24 h et 48 h de conservation, le maintien du chimiotactisme est significativement meilleur ($p < 0.001$) pour l'ajout d'ATP que pour l'addition d'adénosine, de phosphate et le contrôle (252). A 24 h et 48 h de conservation, l'ajout d'adénosine permet un meilleur maintien du chimiotactisme que l'apport de phosphate et que le contrôle ($p < 0.05$) (252). A 24 h et 48 h de

conservation, l'apport de phosphate ne donne pas de meilleur résultat que le contrôle (252).

2.1.4.4.Discussion.

Comme le chimiotactisme est un phénomène consommateur d'énergie, un déficit en énergie au niveau du PN pourrait être à l'origine d'une baisse du chimiotactisme (69). Dans un premier temps, une corrélation très nette entre le taux d'ATP intragranulocytaire et le chimiotactisme avait été notée pour les PN conservés (69).

Dans notre étude, nous avons essayé d'améliorer le maintien du chimiotactisme en ajoutant soit de l'ATP, soit deux composants de l'ATP: l'adénosine et le phosphate (252). C'est l'ATP qui donne les meilleurs résultats, bien que l'adénosine possède également un effet bénéfique alors que le phosphate ne se montre pas supérieur au contrôle (252).

L'ATP, qui ne traverse pas les membranes, pourrait agir par un mécanisme indirect pour améliorer le maintien du chimiotactisme: libération de l'adénosine à partir de l'ATP ou liaison de l'ATP à des récepteurs membranaire pour celui-ci (récepteurs P1 et P2) suivi de la libération d'un second messager en relation avec le métabolisme du chimiotactisme ? (252).

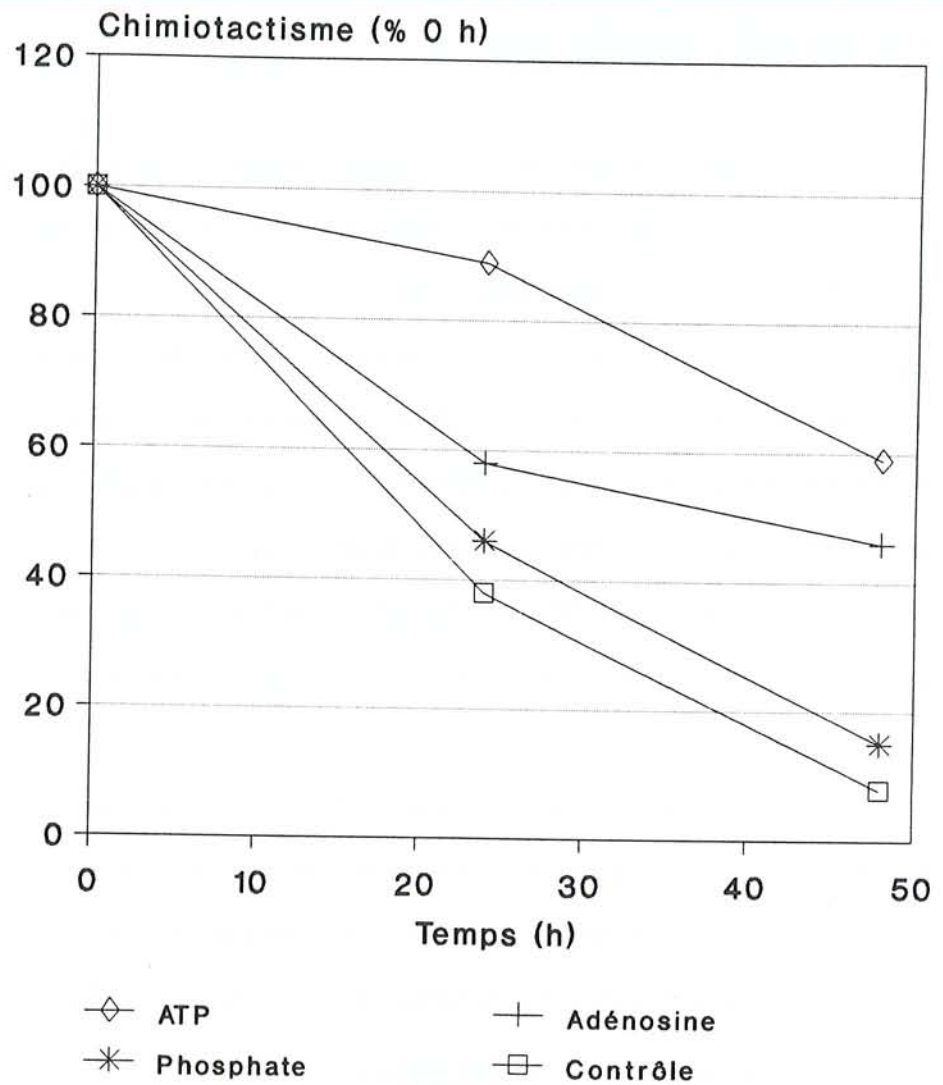
La relation entre le chimiotactisme et le taux d'ATP intragranulocytaire est complexe. En effet, la déplétion en ATP induite par le 2-déoxyglucose améliore le chimiotactisme, à l'inverse de la migration spontanée (15). Ceci pourrait indiquer que la corrélation entre l'abaissement du chimiotactisme et celui du taux d'ATP pour les PN conservés n'est pas un rapport de cause à effet (202).

Tableau XXXII: Evolution du chimiotactisme durant une conservation de 48 h en présence d'ATP, d'adénosine ou de phosphate

	Chimiotastisme (mm) X ± SD 0 h	Chimiotastisme (mm) X ± SD 24 h	Chimiotastisme (mm) X ± SD 48 h
Contrôle	1.78 ± 0.21	0.68 ± 0.04	0.14 ± 0.05
ATP	1.82 ± 0.26	1.62 ± 0.14	1.08 ± 0.08
Adenosine	1.82 ± 0.26	1.06 ± 0.08	0.64 ± 0.08
Phoshate	1.84 ± 0.12	0.84 ± 0.15	0.28 ± 0.10

Abréviations: X ± SD: moyenne ± écartype; ATP : adénosine triphosphate

Figure 18 : Evolution du chimiotactisme au cours d'une conservation de 48 h avec apport d'ATP, d'adénosine et de phosphate.



ATP : Adénosine triphosphate

2.1.5. Etude du métabolisme de la 3', 5' guanosine monophosphate cyclique (GMPc) au cours de la conservation des PN.

2.1.5.1. Introduction.

La 3', 5' adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la 3', 5' guanosine monophosphate cyclique (GMPc) exercent une action régulatrice opposée sur de nombreux processus métaboliques (20).

L'incubation des PN avec des composés connus pour augmenter la concentration intracellulaire du GMPc (acétylcholine, carbamylcholine, phorbol myristate acétate, prostaglandine F₂...), ou avec le GMPc lui-même, augmentent nettement le chimiotactisme des PN (25).

La mesure du taux de GMPc dans les PN conservés pourrait donc être utile pour tenter d'expliquer la cause de l'altération du chimiotactisme durant la conservation.

Au cours de cet essai, nous avons mesuré le chimiotactisme et la concentration leucocytaire en GMPc au cours d'une conservation de 48 h en milieu liquide. Nous avons également étudié l'influence des additifs utilisés pour améliorer la conservation sur le maintien du chimiotactisme et du taux de GMPc.

2.1.4.2. Matériel et méthodes.

Les méthodes de séparation et de purification des PN ainsi que les conditions de conservation (température ambiante...) sont identiques à celles décrites dans les essais précédents (249-251). Nous avons utilisé pour l'essai (+) le milieu de conservation précédemment décrit, basé sur l'emploi de Plasmion^R, additionné de bicarbonate de sodium, de glucose, d'adénosine triphosphate, de vitamine C, d'acétate d'alpha-tocophérol, de NADH, de NADPH, d'ampicilline et d'amikacine, aux concentrations préalablement décrites pour les essais précédents (249-251). Le contrôle est dépourvu de ces additifs. Le pH du

milieu de conservation est ajusté au bout de 24 h de conservation (essai) ou non (contrôle), selon les modalités précisées antérieurement (249-251). Le chimiotactisme est mesuré selon la technique de migration par agarose vis-à-vis du FMLP, préalablement décrite (249-251). Le GMPc est dosé par une technique de radio-immunodosage de type compétitif, utilisant l'iode 125, dont les détails sont développés dans l'annexe 9.

Le GMPc et le chimiotactisme sont mesurés après 0 h, 24 h et 48 h de conservation, pour l'essai (milieu de conservation pourvu d'additif) et pour le contrôle (milieu de conservation sans additifs).

Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type, le nombre d'expérimentations est de 5 et l'analyse statistique est réalisée par analyse de variance.

Pour tous les essais, la recherche d'endotoxines est réalisée à l'aide du coffret-réactif IBF (IBF, France).

2.1.4.3. Résultats.

La température de conservation est de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ et la recherche d'endotoxines est négative pour tous les essais.

La numération de leucocytes, de PN, d'érythrocytes et de plaquettes est de $7.4 \pm 1.1 \cdot 10^9/\text{L}$, $5.8 \pm 1.3 \cdot 10^9/\text{L}$, $30 \pm 15 \cdot 10^9/\text{L}$ et $39 \pm 19 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

Les résultats relatifs au chimiotactisme et au GMPc sont résumés dans le tableau XXXIII. L'évolution du GMPc et du chimiotactisme au cours de la conservation est illustrée par la figure 19.

Avec le milieu dépourvu d'additifs, le GMPc diminue significativement après 24 h ($p < 0.01$) et 48 h ($p < 0.001$). Avec le milieu pourvu d'additifs, le GMPc diminue significativement seulement après 48 h ($p < 0.01$). Avec le milieu pourvu d'additifs, le taux de GMPc est significativement plus élevé ($p < 0.05$) que pour le milieu sans additifs, au bout de 48 h de conservation, mais pas au

bout de 0 h et 24 h de conservation. Que le milieu soit pourvu ou non d'additifs, le chimiotactisme décroît significativement au bout de 24 h ($p < 0.001$) et de 48 h ($p < 0.001$). Le milieu pourvu d'additifs permet un meilleur maintien du chimiotactisme au bout de 24 h ($p < 0.001$) et de 48 h ($p < 0.001$).

2.1.5.4.Discussion.

Pour le milieu dépourvu d'additifs, la décroissance du chimiotactisme est très rapide: seulement 32 % de maintenance au bout de 24 h et 11 % au bout de 48 h. Dans les mêmes conditions, la décroissance du GMPc est moins nette au bout de 24 h (61 % de maintenance) et de 48 h (31 %). Le GMPc est donc un témoin de conservation moins sensible que le chimiotactisme.

En présence d'additifs, la décroissance du GMPc est assez similaire à celle du chimiotactisme, au bout de 24 h (79 % contre 82 %) et de 48 h (59 % contre 60 %). Pour le GMPc, l'effet favorable des additifs n'est significatif qu'au bout de 48 h ($p < 0.05$). Ces résultats pourraient indiquer que les additifs utilisés seraient plus utiles au maintien du chimiotactisme qu'à celui du GMPc. De fait, ces additifs ont été sélectionnés, dans les essais préalables, essentiellement en vue d'un maintien optimal du chimiotactisme (249-251).

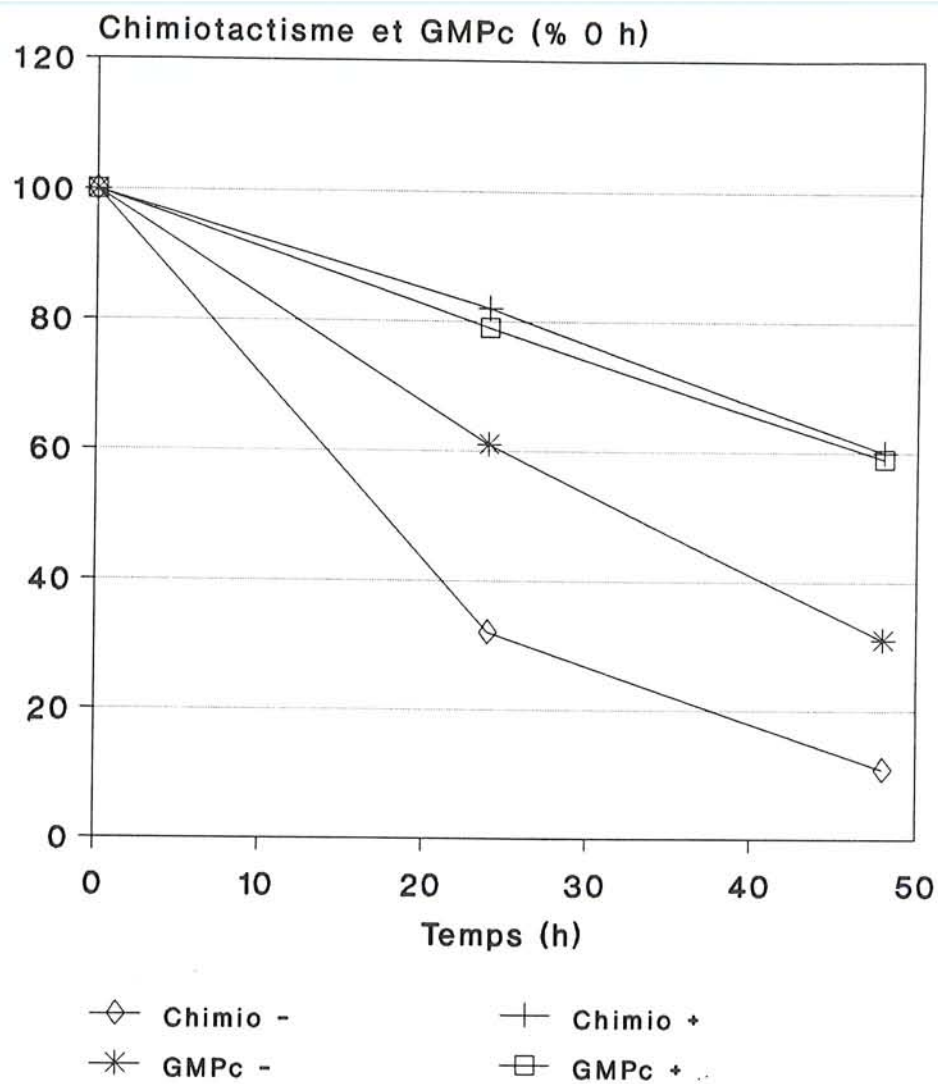
D'autre part, l'abaissement du taux du GMPc pourrait partiellement expliquer celui du chimiotactisme. Cependant, il est prouvé que d'autres facteurs peuvent expliquer la décroissance du chimiotactisme, en particulier l'abaissement du pH et du taux de glucose dans le milieu de conservation, la chute de l'ATP intragranulocytaire, la modification de l'affinité de récepteurs membranaires pour les facteurs chimiotactiques... (187,192-194).

Tableau XXXIII: Evolution du GMPc et du chimiotactisme
durant une conservation de 48 h.

Durée de conservation (h)	CHIMIOTACTISME			GMPc		
	$\bar{X} \pm SD$ (mm)		% 0 h	$\bar{X} \pm SD$ (fmol/106 PN)		% 0 h
	—	+		—	+	
0	2.24 ± 0.06	2.20 ± 0.06	100	25 ± 5	26 ± 5	100
24	0.72 ± 0.14	1.82 ± 0.06	32	16 ± 3	20 ± 3	79
48	0.24 ± 0.06	1.32 ± 0.06	11	8 ± 3	15 ± 3	59

X + SD: moyenne + écart-type; GMPc: guanosine monophosphate cyclique.

Figure 19 : Evolution du chimiotactisme et du GMPc au cours d'une conversation de 48 h en présence d'additifs.



- : Absence d'additifs
 + : Présence d'additifs
 Chimio : Chimiotactisme
 GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

2.1.6. Influence de la 3', 5'guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et de l'acétylcholine sur le taux de GMPc intragranulocytaire et sur le chimiotactisme des PN conservés in vitro.

2.1.6.1. Introduction.

Sur la base de l'essai précédent, nous avons décidé d'étudier l'action du GMPc et d'agents susceptibles d'augmenter le taux de GMPc intragranulocytaire.

En effet, des études antérieures montrent que l'augmentation du taux de GMPc intragranulocytaire engendrait une augmentation du chimiotactisme.

Nous avons voulu étudier l'influence de l'apport de GMPc et d'acétylcholine au milieu de conservation sur le taux de GMPc intragranulocytaire, le chimiotactisme et la migration spontanée des PN.

2.1.6.2. Matériel et méthodes.

Le modèle utilisé est identique à celui de l'essai précédent (conservation de 48 h avec addition de bicarbonate au milieu de conservation au bout de 0 h et 24 h). Nous ajoutons au milieu de conservation, au bout de 0 h et 24 h, soit le GMPc (Sigma, USA) 10^{-7} mol/ L (concentration finale), soit l'acétylcholine (Sigma, USA) 10^{-5} mol/ L (concentration finale). Ces concentrations ont été retenues suite à l'analyse de la littérature (25,38). Nous utilisons un milieu de contrôle, sans GMPc ni acétylcholine.

Le GMPc intragranulocytaire est mesuré par la technique de radio-immunoassay préalablement décrite. Le chimiotactisme et la migration spontanée sont mesurés selon la technique de migration sous agarose vis-à-vis du FMLP, préalablement décrite.

Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type, le nombre de déterminations effectuées est de cinq et l'analyse statistique est effectuée par analyse de variance.

La recherche d'endotoxines est réalisée à l'aide du coffret-réactif IBF (IBF, France).

2.1.6.3. Résultats.

La température de conservation est de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et la recherche d'endotoxines est négative pour tous les essais.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes donne les résultats suivants: $8.2 \pm 0.5 \cdot 10^9/\text{L}$; $5.0 \pm 1.0 \cdot 10^9/\text{L}$; $14 \pm 5 \cdot 10^9/\text{L}$; $30 \pm 7 \cdot 10^9/\text{L}$, respectivement.

Les résultats concernant le maintien du GMPc, du chimiotactisme et de la migration spontanée sont repris dans le tableau XXXIV.

L'évolution du GMPc et du chimiotactisme au cours d'une conservation de 48 h sont illustrés par la figure 20.

Pour le contrôle, le chimiotactisme est significativement diminué au bout de 24 h ($p < 0.001$) et 48 h ($p < 0.001$).

Avec l'ajout d'acétylcholine, le GMPc intragranulocytaire ne diminue pas significativement au bout de 24 h et 48 h, alors que le chimiotactisme diminue au bout de 48 h ($p < 0.001$). L'apport d'acétylcholine, comparé au milieu contrôle, permet un meilleur maintien du GMPc au bout de 24 h ($p < 0.001$) et de 48 h de conservation ($p < 0.001$). Au contraire, le maintien du chimiotactisme n'est pas significativement amélioré au bout de 0 h, 24 h et 48 h.

En ce qui concerne l'apport du GMPc, le GMPc intragranulocytaire n'est pas significativement diminué au bout de 24 h et 48 h de conservation alors que le chimiotactisme diminue au bout de 48 h ($p < 0.01$). L'apport du GMPc, comparé au milieu contrôle, permet un meilleur maintien du GMPc au bout de 24 h ($p < 0.001$) et de 48 h de conservation ($p < 0.001$). Comparé au contrôle, l'apport du GMPc améliore significativement le maintien du chimiotactisme au bout de 48 h de conservation.

2.1.6.4.Discussion.

Dans le milieu de contrôle, la décroissance du chimiotactisme et de la migration spontanée sont très voisines de celles observées pour l'essai de conservation à 48 h (paragraphe 2.1.3.) et pour l'essai relatif au maintien du chimiotactisme et du GMPc au cours de la conservation des PN (paragraphe 2.1.5), ce qui était attendu puisque les conditions opératoires sont identiques. Le même phénomène est observé pour la décroissance du GMPc (confirmation des résultats précédents).

Les deux additifs utilisés, GMPc et acétylcholine, amènent une amélioration significative, quasi identique, du maintien du GMPc intragranulocytaire. Avec le mode opératoire utilisé, ce dernier est maintenu à un niveau quasi constant, proche de celui observé au temps 0 h. L'augmentation du taux de GMPc intragranulocytaire causée par ces deux composés semble donc compenser la diminution du GMPc liée à la conservation des PN. A notre connaissance, aucun auteur n'a utilisé le GMPc et l'acétylcholine comme additif de conservation.

Au contraire de l'acétylcholine, seul le GMPc apporte une amélioration significative du maintien du chimiotactisme au bout de 48 h de conservation. Ceci pourrait signifier qu'il n'y ait pas un rapport de causalité direct entre le maintien du GMPc intragranulocytaire et celui du chimiotactisme, en tout cas dans le cadre du modèle envisagé, puisque le GMPc et l'acétylcholine possèdent une action très semblable sur le maintien du GMPc..

Dans des essais ultérieurs, portant sur une plus longue durée de conservation et des conditions expérimentales plus proches des concentrés transfusionnels, il serait intéressant d'apporter journellement ces additifs et de mesurer en parallèle leur effet sur le maintien du chimiotactisme. Il serait également intéressant d'étudier ces additifs à des concentrations différentes, celles de

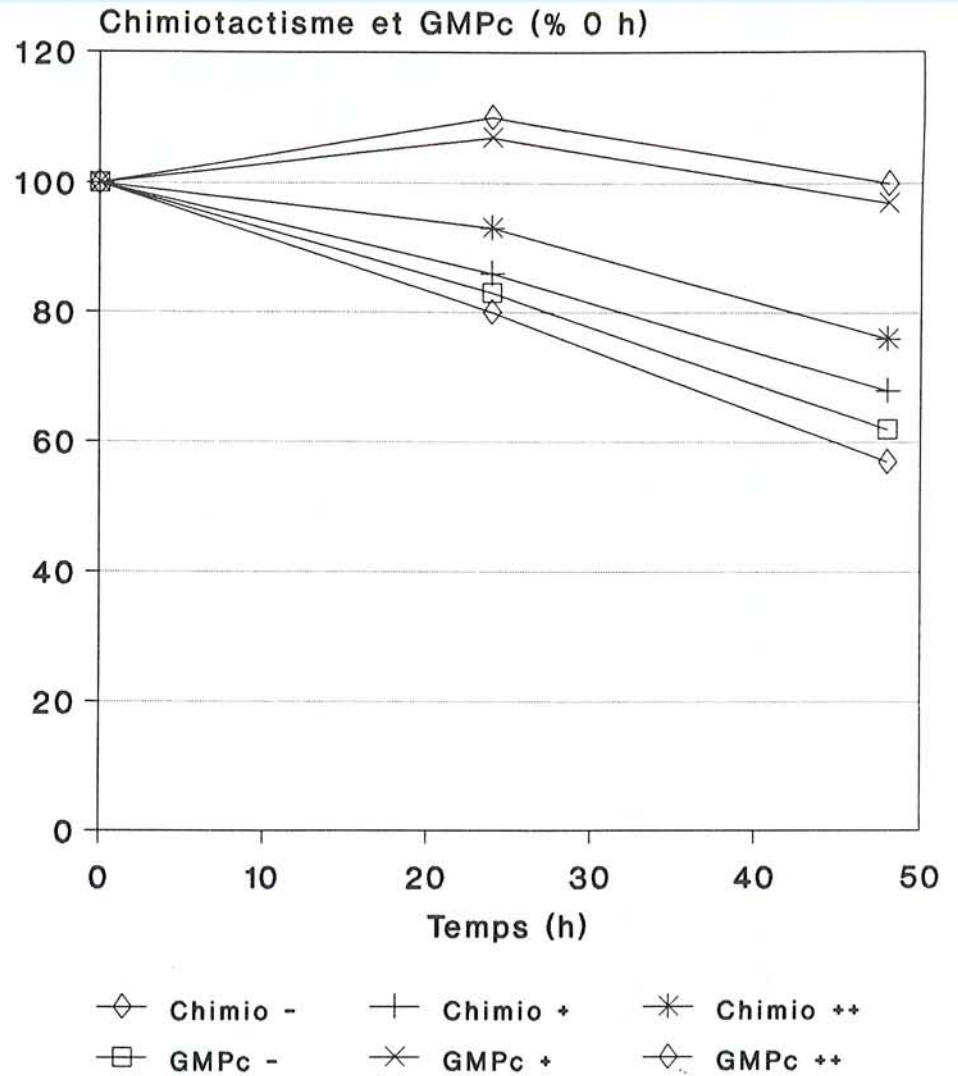
notre essai ayant été sélectionnées d'après les meilleurs résultats de la littérature (25,35-38).

Tableau XXXIV: action du GMPc et de l'acétylcholine sur le maintien du GMPc intragranulocytaire et du chimiotactisme.

Durée de la conservation																												
Paramètre mesuré	0h						24 h						48 h															
	0			+			++			0			+			++				0			+			++		
	X $\pm$ SD	% oh	P	X $\pm$ SD	% oh	P	X $\pm$ SD	% oh	P	X $\pm$ SD	% oh	P	X $\pm$ SD	% oh	P	X $\pm$ SD	% oh	P		X $\pm$ SD	% oh	P	X $\pm$ SD	% oh	P	X $\pm$ SD	% oh	P
GMPc (fmol/106 PN)	29 $\pm$ 3	100	NS	30 $\pm$ 4	100	NS	29 $\pm$ 3	100	NS	24 $\pm$ 2	83	NS	32 $\pm$ 4	107	NS	32 $\pm$ 4	110	NS	18 $\pm$ 2	62	<0.001	29 $\pm$ 4	97	NS	29 $\pm$ 9	100	NS	
Chimiotactisme (mm)	1.96 $\pm$ 0.19	100	NS	1.92 $\pm$ 0.20	100	NS	1.94 $\pm$ 0.22	100	NS	1.56 $\pm$ 0.10	80	<0.01	1.65 $\pm$ 0.22	86	NS	180 $\pm$ 0.17	93	NS	1.12 $\pm$ 0.11	57	<0.001	1.32 $\pm$ 0.17	68	<0.001	1.48 $\pm$ 0.13	76	<0.01	

0 : sans CGMP et acétylcholine
 + : avec acétylcholine
 ++ : avec GMPc
 X $\pm$ SD : moyenne $\pm$ écart-type
 % Oh : % de la valeur obtenue au temps 0h

Figure 20 : Evolution du chimiotactisme et du GMPc intragranulocytaire en fonction de l'apport de GMPc ou de l'acétylcholine au milieu de conservation.



- : Absence de guanosine monophosphate cyclique ou d'acétylcholine
 + : Apport d'acétylcholine
 ++ : Apport de guanosine monophosphate cyclique

2.2.Etude électrophorétique de la membrane de PN conservés.

2.2.1.Introduction.

Dans le cadre de notre étude, nous avons sélectionné des critères de bonne conservation basés sur l'analyse de l'évolution de certaines fonctions des PN au cours de la conservation. Il faut toutefois noter que la mesure de la libération de lysozyme et de bêta-glucuronidase dans le milieu de conservation peut être considéré comme un reflet d'une lésion structurelle des granules des PN.

Certains auteurs ont sélectionné des critères morphologiques pour mettre en évidence des lésions des PN au cours de la conservation de ceux-ci. La microscopie optique (frottis colorés au May-Grünwald-Giemsa, examen en contraste de phase...) et la microscopie électronique, en particulier, ont été utilisées par plusieurs auteurs qui mettaient en évidence des lésions multiples des PN: atteinte des granules et du cytosquelette, anomalies de répartition de la chromatine nucléaire, vacuolisation, expansions cytoplasmiques...(69).

Une autre approche du problème peut être réalisée par une étude plus spécifique de modifications éventuelles de certaines structures du PN au cours de la conservation.

L'électrophorèse constitue une des méthodes d'analyse de la membrane du PN et nous avons choisi d'utiliser cette technique dans le cadre de notre travail.

De plus, à notre connaissance, cette étude n'a été effectuée par aucun auteur de la littérature examinée.

2.2.2.Matériel et méthodes.

2.2.2.1.Récolte des PN.

Les PN sont récoltés par ponction veineuse, selon les critères préalablement décrits (donneurs sains).

2.2.2.2.Séparation des PN.

Toutes les manipulations sont réalisées stérilement. Les PN sont séparés par sédimentation sur dextran, selon la technique décrite dans l'annexe 15; puis sont mis en suspension dans le Plasmion^R.

2.2.2.3.Additifs de conservation utilisés.

Les additifs suivants, à la concentration finale indiquée, sont utilisés: bicarbonate de sodium 9 mmol/ L, glucose 5.5 mmol/ L, ATP 1 μ mol/ L, vitamine C 10 μ mol/ L, NADH 1 μ mol/ L, NADPH 1 μ mol/ L, vitamine E 46 μ mol/ L, amikacine 34 μ mol/ L et ampicilline 41 μ mol/ L.

2.2.2.4.Numérations cellulaires.

Elle est effectuée au temps 0 h, à l'aide d'un counter STKR (Coulter, USA).

2.2.2.5.Conditions de conservation.

La conservation est effectuée à température ambiante (mesurée pour chaque essai), en l'absence d'agitation et de lumière.

2.2.2.6.Analyse électrophorétique des protéines de membrane du PN.

Cette technique est décrite en détail dans l'annexe 10. Nous n'en décrivons ici que les grandes lignes.

2.2.2.6.1.Séparation des membranes de PN.

Les PN sont isolés à partir du milieu de conservation par l'utilisation d'un gradient de densité sur Percoll^R (Pharmacia, Suède). Ils sont ensuite lysés grâce à une bombe à azote (Kontes, USA). Puis, les membranes sont séparées des noyaux et des granules par 3 centrifugations successives à 500 g, 20000 g et 80000 g, à 20°C.

2.2.2.6.2. Analyse électrophorétique.

Elle est réalisée par migration sur gel de polyacrylamide à 8 % additionné de dodécylsulfate de sodium. L'intensité du courant électrique est fixée à 20 mA et la migration dure environ 2 h.

2.2.2.6.3. Révélation des protéines.

Elle est effectuée par une coloration argentique.

2.2.2.7. Protocole expérimental.

Nous comparons le profil électrophorétique de PN au temps 0 h (contrôle) avec le profil de ces mêmes PN, conservés pendant 24 h (essai). Le nombre de déterminations effectuées est de cinq.

Il faut noter que les profils électrophorétiques de PN conservés 24 h en l'absence d'additifs est irréalisable en raison de la formation massive d'agrégats macroscopiques.

2.2.3. Résultats.

2.2.3.1. Numération cellulaire.

Les résultats de numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes sont de $19.8 \pm 2.0 \cdot 10^9/L$, $14.7 \pm 1.5 \cdot 10^9/L$, $17.0 \pm 5.0 \cdot 10^9/L$ et $25.0 \pm 7.0 \cdot 10^9/L$, respectivement (moyenne $\pm$ écart-type).

2.2.3.2. Pureté des PN après sédimentation sur gradient de Percoll.

La pureté obtenue est de $96 \pm 2 \%$ (moyenne $\pm$ écart-type).

2.2.3.3. Comparaison des profils électrophorétiques entre contrôles et essais.

La figure 21 illustre la comparaison des profils électrophorétiques obtenus pour les contrôles et les essais.

2.2.4. Discussion.

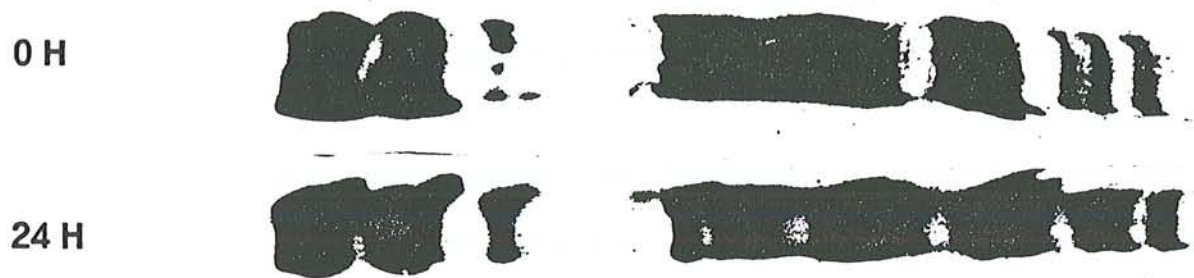
Les profils électrophorétiques ne montrent pas de différences détectables de façon évidente. Ceci ne signifie pas qu'il n'existe aucune altération morphologique membranaire, mais plutôt qu'elles ne sont pas détectables par cette méthode. En effet, des altérations de récepteurs membranaires pour des facteurs chimiotactiques (FMLP) ont été décrites par certains auteurs. Elles ont nécessité d'autres méthodologies (études d'affinité pour des peptides synthétiques marqués à l'aide d'un isotope).

D'autre part, il est possible que des altérations soient finalement détectables par cette méthode, mais seulement après plusieurs jours de conservation.

En conclusion, cette approche d'analyse structurale s'avère beaucoup moins sensible et nettement plus complexe au point de vue méthodologique que la mesure de certaines fonctions du PN (par exemple, le chimiotactisme).

Suite à ces résultats difficilement utilisables dans le cadre de la conservation des PN, nous avons choisi de développer une autre technique d'analyse des protéines du PN, basée sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

*Figure 21 : Tracés électrophorétiques
correspondant aux membranes de
polynucléaires neutrophiles conservés durant
0 h et 24 h.*



2.3. Analyse des protéines du PN par chromatographie liquide à haute performance en phase réverse (RP-HPLC).

2.3.1. Introduction.

La chromatographie liquide à haute performance en phase réverse (RP-HPLC) est une technique qui a connu un grand succès, dans beaucoup de domaines de la biologie.

Evans a mis en évidence que des protéines marqueuses de la différenciation des PN de cobayes sains pouvaient être détectées directement à partir du lysat cellulaire par RP-HPLC (253). L'analyse des fractions cellulaires montre que ces protéines de différenciation sont associées aux granules et à la membrane des PN. En particulier, le lysozyme et la lactoferrine peuvent être identifiés par cette méthode (253).

De plus, Evans a décrit une technique de RP-HPLC permettant l'analyse de PN humains, sains ou pathologiques. Les PN de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) analysés par cette méthode possèdent un profil chromatographique différent de celui des PN provenant de donneurs sains (253).

Suite aux résultats décevants de l'analyse électrophorétique de membranes de PN conservés, nous avons essayé d'adapter cette technique à l'analyse de PN.

2.3.2. Matériel et méthodes.

2.3.2.1. Récolte des PN.

Les PN sont obtenus par une ponction veineuse de 30 ml, chez des donneurs sains.

2.3.2.2.Séparation des PN.

L'extraction des protéines est réalisée à partir de 10^8 PN. Les PN sont obtenus par sédimentation sur Percoll^R; cette procédure est reprise en détail dans l'annexe 10.

2.3.3.3.Analyse des PN par RP-HPLC.

Nous avons analysé les PN dans leur intégrité par RP-HPLC. Cette technique est décrite en détail dans l'annexe 11, nous n'en décrivons ici que les grandes lignes.

L'extraction des protéines est réalisée à l'aide du mélange recommandé par Evans: un culot de 10^7 PN (lavé deux fois avec du PBS) est extrait deux fois par 2 ml d'un mélange acétonitrile 10 % v/v, acide trifluoroacétique 0.1 % v/v et de PMSF 1.0 mmol/ L, le tout en solution aqueuse.

L'analyse chromatographique est réalisée à l'aide d'un chromatographe Varian LC 500 (Varian, USA), d'une colonne C18 Aquapore et d'un détecteur UV (longueur d'onde: 205 nm). La phase mobile est constituée par un gradient d'acétonitrile additionné d'acide trifluoroacétique à 0.1 % par rapport à une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique à 0.1 %.

Le nombre de manipulations est de cinq.

2.3.3.Résultats.

La pureté en PN par rapport à l'ensemble des leucocytes est de 95 %.

Le profil chromatographique obtenu est illustré par la figure 22. Nous avons aussi effectué l'extraction des protéines du milieu Plasmion^R pur (figure 23).

2.3.4.Discussion.

La présence massive de gélatine (constituant majeur du milieu de conservation Plasmion^R) constitue un facteur très gênant dans l'analyse des chromatographes, si l'analyse était effectuée sur des PN conservés dans ce

milieu, en raison de l'énorme pic alors détecté (figure 23). Ce pic masque peut-être la détection de protéines qui auraient été intéressantes dans le cadre de cet étude.

Le profil chromatographique obtenu pour les PN entiers est assez proche de celui obtenu par Evans (253). Par comparaison avec cet auteur, les pics de lysozyme et de lactoferrine correspondent très vraisemblablement avec les deux pics indiqués par les flèches dans la figure 22. Il faudrait néanmoins poursuivre l'étude en RP-HPLC en analysant par cette technique des profils correspondant à des protéines pures (lysozyme, lactoferrine, protéines du cytosquelette...).

Cette étude pourrait être complétée par une identification plus poussée des pics détectés, par exemple par immunoblotting. Une autre approche pourrait être abordée, non plus à partir des PN totaux, mais de fractions subcellulaires, comme les membranes ou les granules de ces cellules. Evans a abordé ce problème pour les PN de patients atteints de LMC (254).

Une autre approche du problème pourrait être abordée en analysant des fractions d'éluats chromatographiques (RP-HPLC) par la technique d'électrophorèse des protéines du PN (annexe 10). Ceci aurait l'avantage de préciser le poids moléculaire des protéines détectées.

Figure 22 : Tracé chromatographique correspondant aux polynucléaires neutrophiles entiers, obtenu par chromatographie liquide à haute performance.

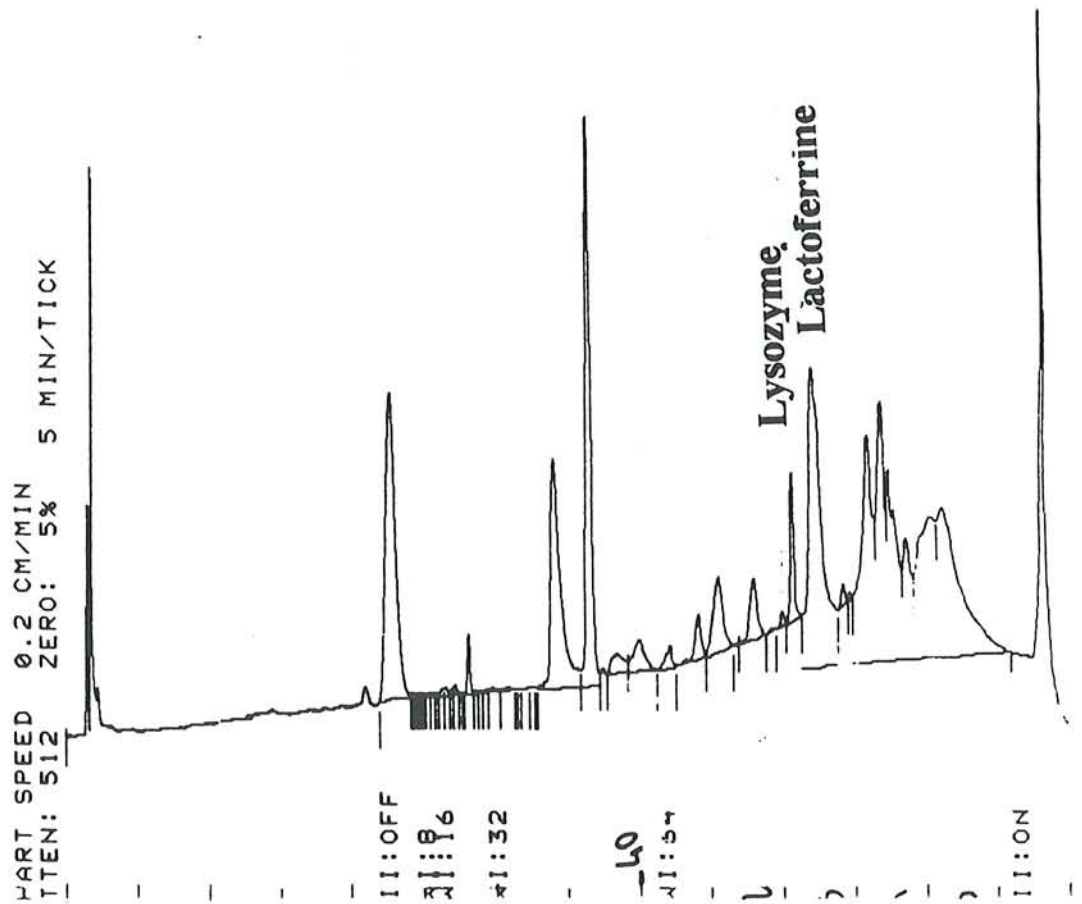
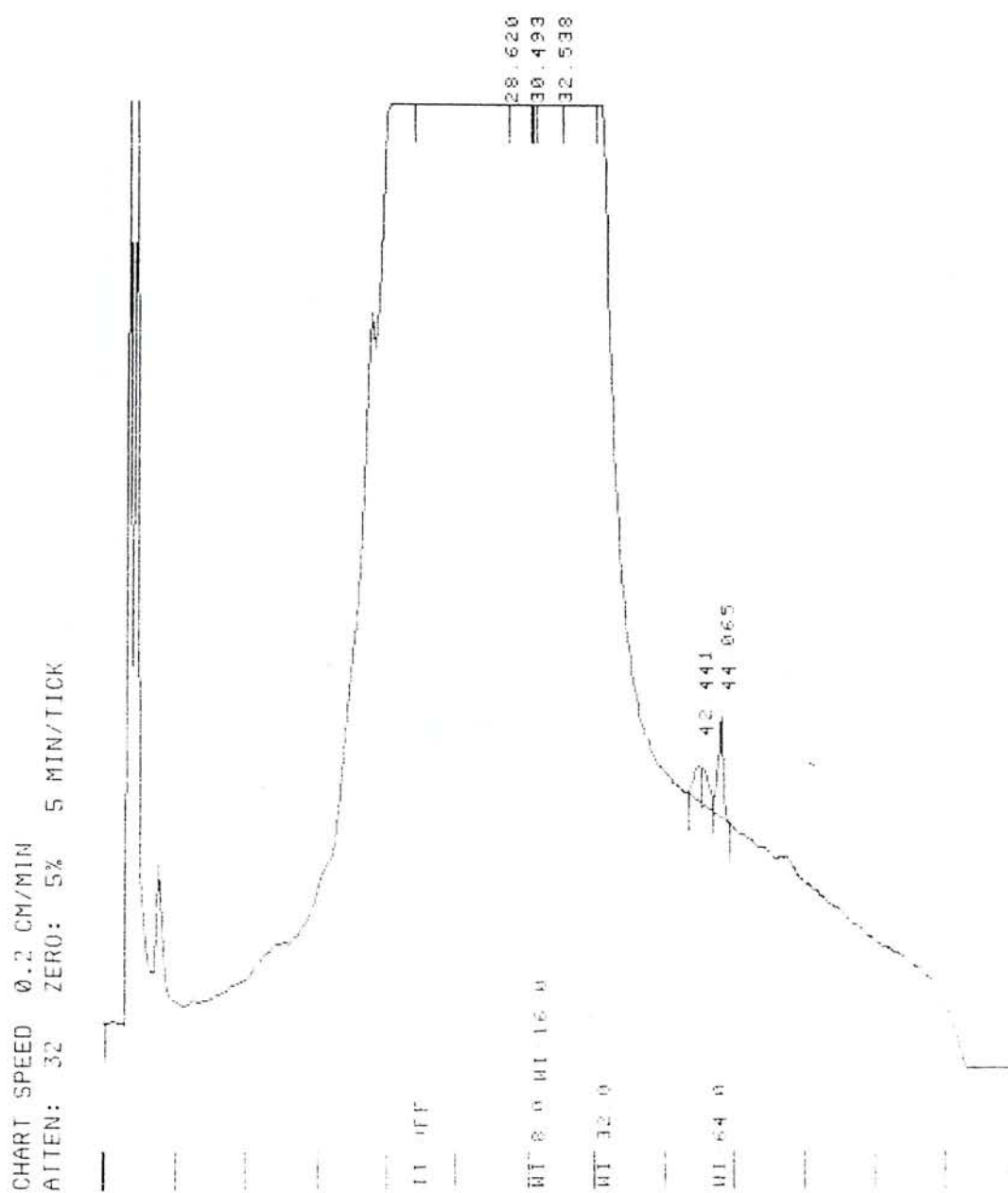


Figure 23 : Tracé chromatographique correspondant au Plasmion^R pur, obtenu par chromatographie liquide à haute performance.



2.4.Essai final.

2.4.1.Introduction.

Les essais précédents présentent un caractère expérimental et s'éloignent des conditions opératoires des cytaphérèses à but transfusionnel. Comme l'un des buts majeurs de cette étude est de tenter de trouver une solution au problème de la conservation des PN durant plusieurs jours, il nous semble nécessaire d'adapter les résultats de l'étude expérimentale à des concentrés leucocytaires obtenus normalement, par cytaphérèse "classique".

Les principales différences de cet essai par rapport aux précédents résident dans une concentration cellulaire beaucoup plus importante (aussi bien en PN qu'en cellules contaminantes), un volume de suspension cellulaire beaucoup plus élevé, ainsi qu'un conteneur de nature différente.

2.4.2.Matériel et méthodes.

2.4.2.1.Récolte des PN.

Cette technique est décrite en détail dans l'annexe 7, nous n'en donnerons ici que les grandes lignes.

Le prélèvement est effectué chez un donneur sain, ayant subi une prémédication aux glucocorticoïdes afin d'augmenter le rendement de la cytaphérèse. Les PN sont ensuite séparés par centrifugation en flux continu et recueillis dans une poche plastique utilisée pour les transfusions cliniques.

2.4.2.2.Etude fonctionnelle des PN.

Les paramètres suivants ont été mesurés au cours de la conservation des PN: chimiotactisme, migration spontanée, NBT, phagocytose, chimiluminescence, pH du milieu de conservation, libération de lysozyme et de bêta-glucuronidase.

2.4.2.3. Conditions de conservation des PN.

Toutes les étapes relatives à la conservation des PN s'effectuent stérilement, dans les conditions préalablement décrites.

Les PN sont conservés quatre jours à température ambiante (notée pour chaque essai), dans la poche de prélèvement, à l'obscurité et sans agitation.

Les additifs de conservation utilisés sont identiques à ceux retenus pour les essais précédents, mais à une concentration plus élevée, en fonction de la concentration cellulaire plus importante. La concentration en PN et en leucocytes est environ dix fois plus grande pour les poches de cytophèreses que pour les PN obtenus par ponction veineuse; la contamination en érythrocytes et en plaquettes est encore plus élevées (environ trente fois). Nous avons décidé, sur la base de ces données de multiplier la concentration finale des additifs de conservation par un facteur dix. Les concentrations finales sont donc les suivantes: bicarbonate de sodium 90 mmol/ L, glucose 55 mmol/ L, ATP 10 μ mol/ L, vitamine C 100 μ mol/ L, NADH 10 μ mol/ L, NADPH 10 μ mol/ L, vitamine E 460 μ mol/ L, amikacine 340 μ mol/ L et ampicilline 410 μ mol/ L (254). Tous ces additifs sont ajoutés au milieu de conservation par l'intermédiaire d'un système de connexion stérile (Sampling site coupler, Fenwal, USA)) (254).

Le milieu de conservation est constitué par le liquide dans lequel baignent les cellules collectées par cytophèrese, constitué de plasma et des liquides utilisés lors du prélèvement (gélatine, héparine,...). Sa composition précise est donc inconnue.

Pour l'essai, les additifs de conservation sont ajoutés au temps 0 h, 24 h, 48 h et 72 h.

Pour le contrôle, aucun additif n'est ajouté.

La numération cellulaire est effectuée au temps 0 h, par la méthode précédemment décrite (counter STKR).

La recherche d'endotoxines est réalisée à l'aide du coffret-réactif IBF (IBF, France).

2.4.2.4. Analyse statistique.

Elle est effectuée par le test d'analyse de variance et le nombre d'essais est de 6. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne $\pm$ écart-type.

2.4.3. Résultats.

La numération cellulaire pour les leucocytes, les PN, les érythrocytes et les plaquettes est de $53.0 \pm 1.6 \cdot 10^9 / L$; $43.7 \pm 1.7 \cdot 10^9 / L$; $1670 \pm 40 \cdot 10^9 / L$ et $1054 \pm 27 \cdot 10^9 / L$, respectivement.

La température de conservation est de $22 \pm 2^\circ C$ et la recherche d'endotoxines est négative pour tous les essais.

Pour le contrôle au temps 0 h, les résultats sont les suivants: chimiotactisme (mm): 1.70 ± 0.24 , migration spontanée (mm): 0.82 ± 0.10 , NBT (%): 96 ± 1 , phagocytose (%): 99 ± 1 , pH: 7.02 ± 0.08 , chimiluminescence pic (V/sec. 10^6 PN): 5.3 ± 1.5 , chimiluminescence (V/sec. 10^6 PN): 2.8 ± 1.0 , lysozyme ($\mu g/mL$): 12 ± 6 et bêta-glucuronidase (US/mL): 24 ± 6 .

Aux temps 24 h, 48 h, 72 h et 96 h, la formation massive d'agrégats macroscopiques a été observée au niveau du contrôle, rendant impossible la mesure des fonctions du PN.

Les résultats de l'essai (avec additifs) sont repris dans le tableau XXXV. Les figures 24a et 24b illustrent l'évolution des paramètres mesurés au cours de cette conservation de 4 jours.

2.4.4. Discussion.

La formation massive d'agrégats observée pour le contrôle illustre la nécessité absolue d'utiliser les additifs de conservation. Pour l'essai (milieu pourvu

d'additifs), aucune formation d'agrégats macroscopiques n'a été mise en évidence.

Le chimiotactisme et la migration spontanée ne diminuent significativement ($p < 0.001$) qu'au bout de 72 h de conservation. Dans l'essai précédent de conservation durant 4 jours des PN, le chimiotactisme était déjà significativement diminué au bout de 48 h (250,251).

A 72 h de conservation, le chimiotactisme est maintenu à 55 %, alors que pour l'essai précédent, il était maintenu à 46 % et que Glasser (meilleur résultat de la littérature examinée) obtient 15 % (174,250,251).

A 96 h de conservation, le chimiotactisme est maintenu à 37 %, alors qu'il était maintenu à 20 % pour l'essai précédent (Glasser ne donnant pas de résultats à 96 h) (50,174,251).

La conservation de la mobilité du PN est donc mieux maintenue avec le modèle proche des conditions transfusionnelles qu'avec le milieu Plasmion^R. Ceci pourrait en partie être expliqué par la nature de la poche transfusionnelle Fenwal, qui assure peut-être de meilleures conditions de conservation : échanges gazeux optimaux et réduction de l'adhérence des PN aux parois du conteneur. Ces facteurs pourraient être déterminants pour des conservations de longue durée (254).

D'autre part, la contamination massive en lymphocytes, érythrocytes et plaquettes ne semble pas jouer un rôle très défavorable au niveau de la conservation des PN. L'approximation qui consiste, dans une certaine mesure, à augmenter en proportion directe la concentration des additifs selon la concentration en PN semble donc avoir donné des résultats satisfaisants (254). En particulier, l'apport accru de bicarbonate n'a pas entraîné une alcalinisation excessive du milieu et l'augmentation de concentration en glucose ne semble pas avoir engendrée une destruction notable des PN par un phénomène de lyse osmotique. La procédure d'apport journalier du bicarbonate permet un maintien correct du pH, celui-ci ne chutant pas en-dessous de 7.2, ce qui est

sans doute le facteur majeur de maintien des fonctions du PN, en particulier du chimiotactisme.

Le milieu non défini (mélange de plasma, de macromolécules, d'héparine...) correspondant au liquide dans lequel baignent les PN obtenus par cytophérèse constitue un bon milieu de conservation par rapport au Plasmion^R, pour autant que les additifs soient ajoutés tous les jours (254).

Le NBT, la phagocytose et la chimiluminescence ne diminuent pas significativement au cours des 4 jours de conservation des PN, ce qui constitue un résultat satisfaisant. Toutefois, le pic de chimiluminescence diminue au bout de 72 h.

La dégranulation des PN est déjà notable au bout de 24 h de conservation, en ce qui concerne la libération de lysozyme. Il faut toutefois considérer par rapport aux essais précédents que la concentration en PN est beaucoup plus élevée (environ 10 fois), ce qui explique cette libération rapidement significative du contenu des granules du PN.

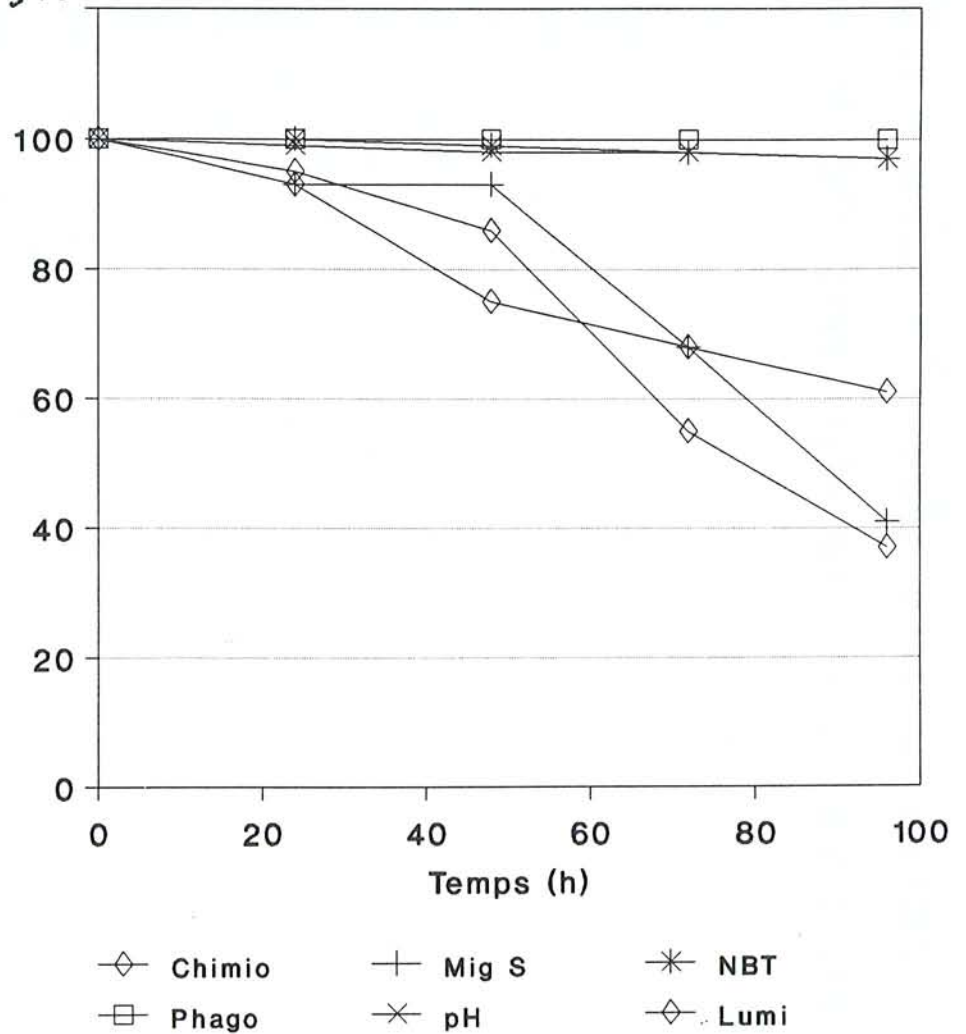
En conclusion, cet essai final a donné des résultats satisfaisants au point de vue de la conservation des fonctions du PN. Toutefois, le processus d'apport journalier d'additifs reste fastidieux et peu adapté à une utilisation du système en routine en raison de l'aspect très contraignant du respect de la stérilité de la procédure, absolument indispensable dans ce contexte (254).

D'autres solutions techniques pourraient être abordées dans des travaux ultérieurs, comme l'utilisation de récipients contenant un ou plusieurs additifs, et reliés à la poche transfusionnelle par une tubulure stérile. Le contenu de ces récipients pourrait être mis en contact avec la suspension cellulaire au bout d'un laps de temps adéquat.

Cette approche pose plusieurs difficultés, comme la compatibilité chimique des additifs entre eux (s'ils étaient mis dans un récipient unique). De plus, la température de conservation des additifs est de 4°C dans le cadre de cette étude, alors que la conservation des PN se déroule à 22°C, ce qui risquerait de

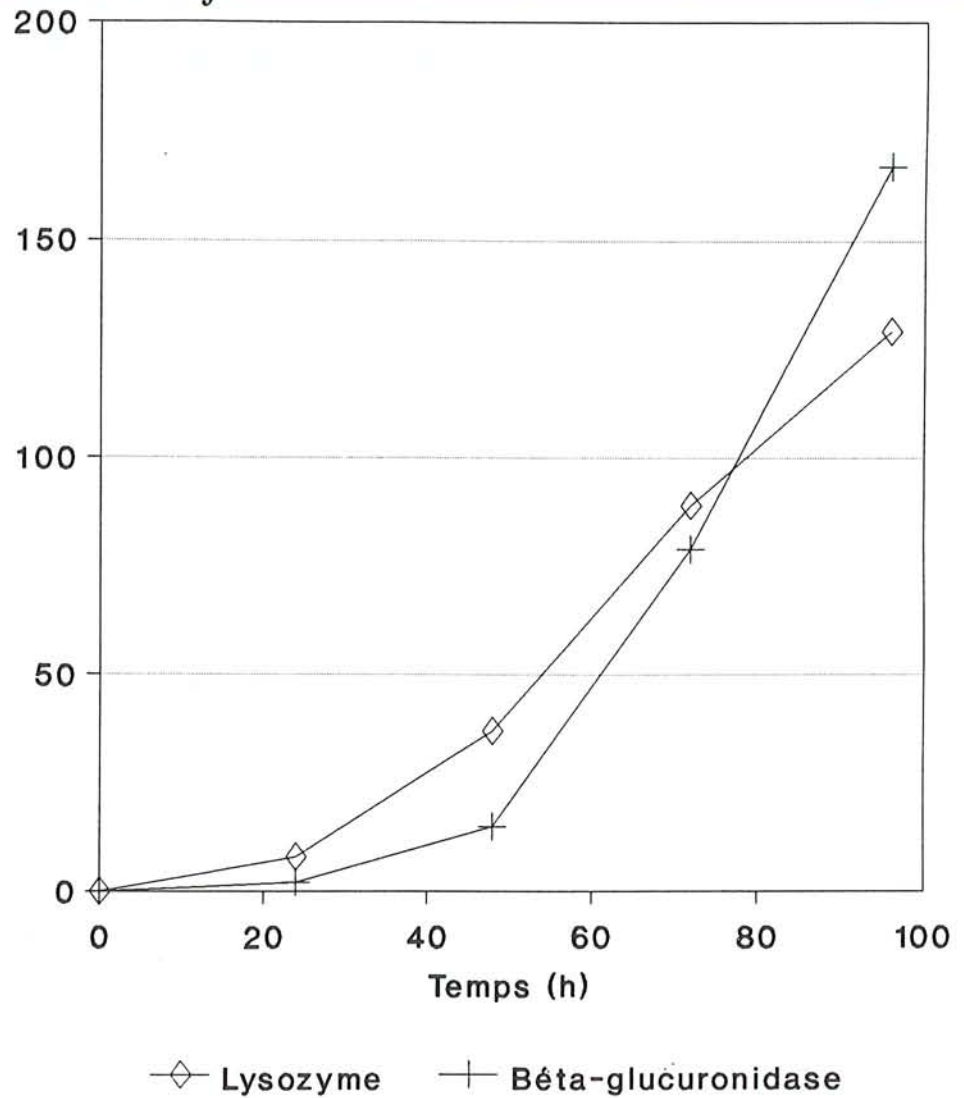
dégrader plusieurs composés comme le NADH, le NADPH et les antibiotiques, par exemple.

Figure 24a : Evolution du chimiotactisme, de la migration spontanée, de la phagocytose et de la chimiluminescence au cours d'une conservation de 96 h avec apport journalier des additifs. % 0 h



Chimio : Chimiotactisme
 Mig S : Migration spontanée
 NBT : Nitrobleu de tétrazolium
 Phago : Phagocytose
 Lumi : Chimiluminescence

Figure 24b : Evolution du lysozyme et de la bêta-glucuronidase au cours d'une conservation de 96 h avec apport journalier des additifs.



Le lysozyme est exprimé en différence de concentration ($\mu\text{g/ mL}$) entre les conservations de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h.
 La bêta-glucuronidase est exprimée en différence d'activité (US/ mL) entre les conservations de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h.

3.Conclusion

3.1. Intérêt et limites du modèle.

Le modèle retenu est basé 1) sur une analyse préalable de la littérature; 2) sur une étude expérimentale, qui a été basée sur des analyses de fonctions du PN ainsi que sur des analyses de la structure de cette cellule.

Nous décrivons une conservation en milieu liquide des PN, basée sur l'utilisation d'une gélatine fluide modifiée (Plasmion^R). Ce modèle présente l'avantage d'être synthétique (composition connue) et injectable (avantage en cas d'utilisation thérapeutique).

Plusieurs composés ont été ajoutés au milieu de conservation: bicarbonate de sodium 9 mmol/ L, glucose 5.5 mmol/ L, ATP 1 μ mol/ L, vitamine C 10 μ mol/ L, NADH 1 μ mol/ L, NADPH 1 μ mol/ L, vitamine E 46 μ mol/ L, amikacine 34 μ mol/ L et ampicilline 41 μ mol/ L. La température ambiante (20-25°C), l'absence d'agitation et l'obscurité sont également des facteurs utiles à la conservation des PN.

Une donnée expérimentale importante réside dans la nécessité d'ajouter une quantité adéquate de ces additifs tout au long de la conservation. Nous avons pu ainsi prolonger la conservation des PN pendant 4 jours, dans des conditions relativement satisfaisantes (à notre connaissance, meilleur résultat de la littérature à ce jour).

Une autre considération capitale concerne le choix de critères adéquat de bonne conservation. La littérature révèle une liste très longue de paramètres analysés durant la conservation des PN. Dans le cadre de notre étude, le chimiotactisme s'est avéré être le paramètre le plus précocement perturbé au cours de la conservation, et le meilleur critère de bonne conservation.

L'ATP est un additif de conservation intéressant pour le maintien du chimiotactisme, qui agit sans traverser la membrane du PN et dont l'effet est lié à la molécule dans son intégrité (action beaucoup plus faible de l'adénosine, non significative du phosphate).

Le maintien du taux de GMPC à un niveau satisfaisant est un critère de bonne conservation intéressant, mais moins sensible que le chimiotactisme. Par ailleurs, les agents augmentant le taux de GMPC intragranulocytaire (acétylcholine...) et le GMPC lui-même améliorent le maintien du chimiotactisme des PN conservés in vitro.

L'analyse structurelle du PN: analyse électrophorétique de la membrane du PN et analyse par RP-HPLC des PN totaux, a donné des résultats moins directement utilisables que l'analyse fonctionnelle.

La principale limite de ce modèle est probablement la nécessité d'ajouter journallement les additifs de conservation, dans des conditions de stérilité adaptées. Il serait donc souhaitable de mettre au point un dispositif efficace qui puisse permettre l'apport de ces additifs de façon adéquate.

3.2.Applications pratiques possibles.

Nous avons essayé d'extrapoler les conclusions des études expérimentales à un modèle proche de celui utilisé pour les transfusions de PN.

Les PN sont prélevés par la technique habituelle de cytophérèse appliquée au centre de transfusion de Nancy. Les additifs de conservation préconisés sont ajoutés journallement, durant quatre jours, à l'aide d'un système de connexion stérile. Les concentrations des additifs sont ajustées en fonction de la concentration en PN (concentration 10 fois plus élevée en rapport avec une concentration en PN dix fois plus élevée par rapport au modèle de départ).

Dans ces conditions, le maintien des fonctions du PN est relativement satisfaisant. Toutefois, le chimiotactisme n'est conservé qu'à 37 % au bout de 4 jours. D'autre part, l'inconvénient d'ajouter quotidiennement les additifs de conservation persiste.

L'idéal serait d'obtenir une forme retard d'apport d'additif (microcapsules?), mais ceci n'a pas été développé dans le cadre de notre étude.

3.3.Perspectives d'avenir.

L'utilisation des PN dans un cadre transfusionnel s'est considérablement réduite, en raison de l'apparition des chambres stériles, de nouvelles générations d'antibiotiques et surtout des cytokines, pour le traitement des neutropénies. Toutefois, l'utilisation de ces 2 dernières voies thérapeutiques n'est pas dénuée d'inconvénient: résistances sans cesse renouvelées aux antibiotiques, toxicité des cytokines, coût de ces traitements...

Dans un certain nombre de manipulations expérimentales, il serait intéressant de prolonger la durée de vie in vitro des PN, par exemple pour étudier des interactions cellulaires entre les PN et les plaquettes.

En résumé, l'étude expérimentale menée jusqu'à présent n'est ni parfaite, ni exhaustive mais a néanmoins permis une amélioration significative de la conservation des PN, quasi nulle au point de départ pour atteindre finalement quatre jours.

4. Annexes techniques

Annexe 1 : Migration par chimiotactisme et migration spontanée des polynucléaires.

1. Matériel.

- .Boîtes de Pétri stérilisées en plastique pour culture cellulaire 60 X 15 mm (Falcon 3002, USA).
- .Bain-Marie bouillant.
- .Incubateur à 37°C, 5 % CO₂ et 100 % d'humidité (Flow laboratories, U.K.).
- .Tubes jaugés de 10 ml en verre.
- .Emporte-pièce pour gélose de 3 mm de diamètre intérieur.
- .Microscope Wild Heerbrug (Suisse).

2. Réactifs.

- .Suspension fraîchement isolée de PN
- .Eau distillée.
- .Minimum essential medium (M.E.M.) concentré 10 X (Gibco, UK).
Conservation: 2 à 3 mois à 4°C.
- .Bicarbonate de sodium à 70 g/ L (Gibco, UK).
- .Sérum humain inactivé par la chaleur (56°C pendant 30 min). Conservation: à - 80 °C.
- .Agarose (Indubiose, l'Industrie Biologique Française, France).
- .Méthanol (Coopérative Pharmaceutique de Melun, France).
- .Formol (Prolabo, France).
- .Fuschine basique (Société Chimique Pointet Girard, France) à 1 % dans l'éthanol (Coopérative Pharmaceutique Française, France).
- .Formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) (Sigma, USA) 10⁻⁷ mol/ L.

Préparer d'abord une solution 10^{-3} mol/ L en dissolvant 2.2 mg de FMLP dans 5 mL de milieu M.E.M.(500 μ L de M.E.M. 10 X, 100 μ L de bicarbonate sodique à 75 g/ L et 2 mL d'eau distillée). Faire ensuite deux dilutions au centième. Conserver à -20°C au moins 15 jours avant l'utilisation.

3.Préparation des boîtes d'agarose.

Les quantités indiquées sont données pour la confection de 4 boîtes. Peser 0.24 g d'agarose dans un tube jaugé de 10 mL. Ajouter peu à peu et en délayant vigoureusement dans de l'eau distillée jusqu'à 10 mL. Placer 5 à 10 minutes au bain-marie bouillant jusqu'à ce que le mélange soit homogène et ne renferme plus de bulles.

Pendant ce temps, dans un bécher, déposer aussi stérilement que possible:

.5.8 mL d'eau distillée stérile.

.2.0 mL de M.E.M. 10 X.

.2.0 mL de sérum inactivé.

.0.2 mL de bicarbonate de sodium 7.5 %.

Ajouter ensuite l'agarose liquide dans le bécher. Mélanger.

Distribuer 4.7 mL de milieu dans chaque boîte de Pétri en évitant l'introduction de bulles d'air, la surface de la gélose devant être lisse. Remuer horizontalement les boîtes et les laisser refroidir 30 min à 4°C.

A l'aide d'un modèle sur papier millimétré, on découpe à l'emporte-pièce 4 séries de 2 puits disposés de façon radiaire et séparés entre eux de 3 mm (le plus rigoureusement possible). Il faut veiller à ne pas griffer la surface du plastique, ce qui inhiberait la migration des polynucléaires, et à découper des puits bien verticaux. Enlever les morceaux d'agarose découpés à l'aide d'une trompe à vide et d'une pipette Pasteur à bec fin.

Il est nécessaire de travailler sur des géloses aussi stérilement que possible afin d'éviter l'apport "sauvage" de cytotoxines (bactéries) qui viendraient fausser les migrations.

4. Test de chimiotactisme et de migration spontanée.

Dans 3 puits externes, déposer 10 μL de FMLP; ne rien déposer dans le quatrième (migration spontanée des PN). Déposer dans les 4 puits externes 10 μL de suspension de polynucléaires. Recouvrir ensuite les boîtes de leur couvercle et les porter dans l'incubateur. Le temps d'incubation est de 3 heures, après quoi les gélases sont fixées et colorées.

5. Fixation et coloration des gélases.

Recouvrir la surface de la gélase avec 5 mL de méthanol, pendant 30 min. Si on ne dispose pas du temps complet pour la fixation et la coloration, on peut allonger ce temps à une nuit ou un week-end en mettant les boîtes à 4 °C. Sinon, après 30 min, le méthanol est remplacé par 5 mL de formol pendant 30 min précises. Éliminer le formol. Détacher ensuite soigneusement la gélase de la boîte, pour ne pas déplacer les images de migration. Puis, colorer les boîtes avec quelques gouttes de fuchsine. Rincer doucement à l'eau distillée et laisser sécher.

6. Lecture.

Au microscope avec oculaire de 10, dont un avec grille, les réglages suivants sont effectués:

- .objectif de 10.
- .boîte retournée fond en l'air.
- .loupe du condenseur enlevée.

En positionnant la grille en bordure du puits des polynucléaires, mesurer les distances A (migration par chimiotactisme) et B (migration spontanée) de façon radiaire, en repérant la bande de grille qui renferme encore au moins 2 PN ayant migré. Faire la moyenne des résultats pour A et B et convertir le nombre obtenu en mm, en sachant qu'une bande correspond à 0.12 mm.

Annexe 2 : Test cytochimique de réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) et de phagocytose.

1. Matériel.

.Bain-marie avec mélangeur Thermomix 1420 B (Braun Melsungen, Allemagne).

Réglage du mélangeur: 160 oscillations/min.

.Centrifugeuse Minifuge (Hereaus Christ, RDA).

.Microscope Wild Heerbrugg (Suisse).

.Lames de verre.

2. Réactifs.

.Sérum AB.

.Solution de NBT (Sigma, USA) à 1 g/ L dans l'eau distillée. Conservation à 4°C.

.Suspension de billes de latex: Bactolatex 0.81 (Difco, USA), préparé par dialyse de 48 h en eau physiologique à température ambiante. Conservation à 4°C.

.Fuschine de Ziehl.

3. Technique.

.Dans un tube de 5 mL en plastique, mettre: 350 µL de sérum AB, 100 µL de NBT , 10 µL de latex.

.Incuber 15 min à 37°C, sous agitation.

.Ajouter 100 µL de suspension cellulaire à 2000 PN/µL.

.Incuber 15 min à 37°C, sous agitation.

.Centrifuger 10 min à 1500 g.

.Faire un étalement du culot cellulaire sur une lame de verre, après avoir ôté le surnageant. Laisser sécher. Colorer à la fuchsine.

4.Lecture des lames.

NBT

Microscope oculaire 10, grossissement 50 X, sous immersion. Différencier sur 100 PN le nombre de ceux qui ont phagocyté plus de 10 billes de latex par rapport à ceux qui ont phagocyté moins de 10 billes de latex. Le résultat est exprimé en pourcentage.

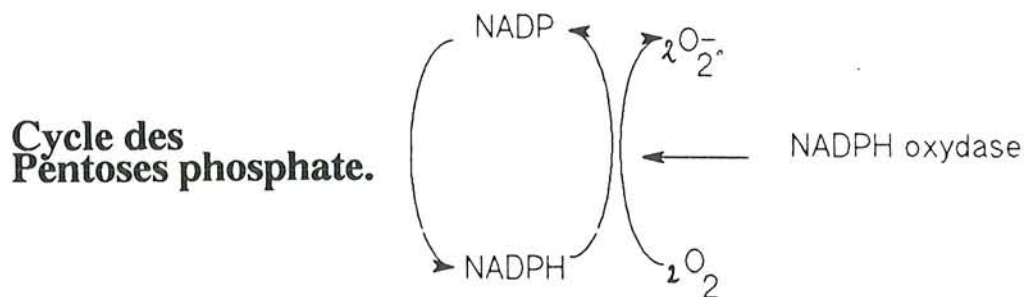
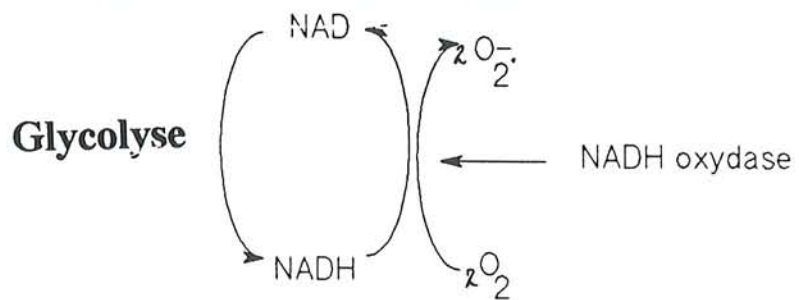
Phagocytose

Même réglage microscopique. Différencier sur 100 PN le nombre de ceux qui ont phagocyté plus de 10 billes de latex par rapport à ceux qui ont phagocyté moins de 10 billes de latex. Le résultat est exprimé en pourcentage.

Annexe 3 : Mesure de la chimiluminescence.

1.Principe.

Quand la cellule phagocytaire est activée par un stimulus phagocytaire, son métabolisme est augmenté: elle consomme plus d'oxygène. Cette augmentation de consommation d'oxygène s'accompagne de la production de divers métabolites oxygénés, hautement réactifs, générés comme suit :



Ces métabolites vont ensuite réagir avec le luminol et générer un signal lumineux, ensuite enregistrer par un luminomètre.

2.Matériel.

.Luminomètre 1251 (LKB Wallac, Finlande).

.Centrifugeuse Minifuge (Hereaus-Christ, RDA).

3.Réactifs.

.Tampon PBS-G pH 7.4.

.Suspension de PN à $5 \cdot 10^6$ /mL.

.Zymosan A (Sigma,USA) opsonisé. Réaliser une suspension à 15 g/l de zymosan A dans du sérum AB. Le zymosan est opsonisé pendant 1 h à 37°C, sous agitation. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 10 min à 400 g, et remplacé par un même volume de tampon PBS-G. Cette préparation peut être conservée par congélation.

. Luminol 10^{-4} mol/ L.

.Faire une solution stock de luminol 10^{-2} mol/ L: dissoudre 3.45 mg de luminol dans 2 mL de diméthylsulfoxyde (Merck, RDA). Conservation : une semaine à 4°C. Faire ensuite une solution diluée 10^{-4} mol/ L: dilution au centième de la solution stock dans du tampon PBS-G, au moment de l'emploi.

4.Mode opératoire.

Les mesures s'effectuent à 37°C. On utilise un échantillon et un blanc. Le mode opératoire est résumé comme suit:

	Essai	Blanc
Luminol 0.1 mmol/l (μl)	700	700
Zymosan opsonisé (μl)	200	/
PBS (μl)	/	200
Suspension cellulaire (μl)	100	100

Noter l'intensité maximale du signal (pic) et l'intégration du signal durant 25 min, exprimés en volt (V).

5.Expression des résultats.

Elle s'effectue de la manière suivante:

$$\begin{array}{l} \text{Emission maximale} \\ \text{de lumière} \\ \text{(V/sec.106 PN)} \end{array} = \frac{\text{pic échantillon (mv)} - \text{pic blanc (mv)}}{\text{Concentration en PN (106/μl)} \times 100}$$

$$\begin{array}{l} \text{Emission moyenne} \\ \text{de lumière} \\ \text{(V/sec.106 PN)} \end{array} = \frac{\text{Intégration échantillon (mv)} - \text{Intégration blanc (mv)}}{\text{Concentration cellulaire (106 PN/μl)} \times 150000}$$

Annexe 4 : Adénosine triphosphate (ATP) intragranulocytaire et extragranulocytaire.

1.Principe.

Mesure de l'ATP par bioluminescence selon la réaction suivante:



2.Matériel.

- .Luminomètre 1251 (LKB Wallac, Finlande).
- .Centrifugeuse Minifuge (Heraeus Christ, RDA).
- .Mélangeur Top-Mix 94323 (Bioblock Scientific, France).

3.Réactifs.

- .ATP monitoring reagent (LKB Wallac,Finlande). Mélange lyophilisé de luciférase de luciole et de luciférine (conservation: -20°C). La solution est reconstituée en ajoutant 10 mL d'eau distillée (conservation: 4°C).
- .Standard ATP (LKB Wallac, Finlande) (conservation: -20°C). Une solution 10^{-2} mol/ L est préparée en ajoutant 10 mL d'eau distillée au standard ATP lyophilisé (conservation:4°C).

.Réactif Tris-Acétate (LKB Wallac, Finlande) (conservation: 4 °C).

Tris-acétate: 0.1 mol/ L, EDTA (éthylène diamine tétraacétate): 2 mmol/ L (pH 7.75).

.Solution d'acide trichloracétique à 200 g/ L dans l'eau distillée (LKB Wallac, Finlande) (conservation: 4°C).

.Solution d'EDTA disodique dihydrate (Merck, RDA) 4 mmol/ L dans l'eau distillée (conservation: 4°C).

.Solution d'acétate sodique trihydrate (Prolabo, France) 2 mmol/ L dans l'eau distillée (conservation: 4°C).

4.Mode opératoire.

Si l'ATP est utilisé comme additif, centrifuger la suspension de PN 10 min à 400 g. Récupérer le surnageant qui servira à la détermination de l'ATP extragranulocytaire. Laver 2 fois le culot de PN avec le PBS glucosé (centrifugation: 10 min à 400 g). Remettre le culot en suspension et on effectue une numération des PN avec le counter STKR (Coulter, USA).

- Extraction de l'ATP intragranulocytaire.

.Mélanger 200 µL de TCA 200 g/ L et 200 µL de solution d'EDTA. Mélanger 200 µL de TCA/ EDTA et 200 µL de suspension de PN.

Mélanger 20 sec à l'aide du Top-Mix. Laisser 10 min à 4°C.

Centrifuger 5 min à 1500 g.

- Mesure de l'ATP par le luminomètre.

.La température est réglée à 25°C.

.Introduire dans la cuvette de mesure:

.100 µL d'ATP monitoring reagent.

.400 µL de réactif Tris-EDTA.

.10 µL d'acétate sodique.

.Lire l'intensité du signal (millivolt) = signal blanc

.Ajouter 100 μL d'extrait granulocytaire. Lire l'intensité du signal (millivolt) = signal échantillon.

.Ajouter 10 μL de standard ATP. Lire l'intensité du signal (millivolt) = standard ATP.

5.Calcul de la concentration d'ATP intragranulocytaire (IG).

$$\begin{array}{l} \text{Concentration en ATP} \\ \text{intragranulocytaire} \\ (\text{nmole ATP}/106 \text{ PN}) \end{array} = \frac{\frac{\text{Signal échantillon (mv)} - \text{signal blanc (mv)}}{\text{Signal standard (mv)} - \text{Signal blanc (mv)}}}{\text{Concentration en PN}/\mu\text{l}} \times 10^5$$

6.Calcul de la concentration d'ATP extragranulocytaire (EG).

La suspension de PN est centrifugée 10 min à 400 g. Le surnageant est séparé et servira pour la détermination de l'ATP extragranulocytaire. Le matériel et les réactifs sont identiques à ceux utilisés pour la mesure de l'ATP intragranulocytaire, mais ne reprend pas la procédure d'extraction.

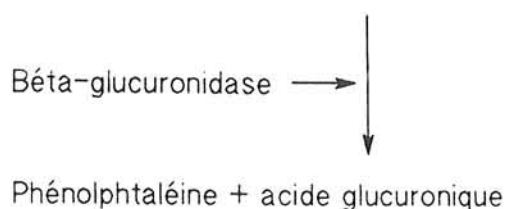
$$\begin{array}{l} \text{Concentration en ATP} \\ \text{extragranulocytaire} \\ (\mu\text{mol/l}) \end{array} = \frac{\text{Signal échantillon (mv)} - \text{Signal blanc (mv)}}{\text{Signal standard (mv)} - \text{Signal blanc (mv)}}$$

Annexe 5 : Dosage de la bêta-glucuronidase libérée dans le milieu de conservation.

1.Principe de la réaction.

Il est résumé comme suit:

Phénolphtaléinate d'acide mono bêta-glucuronique



Phénolphtaléine + NaOH $\longrightarrow$ Coloration rouge-violet (550 nm)

2.Matériel.

.Spectrophotomètre Shimadzu UV 160 (Japon).

.Bain-marie Haake D 8 (RDA).

3.Réactifs.

Coffret-réactif Sigma (USA), comportant

R1: tampon acétate: acétate de sodium 0.2 mol/ L (pH 4.5 à 25°C).

Conservation à 4°C.

R2: Phénolphtaléinate d'acide mono B glucuronique 0.03 mol/ L
(pH 4.5 à 25°C). Conservation à -18°C.

R3: Tampon AMP: -2 amino-2 méthyl-1 propanol (AMP) 0.1 mol/ L et
laurylsulfate de sodium 0.2 % (pH 11). Conservation à 4°C.

R4: Eau distillée.

4.Mode opératoire.

.Préparer la solution de dilution pour la calibration.

mL de tampon acétate (R1).

mL d'eau distillée (R5).

mL de tampon AMP (R3).

Mélanger.

.Préparer une solution diluée de phénolphtaléine (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

.0.2 mL de solution standard de phénolphtaléine (R4).

.4.8 mL de solution de dilution pour calibration.

.Mélanger.

.Préparer les solutions de calibration comme suit:

Tube numéro	Solution diluée de phénol- phtaléine (mL)	Solution de dilution (mL)	Concentration en phénol- phtaléine ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	0.3	5.7	2.0
2	0.6	5.4	4.0
3	0.9	5.1	6.0
4	1.2	4.8	8.0

.Lire l'absorbance à 550 nm contre un blanc d'eau distillée.

.Tracer la droite d'étalonnage: absorbance en fonction de la concentration.

5. Dosage de la bêta-glucuronidase.

.Pour chaque échantillon, effectuer un blanc "suspension leucocytaire" et un test.

.Pour chaque série de mesures, effectuer un blanc réactif.

.On procède de la manière suivante:

	Blanc réactif	Blanc suspension leucocytaire	Test
Tampon acétate R1 (ml)	0.6	0.6	0.6
Phénolphtaléinate d'acide β glucuronique (ml)	0.2	/	0.2
Eau distillée (ml)	0.2	0.2	/
Suspension leucocytaire (ml)	/	0.2	0.2

.Placer les tubes dans un bain à 56°C pendant 1 h.

.Immédiatement après incubation, ajouter à chaque tube 5 ml de tampon AMP

R3. Mélanger.

.Lire l'absorbance du blanc réactif, des blancs "extraits cellulaires" et des tests, à 550 nm, contre un blanc d'eau distillée.

.L'absorbance corrigée du test est calculée de la façon suivante:

Abs corrigée=abs test-(abs blanc extrait cell.+ blanc réactif).

.A partir de la droite d'étalonnage, déterminer la concentration en phénolphtaléine correspondant à l'abs corrigée. Si la concentration en phénolphtaléine dépasse 8 µg/ml, diluer la suspension leucocytaire au demi.

6.Expression des résultats.

Activité en bêta-glucuronidase (unité Sigma modifiée/ mL) =

Concentration en phénolphtaléine X 30. NB: X 30, car 0.2 ml de prise d'essai correspondent à 6 ml de volume final.

Les résultats obtenus au bout de 24 h, 48 h, 72 h et 96 h de conservation sont rendus en concentration totale et en différence par rapport à la concentration au temps 0 h (delta 0 h).

Annexe 6 : Dosage du lysozyme libéré dans le milieu de conservation.

1.Principe.

Sous l'action du lysozyme, une suspension tuée de *Micrococcus lysodeiktitus* est lysée. De ce fait, la suspension opalescente s'éclaircit et d'autant plus rapidement que la concentration en lysozyme est plus élevée. La mesure de la diminution d'opalescence de la suspension à 405 nm permet de suivre la lyse.

2.Matériel.

.Photomètre Eppendorf 1101 M (Allemagne).

.Enregistreur Eppendorf 6512 (Allemagne).

3.Réactifs.

.Substrat tamponné de *Micrococcus lysodeiktitus* (Eurobio,France). Reprendre le contenu d'un flacon lyophilisé de *Micrococcus lysodeiktitus* par environ 10 mL d'eau distillée et agiter vigoureusement. La pastille se disperse rapidement. Transvaser dans une fiole jaugée de 50 mL. Rincer soigneusement le flacon avec de l'eau distillée et compléter à 50 mL avec les eaux de rinçage. Maintenir la suspension sous agitation constante, par exemple avec un agitateur magnétique, pour que la suspension soit parfaitement homogène. Conservation à 4°C.

.Solution mère de standard de lysozyme à 40 µg/ mL (Eurobio,France).

Reprendre le lyophilisat de standard lysozyme par exactement 4 mL d'eau distillée. Agiter doucement jusqu'à dissolution complète. Celle-ci est pratiquement immédiate. Conservation à 4°C.

4.Mode opératoire.

.Equilibrer la température du substrat à 25°C.

.Diluer la solution de lysozyme au vingtième pour obtenir une solution à $2 \mu\text{g/ mL}$.

.Introduire dans une cuvette:

.Substrat tamponné de *Micrococcus* : 2 mL.

.Suspension cellulaire diluée au dixième : 0.2 mL.

.Mélanger par retournement.

Enregistrer l'absorbance à 405 nm en fonction du temps.

Si la variation d'absorbance est trop élevée, diluer l'échantillon.

Traiter la solution étalon à $2 \mu\text{g/ mL}$ de manière identique.

5. Résultats.

Mesurer la variation d'absorbance par minute.

Le calcul de l'activité en lysozyme est effectué comme suit:

$$\text{Concentration en lysozyme } (\mu\text{g/ml}) = \frac{2 \times \text{delta absorbance/min échantillon} \times 10}{\text{delta absorbance/min étalon}}$$

Les résultats obtenus au bout de 24 h (et de 48 h) de conservation sont rendus en concentration totale et en différence par rapport à la concentration au temps 0 h (0 h).

Annexe 7 : Séparation des PN par cytaphérèse.

Les PN sont obtenus par cytaphérèse par centrifugation en flux continu à l'aide de la centrifugeuse Fenwal CS 3000 (Fenwal, USA).

Le prélèvement peut être entièrement automatisé grâce aux microprocesseurs.

1.Prémédication du donneur.

Au CRTS de Nancy, le protocole suivant est recommandé : 12 comprimés d'acétate de dexaméthasone à 0.5 mg (Dectancyl^R, Roussel, France), pris la veille du don, répartis pendant le repas du soir; 200 mg d'hydrocortisone en IV (Hydrocortisone Roussel, France) au début du don; 200 mg d'hydrocortisone en IV après le traitement de 4.5 L de sang.

2.Cytaphérèse.

Le sang total, avant son entrée dans le bloc de centrifugation, est mélangé à une solution "macromolécule/anticoagulant" dans une proportion de 1/10. La macromolécule utilisée est la gélatine fluide modifiée (Plasmagel^R, Laboratoire Roger Bellon, France). L'anticoagulant utilisé est l'héparine: au total 10000 UI perfusé en continu durant la durée du don, qui prolonge l'effet d'un bolus initial de 3000 UI.

L'ensemble est alors dirigé vers la poche de séparation à un débit de 70 mL/minute. La vitesse de centrifugation du système est de 750 rpm.

La masse sanguine est scindée dans cette première partie en 2 phases: le concentré de globules rouges et le plasma riche en leucocytes; ce dernier rejoint au fur et à mesure, la chambre de collection sous l'action de la pompe à plasma. Là, les leucocytes se concentrent et se collent contre la paroi externe de la poche. Le plasma, appauvri de ces cellules, quitte la chambre de collection pour se mêler aux globules rouges avant d'être restitué au donneur.

Neuf litres (environ) de sang sont ainsi exploités. La durée du don oscille varie de 131 à 180 minutes.

Les PN sont recueillis dans une poche de transfert R 2021 de 600 mL (Fenwal, USA). Le volume de suspension ainsi recueilli est d'environ 300 mL.

Annexe 8 : Sédimentation accélérée des PN sur Dextran.

1.Matériel.

- Seringues plastiques stériles de 20 mL (Plastipak, Becton Dickinson, Irlande).
- Embouts plastiques stériles, provenant d'un nécessaire à dissolution de plasma lyophilisé (Laboratoire Fandre, France).
- Filtres Cathivex GS 0.22 µm (Millipore, France).
- Tubes à centrifuger stériles de 50 mL (Falcon 2059, USA).
- Centrifugeuse Minifuge (Heraeus Christ, RFA)
- Counter STKR (Coulter, USA).
- Flux laminaire Gelaire BSBY (USA).
- Balance Mettler H 10 W (Suisse).

2.Préparation des réactifs.

Toutes les solutions sont filtrées sur filtre Cathivex, si la stérilité est nécessaire.

2.1.Dextran T 500 à 20 g/ L dans du

NaCl 0.9g/ L.

.Dextran T 500 (Pharmacia, Suède) 10 g

.NaCl (Prolabo, France) 4.5 g

Dissoudre dans très peu d'eau distillée en remuant avec un agitateur. On ajuste ensuite à 500 mL avec de l'eau distillée. Cette solution est ensuite stérilisée si nécessaire.

2.2.Solution de chlorure d'ammonium (Merck,RDA) à 8.5 g/ L d'eau distillée.

Cette solution est stérilisée si nécessaire.

2.3.Tampon PBS (phosphate buffer saline) glucosé 1 mmol/ L pH 7.4.

- .Chlorure de sodium anhydre (Prolabo, France) 8 g
- .Chlorure de potassium anhydre (Prolabo, France) 0.2 g
- .Hydrogénophosphate de sodium anhydre (Prolabo, France) 1.15 g
- .Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (Prolabo, France) 0.2 g
- .D+ glucose (Prolabo,France) 0.18 g
- .Eau distillée 1 L

Ce tampon est ensuite stérilisé si nécessaire.

3.Mode opératoire.

Toutes les manipulations se déroulent sous flux laminaire , avec les précautions d'usage, si la séparation doit être réalisée stérilement.

.Homogénéiser le tube de sang hépariné par retournements et vérifier l'absence de caillots. Déposer le volume total de sang mélangé au même volume de dextran dans une seringue de 20 mL.

.Adapter l'embout à la seringue et la retourner sur son piston, inclinée à 45°; puis laisser sédimenter 30 min à température ambiante.

.Reprendre le surnageant dans 2 tubes stériles de 50 ml. Ajouter la solution de chlorure d'ammonium jusqu'à ras bord et attendre 10 min, jusqu'à hémolyse complète.

.Centrifuger 8 min à 250 g à 4°C.

.Le surnageant est éliminé. Le culot est lavé une fois avec le PBS glucosé et remis en suspension dans le milieu de conservation. On effectue ensuite le comptage des cellules avec le counter STKR.

Annexe 9 : dosage de la 3',5'guanosine cyclique (GMPc).

1.Principe.

Après séparation des PN par sédimentation sur dextran, ceux-ci sont ensuite lysés par sonication. Le GMPc est extrait du leucolysat par une colonne de séparation Amprep SAX. Le dosage proprement dit du GMPc est réalisé par un radio-immunodosage de type compétitif, avec séparation de la fraction liée par un 2ème anticorps et par phénomène magnétique.

2.Prélèvement et séparation des PN.

Ils sont identiques à ceux décrits dans l'annexe 1. Les additifs utilisés: bicarbonate, glucose, ATP, vitamine C, acétate d'alpha-tocophérol, NADH et NADPH, ainsi que les antibiotiques sont identiques à ceux décrits dans les annexes relatives aux additifs de conservation. Au terme de la conservation, soit 24 h ou 48 h, la suspension de PN est lavée avec un tampon PBS-G. Les PN sont ensuite remis en suspension dans le tampon PBS-G et la numération des cellules est réalisée à l'aide d'un counter STKR (Coulter, USA).

3.Extraction du GMPc.

Un leucolysat est réalisé grâce au traitement de la suspension cellulaire pendant 30 sec à l'aide d'un appareil à ultrasons Labsonic 1510 (Braun, Allemagne). L'extraction du GMPc à partir du leucolysat utilise une colonne Amprep SAX RPN 1918 (Amersham, UK). Cette colonne est conditionnée par 2 mL de méthanol (Prolabo, France), puis par 2 mL d'eau distillée. Le leucolysat est appliqué dans la colonne et le GMPc est ensuite élué de celle-ci par une solution de méthanol acidifié avec de l'HCl 0.1 mol/ L (Prolabo, France). L'éluat est ensuite évaporé à sec sous un flux d'azote. Le dosage du

GMPc est ensuite effectué à l'aide du coffret-réactif GMPc I¹²⁵ assay system (Amersham, UK), selon les indications préconisées par la firme.

4.Dosage du GMPc.

4.1.Matériel.

.Coffret-réactif GMPc I¹²⁵ assay system (Amersham, UK) avec séparateur magnétique Amerlex-M (Amersham, UK).

.Compteur à scintillation.

4.2.Réactifs.

Le coffret-réactif d'Amersham comprend les réactifs suivants:

.Tampon essai (acétate): diluer le contenu du flacon en portant à 500 ml avec de l'eau distillée. La concentration en acétate est alors de 0.05 mol/ L et le pH de 5.8.

.Standard acétylé: après hydratation du GMPc lyophilisé par le tampon essai, la concentration est de 2.56 pmol/ mL.

.Traceur: il s'agit du composé suivant: guanosine 3',5'-acide phosphorique cyclique 2'-O-succinyl 3-I¹²⁵ iodotyrosine méthyl ester, 41 kBq, 1.1 µCi, lyophilisé. Hydrater avec 11 mL de tampon essai.

.Premier anticorps: il s'agit d'un anticorps d'origine ovine, lyophilisé, qui est réhydraté avec 11 mL de tampon essai.

.Second anticorps: il s'agit d'un anticorps d'âne anti-mouton, prêt à l'emploi.

.Réactif d'acétylation: il est produit en mélangeant 0.5 ml d'anhydride acétique avec 1.0 ml de triéthylamine.

4.3.Mode opératoire.

.Préparer le tampon essai.

.Préparer le traceur.

.Préparer le premier anticorps.

.Préparer la courbe d'étalonnage du standard acétylé, de la façon suivante:

.Ajouter 500 μL de tampon essai dans 7 tubes de 5 mL en polypropylène.

Ajouter 500 μL de standard acétylé dans le premier tube, mélanger et réaliser des dilutions successives au demi, au quart...et rejeter 500 μL de la dernière dilution.

Les concentration en GMPc sont de 128, 64, 32, 16, 8, 4 et 2 fmol/ L.

.Faire la réaction d'acétylation de la façon suivante:

Zéro standard: 25 μL réactif d'acétylation + 500 μL tampon essai.

Standards: 25 μL réactif acétylation + 500 μL standard.

Echantillons: 25 μL réactif acétylation + 500 μL échantillon.

.NB: procéder en double.

.Procéder ensuite de la façon suivante :

	Compte total	Zéro standard	Standards	Echantillon
Tampon essai (μL)	/	100	/	/
Standards (μL)	/	/	100	/
Echantillon (μL)	/	/	/	100
Premier anticorps (μL)	/	100	100	100

Mélanger au vortex,couvrir les tubes et incuber 1 h à 22°C

Traceur (μL)	100	100	100	100
---------------------------	-----	-----	-----	-----

Mélanger au vortex,couvrir les tubes et incuber 15 h à 4°C

Second anticorps (μL)	/	500	500	500
---------------------------------------	---	-----	-----	-----

Mélanger au vortex, incuber 10 min à température ambiante, puis procéder à la séparation magnétique.

.Séparation magnétique.

Introduire les tubes dans le porte-tube et mettre la base du tube en contact avec l'aimant. Laisser 15 min en contact. Rejeter ensuite le surnageant radioactif dans un récipient approprié en laissant bien la base des tubes en contact avec l'aimant.

Renverser le porte-tube sur du papier absorbant en éliminant bien toute trace de liquide.

.Procéder ensuite au comptage de la radioactivité.

.Comptage de la radioactivité.

Il faut compter la radioactivité pendant au moins 1 min dans un compteur à scintillation gamma.

4.4..Expression des résultats.

.Faire le rapport zéro standard/compte total (B_0/TC).

.Faire les rapports standards/zéro standard et échantillons/zéro standard ($\% B/B_0$).

.Tracer un graphique avec le $\% B/B_0$ standards en fonction du logarithme de la concentration en standards ($\log 2, \log 4...$).

.Extrapoler la concentration des échantillons à partir des B/B_0 échantillons et du graphique.

Annexe 10 : Analyse électrophorétique des protéines de membrane de polynucléaires (PN) conservés in vitro.

1.Séparation des membranes de PN.

1.1.Séparation des polynucléaires.

Le sang est obtenu par ponction veineuse chez des donneurs sélectionnés selon les normes du don de sang en France.

A 20 mL de sang prélevé dans un tube de polypropylène stérile (Becton Dickinson, USA) hépariné à 10 UI/ mL (Héparine Eurobio, France), on ajoute 4.0 mL de Plasmagel^R (Laboratoires R.Bellon, France). Le mélange est introduit dans une seringue de 50 mL en polypropylène (Becton dickinson, USA), posée à 45°. Laisser sédimenter les globules rouges 30 minutes à température ambiante. Prélèver la couche surnageante en poussant doucement sur le piston après avoir adapté un petit tuyau en plastic stérile (Becton Dickinson, USA) sur la seringue. Ce prélèvement est fait plusieurs fois au cours des 30 minutes, au fur et à mesure de la sédimentation, en évitant d'entraîner des globules rouges. Le surnageant prélevé est recueilli dans des tubes à centrifuger coniques stériles (Falcon 2070, Becton Dickinson, USA). Après une centrifugation de 10 minutes à 250 g à 4°C dans une centrifugeuse Minifuge (Heraeus Christ, Allemagne), éliminer les surnageants et remettre les culots de globules blancs en suspension dans du chlorure d'ammonium 0.16 mol/ L (Merck, Allemagne), à raison de 100 mL de solution de NH₄Cl pour un culot de globules blancs obtenu à partir de 20 mL de sang total. Ce volume de NH₄Cl peut être augmenté en fonction de la contamination en globules rouges. La suspension obtenue doit être un peu trouble. Laisser en contact pendant 10 minutes à 4°C, pour hémolyser les globules rouges. Centrifuge ensuite 10

minutes à 250 g et à 4°C. Remettre tous les culots repris avec une solution de NaCl (Prolabo, France) 0.9 % en un seul tube et laver ces culots de globules blancs avec une solution de NaCl 0.9 %. Reprendre ce culot final avec 2 mL d'une solution de NaCl 0.9% et l'ajouter au mélange suivant: Percoll^R (Pharmacia, Suède) 5.4 mL et tampon Percoll 6.6 mL. La composition du tampon Percoll est la suivante: Tris (Merck, Allemagne) 33 mmol/ L et NaCl 0.5 mol/ L dans de l'eau distillée. Après mélange par retournement, centrifuger ensuite 18 minutes à 30000 g et à 4°C (sans frein) dans une centrifugeuse J-21 (Beckmann, USA), puis recueillir l'anneau de PN avec une pipette Pasteur siliconée (Corning, USA) après avoir éliminé l'anneau de lymphocytes.

Laver ensuite les PN avec une solution de NaCl 0.9 % dans un tube à centrifuger conique de 50 mL, 10 minutes à 500 g et à 4°C. Remettre le culot cellulaire en suspension dans 2 mL de NaCl 0.9 % et effectuer une numération des PMN à l'aide d'un counter STKR (Coulter, USA). Ajouter ensuite 50 µl de diisopropylfluorophosphate 0.1 mol/ L (Serva, USA) par 3.10^7 PMN, en laissant en contact 5 minutes à 4°C.

Dans un tube à centrifuger conique de 50 mL, laver les PN avec du NaCl 0.9% à 4°C, puis centrifuger 10 minutes à 250 g à 4°C.

1.1.2.Préparation des membranes de PN.

Le culot cellulaire est repris par 1 mL du tampon suivant: Tris (Merck, Allemagne) 25 mmol/ L, KCl (Prolabo, France) 125 mmol/ L, MgCl₂ (Prolabo, France) 5 mmol/ L et adénosine triphosphate (ATP) (Sigma, USA) 1mmol/ L ; le pH de ce tampon est de 9.6. Lyse ensuite les PN dans une bombe à azote (Kontes, USA), en laissant les PN 20 minutes à 40 Bar. Puis, en relâchant la pression jusque 0 Bar, récupérer ainsi le lysat goutte à goutte, dans un tube contenant du phénylméthane-sulfonylfluoride (PMSF) 20 µmol/ L en final. Par centrifugations différentielles, séparer les différents éléments cellulaires: par centrifugation 10 minutes à 500 g, les cellules entières et les

noyaux sédimentent; puis par centrifugation du surnageant 10 minutes à 20000 g dans une centrifugeuse Airfuge (Beckmann, USA), éliminer les granules; enfin par centrifugation du surnageant 25 minutes à 80000 g, on fait sédimenter les membranes. Conserver alors le culot et le surnageant de cette dernière centrifugation, le surnageant contenant des protéines du cytosol et des membranes dissoutes pendant leur préparation à -80°C.

2.Séparation électrophorétique des protéines de membrane du polynucléaire neutrophile.

2.1.Préparation des gels de polyacrylamide à 8 %.

Les gels sont préparés de la façon suivante:

- Solution stock d'acrylamide (Biorad, USA) 30 %: 3 mL; N,N'méthylène bisacrylamide (Fluka, Allemagne) 0.8%: 27 mL. Ce mélange doit être filtré sur papier filtre plissé 00 (Pratt et Dumas, France).
- Tris (Merck,Allemagne) 0.375 mol/ L (pH 8.8): 30 mL.
- Sodium dodécylsulfate (SDS) (Prolabo,France) 10 % P/V/ 1 mL.
- N,N,N',N'tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED) (Eastmann Kodak, USA) 1%: 2.5 mL. NB: ce réactif doit être préparé extemporanément et ajouté au dernier moment.
- Persulfate d'ammonium (Eastmann Kodak, USA) 1.5%: 10 mL; NB: ce réactif doit être préparé extemporanément et ajouté au dernier moment.
- Eau distillée: qsp 100 mL.

Filtrer la solution sur filtre Cathivex 0.22 µm (Millipore, USA) avant d'ajouter le TEMED et le persulfate d'ammonium.

2.2.Préparation du tampon d'électrophorèse.

Il se compose des réactifs suivants: Tris 0.025 mol/ L, glycine 0.192 mol/ L, SDS 1%, dissous dans de l'eau distillée. Le pH est de 8.1. Filtrer cette solution sur un filtre Cathivex GS 0.22 μm (Millipore, USA).

2.3.Solubilisation des échantillons de membrane.

Les échantillons sont solubilisés dans la solution suivante: PMSF 1mmol/ L, TRIS 62.5 mmol/ L, Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma, USA) 5%, SDS 2 %, B-mercaptoéthanol (Eastmann Kodak, USA) 5%, glycérol 10 % (Prolabo, France), bleu de bromophénol (Nullmann, West Germany) 1mg. Puis, ils sont chauffés au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes.

2.4.Solubilisation des témoins de bas poids moléculaire.

Nous utilisons des témoins de bas poids moléculaire (LMW) de Pharmacia (Suède) auxquels nous ajoutons 100 μL de tampon d'électrophorèse, 12.5 ml de SDS à 20 % et 100 μL de B-mercaptoéthanol. Chauffer au bain marie à 100°C pendant 10 minutes.

2.5.Préparation des plaques d'électrophorèse.

Les plaques d'électrophorèse sont préparées à partir de deux plaques de verre de 8 cm sur 14 cm, séparées par deux espaceurs de 1.5 mm d'épaisseur et fermement unies par du papier collant (Sell-O-Tape,Pharmacia,Sweden). On utilise un peigne de plastic pour creuser les puits destinés à recevoir les échantillons (Combs 6 wells 1.5 mm, Pharmacia, Suède).

Laisser polymériser plusieurs heures, en présence de rayons UV à température ambiante.

2.6.Électrophorèse.

Le système électrophorétique est constitué d'une cuve à électrophorèse gel electrophoresis apparatus GE 2/4 LS (Pharmacia, Suède) et d'un générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède). Remplir la cuve à électrophorèse avec le tampon d'électrophorèse, puis introduire les plaques contenant le gel d'électrophorèse. Effectuer ensuite une pré-électrophorèse à 20 mA par plaque pendant 40 à 60 min. Puis, déposer les échantillons (la quantité déposée dépend du nombre de PN utilisés au départ ou peut être estimée par un dosage de protéines) et le marqueur de poids moléculaire (LMW). Effectue ensuite l'électrophorèse à 20 mA par plaque pendant 15 à 20 minutes; puis à 40 mA par plaque pendant deux heures environ. Le front de migration est matérialisé par le bleu de bromophénol qui doit être arrivé au bord du gel en fin de migration. Retirer les plaques de la cuve et on sort les gels des plaques de verre. Effectuer ensuite la coloration argentique d'Oakley.

2.7.Coloration argentique d'Oakley.

2.7.1.Préparation de la solution de glutaraldéhyde 10 %.

Solution de glutaraldéhyde 25 % (Merck, Allemagne) 800 mL, eau distillée 1200 mL. NB: Cette solution peut être utilisée 5 à 10 fois si l'on prend la précaution de n'introduire que des gels bien égouttés.

2.7.2.Préparation de la solution 1.

AgNO₃ (Prolabo, France) 8 g, NaOH 190 mg/ L (Prolabo, France) 16 mL , ammoniacque 30 mL, eau distillée 4 L. Agiter très fortement les 4 L d'eau avec le nitrate d'argent. Puis doucement ajouter la soude. La solution devient brune. Elle se décolore complètement avec l'ammoniacque qu'il faut ajouter par petites étapes. Ce volume de solution est suffisant pour 10 gels.

2.7.3.Préparation de la solution 2.

Acide citrique (Prolabo, France) 200 mg, paraformaldéhyde (Merck, Allemagne) 2 mL, eau distillée 4 L. Ce volume de solution est suffisant pour 10 gels.

2.7.4.Mode opératoire.

Toutes les manipulations des gels se font avec des gants préalablement lavés au détergent et rincés à l'eau bidistillée.

Les différents bains se font avec de l'eau bidistillée sous agitation modérée

2.7.4.1.Fixation après l'électrophorèse.

Composition du bain de fixation: éthanol (Prolabo, France) 500 mL, acide acétique glacial (Prolabo, France) 100 mL, eau distillée 400 mL. Fixer les gels pendant deux heures dans cette solution dont le volume est suffisant pour 5 gels (1 L pour un bac contenant 5 gels).

2.7.4.2.Lavage à l'eau distillée.

Laver 2 fois 15 minutes dans 1 L d'eau (pour 5 gels), en changeant l'eau après le premier lavage.

2.7.4.3.Fixation.

Composition du fixateur: méthanol (Prolabo, France) 100 mL, acide acétique glacial 50 mL, eau distillée 850 mL. Fixer une nuit dans cette solution (prévue pour 5 gels).

2.7.4.4.Lavage à l'eau distillée.

Laver 5 gels dans 1 L d'eau pendant 20 minutes.

2.7.4.5.Bain de glutaraldéhyde 10 %.

Laisser baigner 10 gels par litre de cette solution pendant 1 h minimum.

2.7.4.6.Lavage à l'eau distillée.

Laver 5 gels par litre d'eau, 6 fois pendant 20 minutes, en changeant l'eau chaque fois.

2.7.4.7.Bain solution 1.

Laisser baigner 5 gels par litre de solution, deux fois 30 minutes, en changeant la solution après le premier bain.

2.7.4.8.Lavage à l'eau distillée.

Laver 1 gel par litre d'eau, trois fois pendant deux minutes, en changeant l'eau à chaque fois.

2.7.4.9.Bain solution 2.

Travailler avec 1 gel par bac. Préparer 3 bacs contenant chacun environ 300 à 400 ml de la solution. Dans le premier bac, le gel est agité quelques secondes; dans le deuxième, on laisse apparaître les premières taches, toujours sous agitation; dans le troisième, on laisse la coloration se terminer. On renouvelle les solutions tous les 4 gels.

2.7.4.10.Bain d'arrêt.

Pour 10 gels, on prépare 2 L de solution de la composition suivante: acide acétique glacial 100 mL, méthanol 100 mL, eau distillée 1800 mL.

Annexe 11: Analyse des protéines du PN par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

1.Prélèvement des PN.

Les PN sont prélevés par ponction veineuse chez des donneurs sains, comme précédemment décrit.

2.Séparation des PN.

Les PN sont séparés par sédimentation sur dextran, selon la technique précédemment décrite.

3.Extraction des protéines de PN totaux.

La suspension de PN obtenue est lavée 2 fois avec le tampon PBS. Le volume de suspension est ensuite ajusté de façon à obtenir un culot cellulaire de 10^7 PN.

Ce culot subit une double extraction, pendant 15 minutes à 4°C, avec 200 µl d'une solution aqueuse contenant de l'acétonitrile (Merck, Allemagne) à 10 %, de l'acide trifluoroacétique (TFA) (Merck, Allemagne) à 0.1 % et du PMSF (phénylméthane sulfone fluoride, Merck, Allemagne) 1 mmol/ L.

Les 2 extraits sont centrifugés 15 minutes à 100000 g, à 4 °C, de façon à éliminer les matières insolubles. Les surnageants (environ 400 µL) sont ensuite réunis et congelés à -80°C, si l'analyse par RP-HPLC doit être différée.

4.Séparation des protéines par RP-HPLC.

Nous utilisons un système HPLC Varian LC 500 (Varian, USA), équipé d'un détecteur UV 200 (Varian, USA).

5. Références bibliographiques.

1. Gulati G.L., Ashton J.K., Hyun B.H. - Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. - Hematology/Oncology Clinics of North America 1988, Vol 2, 495-511.
2. Wintrobe .E. - Clinical Hematology. - Lea & Feabiger 1981, Philadelphia, 2021 p.
3. Dreyfus B. - Hématologie. - Flammarion 1987, Paris, 891 p.
4. Grossmann Z. - The stem cell concept revisited. Self-renewal capacity is a dynamic property of hematopoietic cells. - Leukemia research 1986, 10, 937-950.
5. Gillis T. - T-cell derived lymphokines. - In Fundamental Immunology, Gallin I.J. (ed), Raven Press, New York 1989, pp 621-638.
6. Durum S.K., Oppenheim J.J. - Macrophage-derived mediators : interleukin 1, tumor necrosing factor, interleukin 6, interferon and related cytokines. In Fundamental Immunology, Gallin I.J.(ed), Raven Press, New York 1989, pp 639-661.
7. Golde D.W. - Production, distribution and fate of the neutrophil. In Hematology, Williams W.(ed), Mac Graw-Hill, New York 1990, pp 795-801.
8. Marmont A.M., Damasio E., Zucker-Franklin D. - The neutrophil. In Atlas of blood cells. Function and pathology, Ermes 1988, Milano, pp 158-253.

9.Benestad B., Laerum O.D. - The neutrophil granulocyte. - Laboratory Investigation 1988, 58, 7-36.

10.Bernard J. - Abrégé d'hématologie. - Masson 1990, Paris, 306 p.

11.Curnutte J.T., Babior B.M. - Metabolism of the neutrophil. In Hematology, Williams W. (ed), Mac Graw-Hill 1990, New York, pp 775-794.

12.Babior B.M., Gallin I.J. - Functions of the neutrophil. In Hematology, Williams W. (ed), Mac Graw Hill 1990, New York, pp 795-812.

13.Forehand J.R., Nauseef W.M., Johnston R.P. - Inherited disorders of phagocyte killing. In The metabolic basis of inherited diseases. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.(ed) Mac Graw Hill 1989, New York, pp 2779-2801.

14.Sandborg R.R., Smolen E. - Biology of disease.Early biochemical events in leukocyte activation. - Laboratory investigation 1988, 59, 300-311.

15.Gallin I.J. - Inflammation. In Fundamental Immunology, Raven Press New York 1989, pp 721-723.

16.Sha'afi A., Molski T.F.B. - Activation of the neutrophil. - Progress.Allergy 1988, 42, 1-64.

17.Wolach B., Baehner L., Boxer A. - Review : clinical and laboratory approach to the management of neutrophil dysfunction. - Isr.J.Med.Sci.1982, 18, 897-916.

18. Southwick F.S., Guisson A.D., Paschetto M., Zigmond M. - Polymorphonuclear leukocytes induce actin polymerisation by a transduction way which differs from that used by chemoattractants. - *J.Cell.Biology* 1989, 109, 1561-1569.
19. Morin A. - Thèse de doctorat de l'Université de Nancy I. 1991.
20. Korbut R., Trabka-Janik E., Gryglewski R. - Cytoprotection of human polymorphonuclear leukocytes by stimulators of adenylate and guanylate cyclases. - *Eur.J.Pharmacol.* 1989, 165, 171-172.
21. Goodman M.G., Weigle W.O. - Activation of lymphocytes by brominated nucleosides and cyclic nucleotide analogues : implication for the "second messenger" function of cyclic GMP. - *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1981, 78, 7604-7608.
22. Kaever V., Resch K. - Are cyclic nucleotides involved in the initiation of mitogenic activation of human lymphocytes? - *Biochim.Biophys.Acta.* 1985, 846, 216-225.
23. Lappin D., Riches D.W.H., Damerau B., Whaley K. - Cyclic nucleotides and their relationship to complement-component C2 synthesis by human monocytes. - *Biochem.J.* 1984, 222, 477-486.
24. Anderson R.A., Glover A., Koornhof H.J., Rabson A.R. - In vitro stimulation of neutrophil motility by levamisole : maintenance of cGMP levels in chemotactilly stimulated levamisole-treated neutrophils. - *J.Immunol.* 1976, 117, 428-432.

- 25.Hill H.R., Estensen R.D., Quie P.G., Hogan N.A., Goldberg N.D. - Modulation of human neutrophil chemotactic responses by cyclic 3', 5'guanosine monophosphate and cyclic 3', 5' adenosine monophosphate. - Metabolism 1975, 24, 447-456.
- 26.Ignarro L.J., Cech S.H. - Bidirectionnal regulation of lysosomal enzymes secretion and phagocytosis in human neutrophils by guanosine 3', 5' monophosphate and adenosine 3', 5' monophosphate. - Proc.Soc.Exp.Biol.Med.1976, 51, 448-452.
- 27.Bendzen K., Klysner R. - Increased polymorphonuclear leukocyte cGMP levels induced by the human lymphokine, leukocyte migration inhibitory factor (LIF). - Immunopharmacology 1979, 1, 323-330.
- 28.Bendzen K. - Human leukocyte migration inhibitory factor (LIF).Specific regulation of the lymphokine serine protease activity by 3', 5' cGMP and, possibly, 2', 3'cGMP. - Scand.J.Immunol.1978, 8, 53-61.
- 29.Sandler J.A., Smith T.K., Manganiello V.C., Kirkpatrick C.H. - Stimulation of monocytes cGMP by leukocyte dialysates. - J.Clin.Invest.1975, 56, 1271-1279.
- 30.Perrachi M., Maiolo A.T., Lombardi L., Catena F.B., Polli E.E. - Patterns of cyclic nucleotides in normal and leukaemic human leukocytes. - Br.J.Cancer 1980, 41, 360-371.
- 31.Estensen R.D., Hill H.R., Quie P.G., Hogan N., Goldberg N.D. - Cyclic GMP and cell movement. - Nature 1973, 245, 458-460.

- 32.Syderman R., Smith C.D., Verghese M.W. - Model for leukocyte regulation by chemoattractant receptors : role of a guanosine nucleotide regulatory protein. - J.Leuk.Biology.1986, 40, 785-800.
- 33.Keller H.V., Gerish G., Wissler J.H. - A transient rise in cyclic AMP levels following chemotactic stimulation of neutrophil granulocytes. - Cell.Biol.Int.Rep.1979, 3, 759-765.
- 34.Marx R.S., Mc Call C.E., Bass D.A. - Chemotaxin-induced changes in cyclic adenosine monophosphate levels in human neutrophils. - Infection and Immunity 1980, 29, 284-86.
- 35.Mokashi S., Delikatny S.J., Orr F.W. - Relationships between chemotaxis, chemotactic modulators and cyclic nucleotide levels in tumor cells. - Cancer Res.1983, 43, 1980-1983.
- 36.Naef A., Damerau B., Keller H.V. - Cytotaxin-induced cAMP peak in granulocytes : its relationship to crawling movements, chemokinesis and chemotaxis. - Biochem.Pharmacol.1982, 31, 1573-1577.
- 37.Smolen J.E. - The fluorescence response of chlortetracyclin-loaded human neutrophils is modulated by prostaglandin E1, but not by cyclic nucleotides. FEBS 1983, 163, 119-123.
- 38.Hogan N.A., Hill H.R. - Enhancement of neutrophil chemotaxis and alteration of levels of cellular cyclic nucleotides by levamisole. - J.Infect.Dis.1978, 138, 437-444.

- 39.Roch-Arveiller M., Tissot M., Moach L., Giroud J.P. - Effect of immunomodulating agents on leukocyte chemotaxis and cyclic nucleotides. - Agents action 1982, 12, 353-359.
- 40.Zurier R.B., Weissmann G., Hoffstein S., Kammerman S., Tai H.H. - Mechanism of lysosomal release from human leukocytes. - J.Clin.Invest.1974, 53, 297-309.
- 41.Weissmann G., Goldstein I., Hoffstein S., Tsung P.K. - Reciprocal effects of cAMP and cGMP on microtubule dependent release of lysosomal enzymes. - Ann.N.Y.Acad.Sci.1975, 253, 750-762.
- 42.Smith R.J., Ignarro L.J. - Bioregulation of lysosomal secretion from human neutrophils.Roles of guanosine 3',5' monophosphate and calcium in stimulus-secretion coupling. - Proc.Nat.Acad.Sci.USA.1975, 72, 108-112.
- 43.Sandoval I.V., Cuatrecasas P. - Opposing effects of cyclic AMP and cyclic GMP on protein phosphorylation in tubulin preparation. - Nature 1976, 262, 511-514.
- 44.Malawista S.E., Oliver A.M., Rudolph S.A. - Microtubules and cyclic AMP in human leukocytes : on the order of things. - J.Cell.Biology 1978, 77, 881-886.
- 45.Smolen J.E., Korchak H.M., Weissmann G. - Increased levels of cyclic adenosine 3',5' monophosphate in human polymorphonuclear leukocytes after surface stimulation. - J.Clin.Invest.1980, 65, 1077-1085.

46. Ignarro L.J., Lint T.F., George W.J. - Hormonal control of lysosomal enzyme release from human neutrophils. - J.Exp.Med.1974, 139, 1395-1414.
47. Smolen J.E., Weissmann G. - Stimuli which provoke secretion of azurophil enzymes from human neutrophils induce increments in adenosine cyclic 3',5' monophosphate. - BBA 1981, 672, 197-206.
48. Marone G., Thomas L.L., Lichtenstein L.M. - The role of agonists that activate adenylate cyclase in the control of cAMP metabolism and enzyme release by human polymorphonuclear leukocytes. - J.Immunol.1980, 5, 2277-2283.
49. Oliver J.M. - Impaired microtubule function correctable by cyclic GMP and cholinergic in the Chediak-Higashi syndrome. - Am.J.Pathol.1976, 85, 395-418.
50. Zurier R.B. - Cyclic nucleotides and the Chediak-Higashi syndrome. - Adv.Cyclic.Nucleotides Res.1980, 12, 173-179.
51. Giraudet P., Favre A., Frot J.C. - La réaction inflammatoire. - Vigot 1984, Paris, 260 p.
52. Howard T.H. - Neutrophil chemotaxis and human disease. - Ala.J.Med.Sci.1988, 25, 400-407.
53. Borregaard N. - The human neutrophil. Function and dysfunction. - Eur.J.Haematol.1988, 41, 401-413.

54.Roitt I., Brostoff, Male. - Immunologie fondamentale et appliquée. - Flammarion 1987, Paris, 289 p.

55.Rotrosen D., Gallin J.I. - Disorders of phagocyte function. - Ann.Rev.Immunol.1987, 5, 127-150.

56.Silverstein S., Greenberg S., Di Virgilio F., Steinberg T.H. - Phagocytosis. In Fundamental Immunology, Paul (ed) 1989, Raven Press, New York, pp 703-720.

57.Deby C. - La biochimie de l'oxygène. - La Recherche 1991, 22, 56-64.

58.Lord R. - Assessment of neutrophil function : an introduction. - Medical Laboratory Sciences 1989, 46, 347-356.

59.Haslett C., Savill J.S., Haegher L. - The neutrophil. - Current opinion in Immunology 1989, 2, 10-18.

60.Fletcher J., Haynes A.P., Crouch S.M. - Acquired abnormality of polymorphonuclear neutrophil function. - Blood Reviews 1990, 4, 103-110.

61.Boxer L.A., Smolen J.E. - Neutrophil granule constituents and their release in health and disease. - Hematology/Oncology clinics of North America 1988, 2, 120-124.

62.Travis J. - Structure, function and control of neutrophil proteinases. - Am.J.Med.1988, 84, 37-41.

- 63.Hurst J.K., Barette W.C. - Leulocytic oxygen activation and microbicidal oxydative toxins. - *Crit.Rev.Biochim.Mol.Biol.*1989, 24, 271-328.
- 64.Babior B.M. - Protein phosphorylation and the respiratory burst. - *Arch.Bioch.iophys.*1988, 264, 361-367.
- 65.Clarck R.A. - The human respiratory burst oxydase. - *J.Infect.Dis.*1990, 151, 1140-1147.
- 66.Fantone J.C., Ward P.A. - Oxygen derived radicals and their metabolites relationship to tissue injury. - Ed : Current contents, a scope publication Upjohn, Kalamazoo, 1985, 51 p.
- 67.Béaud M., Schooneman F., Girot M., Vigneron C. - Qualités fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles séparés par cytophèrese sur Haemonetics 30. *Path.Biol.*1981, 29, 89-93.
- 68.Dinubile M. - Therapeutic role of granulocyte transfusion. - *Rev.Infect.Dis.*1985, 7, 232-243.
- 69.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C. - Conservation des polynucléaires neutrophiles. - *Ann.Biol.Clin.*1991, 49, 161-165.
- 70.Winston D.J., Ho W.G., Gale R.P. - Granulocyte transfusion. - *African Journal of Clinical Experimental Immunology* 1982, 3, 129-137.
- 71.Lazarus H.M. - Granulocyte transfusions : have we learned anything? - *J.Lab.Clin.Med.*1990, 115, 271-274.

72.Pizzo P.A. - After empiric therapy : what to do until the granulocytes comes back. - Rev.Infect.Dis.1987, 9, 214-219.

73.Dutcher J.P. - The potential benefit of granulocyte transfusion therapy. Cancer Invest.1989, 7, 457-462.

74.Helbig H., Kubel M. - Blutzellsubstitution im Rahmen der Hämatologischen Intensivtherapie zur supportiven Hämotherapie mit Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozytenkonzentraten. - Z.Gesamte Inn.Med.Jahrg.1988, 43, 561-565.

75.Hows J.M., Brozovic B. - ABC of transfusion : platelet and granulocyte transfusions. - Brit.Med.J.1990, 300, 520-524.

76.Quie P.G. - The white cells : use of granulocyte transfusions. - Rev.Infect.Dis.1987, 9, 189-195.

77.Pfieger H., Arnold R., Bhadjri S., Dietrich M., Hempei H., Kubanek B., Rasche H., Wiesneth M. - Granulocyte transfusions in acute leukaemia regeneration of granulopoiesis as determining factor of survival. - Scand.J.Haematol.1981, 26, 215-220.

78.Schooneman F., Raffoux C., Guerci O., Streiff F., Janot C. - Résultats de 27 transfusions de polynucléaires effectuées chez des malades atteints d'hémopathies malignes. - Ann.Med.(Nancy) 1977, 16, 1217-1224.

79.Bernard J., Levy J.P., Varet B. - Transfusions de leucocytes. - Hématologie.Flammarion 1976, Paris 1328-1339.

- 80.Hocker P., Mann M., Pitterman E. - The collection and transfusion of granulocytes. - Plasma Ther.Transf.Technol.1982, 3, 183-184.
- 81.Varet B. - Perspectives d'utilisation des cytokines en thérapeutique humaine. - La lettre de l'infectiologue 1991, 6, 179-180.
- 82.Harousseau J.L. - GM-CSF : actualités, perspectives. - La lettre de l'infectiologue 1991, 6, 182-187.
- 83.Delannoy A., Gehenot M. - Colony-stimulating factor and drug-induced agranulocytosis. - Ann.Intern.Med.1989, 110, 942-943.
- 84.Muroi K., Ito M., Sasaki R., Suda T., Sakamoto S., Miura Y. - Treatment of drug-induced agranulocytosis with granulocyte-colony stimulating factor. - Lancet 1989, 2, 55.
- 85.Morstyn G., Souza L.M., Keech ., Sheridan W., Campbell L., Alton .K., Green M., Metcalf D., Fox R. - Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. - Lancet 1988, 1, 67-672.
- 86.Glaspy ., Baldwin G.C., Robertson P.A., Souza L., Vincent M., Ambersly J., Golde D.W. - Therapy for neutropenia in hairy cell leukemia with recombinant granulocyte colony-stimulating factor. - Ann.Intern.Med.1988, 109, 789-795.
- 87.Butturini A., Gale P., Lopes D.M., Cunha C.B., HO W.G., Sanpai .M., De souza P.C., Cordiero M., Neto C., De souza C.E.F., Tabak D.G., Burla A. - Use of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor in the Brazil radiation accident. - Lancet 1988, 2, 471-475.

88.Komigana A., Ishiguro A., Kubo T., Matsuoka T., Yasukohchi S., Yasui K., Yanasisawa M., Yamada S., Yamazaki M., Akabane T. - Increases in neutrophil counts by purified human urinary colony-stimulating factor in chronic neutropenia of childhood. - Blood 1988, 71, 41-45.

89.Barilla M.A., Gillio A.P., Ruggeiro M., Kernan N.A., Brochstein J.A., Abboud M., Fumagalli L., Vincent M., Gabrilove J.L., Welte ., Souza L.M., O'Reilly J. - Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. - N.Engl.J.Med.1989, 320, 1574-1580.

90.Hammond W.P., Price T.H., Souza L.M., Dale D.C. - Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. - N.Engl.J.Med.1989, 320, 1306-1311.

91.Kapp A., Zeek-Kapp G., Danner M., Luger T.A. - Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor : an effective direct activator of human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes. - J.Invest.Dermatol.1988, 91, 49-55.

92.Oster W., Lindemann A., Mertelsmann R., Hermann F. - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and multilineage CSF recruit human monocytes to express granulocyte CSF. - Blood 1989, 73, 64-67.

93.Schriffer C.A., Aisner J., Wiervik P.M. - Clinical guidelines for rational use of granulocyte transfusions therapy. - Haemonetics research Institute, Boston, Massachusetts, 1977.

94.Bussel A. - Conditions d'efficacité thérapeutique des transfusions de leucocytes. - *Nouv.Rev.Fr.Hematol.*1976, 16, 147-148.

95.Muellerhagen V.P. - Patient management on the Cobe 2997 (IBM). - *Plasma.Ther.Transf.Technol.*1986, 7, 319-328.

96.Rodet N., Duedaric N. - Transfusion de leucocytes et de plaquettes. - In "Transfusion sanguine et greffe de moëlle osseuse".*Progrès en hématologie.*Genetet B., Mannoni P., Doin (ed) Paris 1982, pp 53-70.

97.Taylor C.G., Page-Faulk W., Mac Intyre J.A. - Prevention of recurrent spontaneous abortions by leukocyte transfusion. - *J.Roy.Soc.Med.*1985, 78, 623-628.

98.Pflieger H., Wiesneth M., Arnold R., Niethammer D., Kleihauer E. - Granulocyte transfusions in children. - *EurPediat.*1981, 135, 261.

99.Newman R.S., Ocariz .A. - Are granulocyte transfusions of value in septic neonates without neutrophil storage pool depletion. - *Pediatrics* 1985, 76, 1020.

100.Baley J.E., Stork E.K., Warkentin P.I., Shurin S.B. - Granulocyte transfusion. - *Pediatrics* 1988, 81, 915-920.

101.Newman R.S., Waffarn F., Simmons G.E., Goldsticker R.D., Ocariz J.A., Ferguson S. - Questionable value of saline prepared granulocytes in the treatment of neonatal septicemia. - *Transfusion* 1988, 28, 196-197.

- 102.Baley .E., Stork E.K., Warkentin P.I., Shurin S.B. - Buffy coat transfusions in neutropenic neonates with presumed sepsis : a prospective, randomized trial. - Pediatrics 1987, 80, 712-720.
- 103.Cairo M.S. - Granulocyte transfusion in neonates with presumed sepsis. Pediatrics 1987, 80, 738-740.
- 104.Huestis D.W. - Adverse effects in donors and patients subjected to hemapheresis. - J.Clin.Apheresis.1984, 2, 81-90.
- 105.Herzig R.H. - The negative aspects of granulocyte transfusions. - Cancer Invest.1989, 7, 89-592.
- 106.Journal Officiel. - Arrêté du 3 novembre 1986 relatif aux prélèvements de sang. - J.O. 7 décembre 1986, 14722.
- 107.Braine H.G.,Elfenbein .J., Mellitis E.D. - Peripheral blood lymphocyte numbers, lymphocyte proliferative responses in vitro and seum immunoglobulins in regular hemapheresis donors. - J.Clin.Apheresis 1985, 2, 213-218.
- 108.Koepke J.A., Parks W.M., Goeken J.A., Klee G.G., Strauss R.G. - The safety of weekly plateletpheresis : effects on the donor's lymphocyte populations. - Transfusion 1981, 21, 59-63.
- 109.Wright .G., Karsh J., Fauci A.S., Klippel J.H., Decker J.L., O'Donnel ., Deisseroth A.B. - Lymphocyte depletion and immunosuppression with repeated leukapheresis by continuous flow centrifugation. - Blood 1981, 58, 451-458.

110.Strauss R.G., Spitzer R.E.,Stitzel A.E., Urmson J.R., Maguire L.C., Koepke J.A., Thompson J.S. - Complement changes during leukapheresis. - Transfusion 1980, 20, 32-38.

111.Bongiovanni M.B., Kotz R.S., Wurzel H.A. - Long term plateletpheresis of a donor. - Transfusion 1980, 20, 465-466.

112.Toffaletti J. - Changes in protein-bound, complex-bound and ionized calcium related to parathyroid hormone levels in healthy donors during plateletpheresis. - Transfusion 1983, 23, 471-475.

113.Schiffer C.A., Aisner J., Daly P.A., Schimpff S.C., Wiernik P.H. - Alloimmunization following prophylactic granulocyte transfusion. - Blood 1979, 54, 766-774.

114.Depalma L., Leitman S.F., Carter C.S., Gallin J.I. - Granulocyte transfusion therapy in a child with chronic granulomatous disease and multiple red cell alloantibodies. - Transfusion 1989, 29, 421-427.

115.Stegagno M., Pascone R., Colarizi P., Laurenti F., Isacchi G., Bucci G., Deluca E.C. - Immunologic follow-up of infants treated with granulocyte transfusion for neonatal sepsis. - Pediatrics 1985, 76, 508.

116.O'Connor J.C., Strauss R.G., Goeken N.E., Knox L.B. - A near-fatal reaction during granulocyte transfusion of neonate. - Transfusion 1988, 28, 173-176.

117.Butt W., Shann A., Duncan A. - Deterioration in lung function after neutrophil transfusion. - J.Pediat.1986, 109, 393-397.

- 118.Dutcher J.P., Kendall J., Norris D., Schiffer C., Aisner J., Wiernik P.H.
Granulocyte transfusion therapy and amphotericin B : adverse reaction? -
Am.J.Hematol.1989, 31, 102-107.
- 119.Dana B.W., Durie B.G.M., White R.F., Huestis D.W. - Concomitant
administration of granulocyte transfusion and amphotericin B in neutropenic
patients : absence of significant pulmonary toxicity. - Blood 1981, 57, 90-94.
- 120.Siegel .E., Lunde M.N., Gelderman A.H., Halterman R.H., Brown J.A.,
Levine .S., Graw R.G. - Transmission of toxoplasmosis by leukocyte
transfusion. - Blood 1971, 37, 388-394.
- 121.Blumberg N., Genco P., Katz A., Bove J. - Collection of granulocytes for
transfusion.The effect of collection methods on cell enzyme release. - Vox
Sang.1978, 35,207-214.
- 122.Rosenkvist J., Behnke O., Johansen K.S., Karle ., Nielsen O.S., Sorensen
H., Valerius N.H. - Harvesting of granulocytes for transfusion therapy by
Haemonetics 30.Yield, morphology and in vitro functions of collected
granulocytes. - Scand.J.Haematol.1978, 20, 453-460.
- 123.Glasser L. - Functionnal considerations of granulocyte concentrates used
for clinical transfusions. - Transfusion 1979, 19, 1-6.
- 124.Newman R.S., Ocariz J.A., Simpkins H., Kaplan H.S. - Use of white cell
counts to select units of whole blood for granulocyte preparation. - Transfusion
1985, 25, 570.

125. Waldman A.A., Shander C. - Human blood components. 1. Preparation and characteristics of leukocyte concentrates from single units of human blood. *Transfusion* 1980, 20, 384-392.

126. Gorin N.C., Hirsch-Marie G., Stachowiak J., Cavalier J., Julien A.M., Gerbal A., Najman A., Duhamel G. - Méthodes d'amélioration du rendement de la séparatrice de cellules pour les transfusions de culots leucocytaires. *Ann. Med. Interne* 1977, 128, 869-873.

127. Schooneman F., Stoltz .F., Streiff F. - Les séparateurs de cellules : description et rôles en transfusion sanguine et en clinique humaine. - *RBM* 1983, 5, 218-223.

128. Blumberg N., Sham I., Katz A.J., Morse E.E. - Granulocyte yields using the Haemonetics 30. - *Vox Sang.* 1982, 42, 225-232.

129. Glasser L., Huestis .W., Jones J.F. - Functional capacities of steroid-recruited neutrophils harvested for clinical transfusion. - *N. Engl. J. Med.* 1977, 297, 1033-1036.

130. Steigbigel R.T., Baum J., Mac Person J.L., Nusbacher J. - Granulocyte bactericidal capacity and chemotaxis as affected by continuous-flow centrifugation and filtration leukapheresis, steroid administration and storage. - *Blood* 1978, 52, 197-209.

131. Wright D.G., Kauffmann J.C., Chusid M.J., Herzig G.P., Gallin J.I. - Functional abnormalities of human neutrophils collected by continuous flow filtration leukapheresis. - *Blood* 1975, 46, 901-911.

132. Mac Pherson J.L., Nusbacher J., Bennett J.M. - The acquisition of granulocytes by leukapheresis. A comparison of continuous flow centrifugation and filtration leukapheresis in normal and corticosteroid-stimulated donors. - Transfusion, 1976, 16, 221-228.
133. Glasser L., Huestis D.W. - Characteristics of stored granulocytes collected from donors stimulated with dexamethasone. - Transfusion 1979, 19, 53-56.
134. Majeski J.A., Alexander J.W. - The steroid effect on the in vivo human neutrophil chemotactic response. - J.Surg.Res. 1976, 21, 265-268.
135. Hinckley M.E., Huestis D.W. - Premedication for optimal granulocyte collection. - Plasma.Ther.Trans.Technol. 1981, 2, 149-152.
136. Aulmann H.M., Schnurer U., Muller R., Stangel W., Schumacher S. - Der Einfluss von hoch-und niedermolekularer Hydroxy-Ethyl-Strärke (HES) auf die zelluläre Zusammensetzung von Granulozytenkonzentraten. - Beitr. Infusion 1988, 21, 127-129.
137. Strauss R.G., Snyder E.L., Stuber J., Fick R.B. - Ingestion of hydroxyethylstarch by human leukocytes. - Transfusion 1986, 26, 88-90.
138. Strauss R.G., Goeken J.A., Imig K.M., Greazel C. - Effects on immunity of multiple leukapheresis using a rapidly excreted analog of hydroxyethylstarch. - Transfusion 1986, 26, 265-268.

139. Strauss R.G., Hester J.P., Vogler W.R., Higby D.J., Snikeris A.C., Imig K.M., Greazel C., Mallard G., Burnett D., Gupta S., Hulse J.D. - A multicenter trial to document the efficacy and safety of a rapidly excreted analog on hydroxyethyl starch for leukapheresis with a note on steroid stimulation of granulocyte donors. - *Transfusion* 1986, 26, 258-267.
140. Price T.H., Glasser L. - Neutrophil collection using modified fluid gelatin effect on in vitro and in vivo neutrophil function. - *Transfusion* 1985, 25, 238-243.
141. Lefrancois G. - Use of modified fluid gelatin for centrifugal leukapheresis. *Transfusion* 1987, 27, 112-117.
142. Rock G. - Modified fluid gelatin as a possible replacement for hydroxyethylstarch in granulocyte collection. - *J.Clin.Apheresis* 1984, 2, 63-67.
143. Ben Bunan M., Bussel A. - Prélèvements de granulocytes par centrifugation à débit continu. - *Nouv.Rev.Fr.Hematol.* 1976, 16, 88-97.
144. Muellenhagen V.P. - Patient management on the Cobe 997 (IBM). - *Plasma.Ther.Transf.Technol.* 1986, 7, 319-328.
145. French J.E., Solomon J.M., Fratantoni J.C. - Survey on the current use of leukapheresis and the collection of granulocytes concentrates. - *Transfusion* 1982, 22, 220-225.

146.Thomas-Jacquot C. - Les séparateurs de cellules : aspect techniques.Rôles en transfusion sanguine. - Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Médecine. - Université de Nancy I 1989, 270 p.

147.Wade P.H., Skrabut E.M., Vinciguerra L., Valeri C.R. - In vitro function of granulocytes isolated from blood of normal volunteers using continuous flow-centrifugation in the IBM-Aminco celltrifuge and adhesion filtration leukapheresis using nylon fiber. - Transfusion 1977, 17, 136-140.

148.Racz Z., Harsanyi V., Janossy A. - Increased yield of leukocytes from blood stored overnight. - Transfusion 1984, 24, 411-412.

149.Bensiger W.I., Williams .M., Friedman L.I., Buckner C.D., Clift R.A. - The effect of blood cooling prior to granulocyte transfusion. - Transfusion 1983, 23, 342-343.

150.Glasser L. - Effect of storage on normal neutrophils collected by discontinuous-flow centrifugation leukapheresis. - Blood 1977, 50, 1145-1150.

151.Klein H.G., Mac Curdy P.R., Braine H.G., Mac Person J.L., Dowling R.N. Panel IX : Complications related to equipment and technique. - J.Clin.Apheresis 1983, 1, 190-195.

152.Mac Credie K.B., Hester J.P., Freirich J. - Leukocyte collection and transfusion physiology. - Exp.Hematol.1977, 5, 33-38.

153.Glasser L. - Discontinuous flow centrifugation and neutrophil function. Transfusion 1977, 17, 513-516.

- 154.Huestis D.W. - Leukapheresis and granulocyte transfusion. - *Haematologia* 1982, 15, 39-55.
- 155.Rock G., Blanchette V., Mac Combie N., Titty P. - Comparative function of centrifugal apheresis devices. - *Vox Sang.*1985, 48, 36-142.
- 156.Grange M.J., Eche F., Bussel A., Ben Bunan M. - Etude fonctionnelle comparative des granulocytes de sujets normaux collectés par centrifugation et filtration à débit continu. - *Nouv.Rev.Fr.Hematol.*1976, 16, 111-115.
- 157.Mac Cullough J., Weiblen B.J., Deinard A.S., Boen J., Fortuny I.E., Quie P.G. - In vitro function and post-transfusion survival of granulocytes collected by continuous flow centrifugation and filtration leukapheresis. - *Blood* 1976, 48, 315-326.
- 158.Vezon M.G. - Préparation de concentrés leucocytaires par la technique de filtration en flux continu. - *Bordeaux Médical* 1977, 10, 273-276.
- 159.Wright D.G., Kauffmann J.C., Chusid M.J., Herzig G.P., Gallin J.I. - Functional abnormalities of human neutrophils collected by continuous flow filtration leukapheresis. - *Blood* 1975, 46, 910-911.
- 160.Feliu E., Woessner S., Matutes E. - Comparative morphology of granulocytes collected by three methods of leukapheresis.A light microscopy and transmission electron study. - *Transfusion* 1981, 21, 517-526.
- 161.Jemionek .F., Contreras T.J., French J.E. - Technique for increased granulocyte recovery from human whole blood by counterflow centrifugation elutriation.I.In vitro analyses. - *Transfusion* 1979, 19, 120-128.

162. Berkow R.L., Weisman S.J., Tzeng D., Haak R.A., Kleinmans F.W., Barefoot S., Baehner R.L.- -Comparative responses of human polymorphonuclear leukocytes obtained by counterflow centrifugal elutriation and Ficoll-hypaque density centrifugation. - J.Lab.Clin.Med.1984, 104, 698-709.
163. Contreras J., Jemionek J.F., French .E., Shields L.J. - Human granulocyte isolation by continuous flow centrifugation leukapheresis and counterflow centrifugation elutriation (CFCL/CCE). - Transfusion 1979, 19, 695-703.
164. Lionetti F.J., Hunt S.M., Lin P.S., Kurtz S.R., Valeri C.R. - Preservation of human granulocytes.II.Characteristics of granulocytes obtained by counterflow centrifugation. - Transfusion 1977, 17, 465-472.
165. Lane T.A., Windle B.E. - A model for the study of granulocyte concentrate preservation. - Transfusion 1980, 20, 559-562.
166. Glasser L., Lane T.A., Mac Cullough J., Price T.H. - Neutrophil concentrates : functional considerations, storage and quality control. - J.Clin.Apheresis 1983, 1, 179-184.
167. Glasser L. - Liquid storage of granulocytes. - Prog.Clin.Biol.Res.1982, 88, 31-41.
168. Mac Cullough J. - Liquid preservation of granulocytes. - Transfusion 1980, 20, 129-137.

- 169.Hammer M.C., Baltch A.L., Conroy J.V., Smith R.P. - Effects of storage and incubation conditions on human granulocyte phagocytic, bactericidal, and chemotactic functions. - *Cryobiology* 1986, 23, 525-.
- 170.Contreras T.J., Jemionek J.F., French J.E., Hartwig V.M., Walden D.A. - Liquid preservation of highly purified granulocytes. - *Cryobiology* 1980, 17, 243-251.
- 171.Mac Cullough J. - Effect of storage conditions on functions of granulocytes. - *Cryobiology* 1980, 17, 222-229.
- 172.Mac Cullough J. - Liquid preservation of granulocytes for transfusion. *Prog.Clin.Biol.Res.*1977, 13, 185-191.
- 173.Glasser L., Fiederlein R.L., Huestis D.W. - Liquid preservation of human neutrophils stored in synthetic media at 22°C.Controlled observation on storage variables. - *Blood* 1985, 66, 267-272.
- 174.Glasser L., Fiederlein R.L. - The effect of platelets and red cells on granulocytes stored at 22°C. - *Transfusion* 1984, 24, 310-315.
- 175.Glasser L. - The effect of platelets and erythrocytes on the storage of human granulocytes at 22°C. - *Am.J.Clin.Pathol.*1982, 78, 271-274.
- 176.Del Maschio A., Maclouf J., Corvazier E., Grange M.J., Borgeat P. - Activated platelets stimulate human neutrophils functions. - *Nouv.Rev.Fr.Hematol.*1985, 7, 275-278.

177.Serhan C.N., Sheppard K.A. - Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions.Evidence for the transformation of leukotriene-A₄ by platelet 12 lipoxygenase in vitro. - J.Clin.Invest.1990, 85, 772-779.

178.Belawy S.T., Gorka J., Hyers T.M., Webster R.O. - In vitro effects of platelet factor 4 on normal human neutrophil functions. - J.Leuk.Biol.1986, 6, 423-434.

179.Contreras T.J., Jemionek J.F., French J.E., Shields L.J.
Effect of plastic containers on liquid preservation of human granulocytes.I.With and without desoxyribonuclease and hydrocortisone.
Transfusion 1980, 20, 519-530.

180.Miyamoto M., Sasakawa S. - Effects of plasticizers and plastic bags on granulocyte function during storage. - Vox Sang.1987, 53, 19-23.

181.Contreras T.J., Jemionek J.F., French J.E., Shields L.J. - Effects of plastic polymer surfaces on the liquid preservation of human granulocytes. - Transfusion 1978, 18, 650-651.

182.Mac Cullough J., Carter S.J., Quie P.G. - Effect of anticoagulants and storage on granulocyte function in bank blood. - Blood 1974, 43, 207-217.

183.Miyamoto M., Sasakawa S. - Studies on granulocyte preservation.III.Effect of agitation on granulocyte concentrates. - Transfusion 1987, 27,165-172

184.Lane T.A., Lamkin G.E. - The effect of storage on degranulation by human neutrophils. - Transfusion 1985, 25, 155-161.

185. Baggiolini M., Dewald B. - The neutrophil. - *Int.Archs.Allergy Appl.Immun.*1985, 76, 13-20.
186. Wade B.H., Mandell G.L. - Polymorphonuclear leukocytes : dedicated professional phagocytes. - *Am.J.Med.*1983, 4, 686-693.
187. Lane T.A., Lamkin G.E. - Hydrogen ion maintenance improves the chemotaxis of stored granulocytes. - *Transfusion* 1984, 24, 231-237.
188. Lane T.A., Windle B.E. - Granulocyte concentrate function during preservation : effect of temperature. - *Transfusion* 1980, 20, 347-354.
189. Lane T.A. - Granulocyte concentrates preservation : 6°C versus room temperature. *Transfusion* 1978, 18, 394-407.
190. Mac Cullough J., Weiblen B.J., Peterson P.K., Quie P.G. - Effect of temperature on granulocyte preservation. - *Blood* 1978, 52, 301-310.
191. Palm S.L., Furcht L.T., Mac Cullough J. - Effects of temperature and duration of storage on granulocyte adhesion, spreading and ultrastructure. *Lab.Invest.*1981, 45, 82-88.
192. Glasser L., Fiederlein R.L., Huestis D.W. - Granulocyte concentrates : glucose concentrations and glucose utilization during storage at 22°C. - *Transfusion* 1985, 25, 68-69.
193. Weisdorf D.J., Craddock P.R., Jacob H.S. - Glycogenolysis versus glucose transport in human granulocyte : differential activation in phagocytosis and chemotaxis. - *Blood* 1982, 60, 888-893.

194.Lane T.A., Lawkin G.E. - Glycogen metabolism in stored granulocytes.

Transfusion 1985, 5, 246-250.

195.Contreras T.J., Hunt S.M., Lionetti F.J., Valeri C.R. - Preservation of human granulocytes.III.Liquid preservation studied by electronic sizing. -

Transfusion 1978, 18, 46-53.

196.Ginsburg I., Borinski R., Pabst M. - NADPH and "cocktails" containing polyarginine reactivate superoxide generation in leukocytes lysed by membrane-damaging agents. - Inflammation 1985, 9, 341-362.

197.Valerius N.H. - Chemotaxis spreading and oxidation metabolism of neutrophils.Influence of albumin in vitro. -

Acta.Pathol.Microbiol.Immunol.Scand.1983, 91, 43-49.

198.Stein P., Rothe E., Drawert J. - Use of para-aminomethylbenzoic acid (PAMBA) for preservation of concentrates of human leukocytes. -

Acta.Biol.Med.Germ.1981, 40, 1077-1082.

199.Babior .M., Berkman E. - Granulocyte storage. - Lancet 1990, 335, 50.

200.Paul J.L., El Abbouyi A., Roch-Arveiller M., Giroud J.P., Agneray J., Yonger J., Raichvarg D. - Effects of storage on the pyruvate-lactate system and

random migration of human granulocytes. - Vox Sang.1987, 52, 24-27.

201.Mac Cullough J., Weiblen B.J. - The relationship of granulocyte ATP to chemotactic response during storage. - Transfusion 1979, 19, 764-767.

- 202.Lane T.A., Lamkin G.E. - A reassessment of the energy requirement for neutrophil migration : adenosine phosphatase depletion enhances chemotaxis. Blood 1984, 64, 986-993.
- 203.Suzuki K., Swenson C., Sasagawa S., Sakatani T., Watanabe M., Kobayashi M., Fujikura T. - Age-related decline in lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes after N-formyl-methionyl-phenylalanine stimulation. - Exp.Hematol.1983, 11, 1005-1013.
- 204.Lane T.A., Windle B.E. - Decreased affinity for a chemotactic factor in stored granulocytes concentrates. - Transfusion 1981, 21, 450-456.
- 205.Lane T.A., Lamkin G.E. - Chemotaxis receptor cycling in fresh and stored granulocytes. - Transfusion 1988, 28, 362-367.
- 206.Lane T.A., Lamkin G.E. - Stimulus-response coupling in fresh and stored granulocytes. - Transfusion 1988, 28, 243-250.
- 207.Lane T.A., Lamkin G.E. - Adherence of fresh and stored granulocytes to endothelial cells : effect of storage temperature. - Transfusion 1988, 28, 237-243.
- 208.Eastlund T., Charbonneau T., Britten A. - Changes in neutrophil aggregation and chemotaxis response during 18 hour cold storage. - Transfusion 1984, 24, 513-515.
- 209.Burton J.L., Law P., Bank H.L. - Video analysis of chemotactic locomotion of stored human polymorphonuclear leukocytes. - Cell Motility Cytoskel.1986, 6, 485-493.

210.Lane T.A.,Lamkin G.E. - Defective energy metabolism in stored granulocytes. - Transfusion 1982, 22, 368-373.

211.Lane T.A., Beutler E., West C., Lamkin G. - Glycolytic enzymes of stored granulocytes. - Transfusion 1984, 24, 153-156.

212.Garreud O., Moreau T. - Effect of blood storage on lymphocyte subpopulations. - J.Immunol.Methods.1984, 75, 95-98.

213.Glassman A.B., Christopher J.B. - Effect of cryopreservation on lymphocyte markers evaluated by monoclonal antibodies. - Transfusion 1984, 24, 538-539.

214.Kahan A., Kahan A., Amor B. - Lymphocytes subpopulations during blood storage. - Arch.Intern.Med.1984, 144, 2101.

215.Liu S.S., Liu P.I., Daniel S.J. - Stability of cryopreserved and stored blood lymphocytes. - Ann.Clin.Lab.Sci.1983, 13, 321-326.

216.Margo B., Dzik W. - Mitogen response of lymphocytes in platelet concentrates.Effect of storage and adenine. - Blood 1987, 49, 234-237.

217.Weiblen B.J.,Debell K., Giorgio A., Valeri C.R. - Monoclonal antibody testing of lymphocytes after overnight storage. - J.Immunol.Methods.1984, 70, 179-183.

- 218.Stevenson H.C., Miller P., Akiyama Y., Favilla T., Bernan J.A., Heberman R., Hill H., Thurman G., Maluish A., Oldham R. - A system for obtaining large numbers of cryopreserved human monocytes purified by leukapheresis and counter-current centrifugation elutriation (CCE). - J.Immunol.Methods.1983, 62, 353-363.
- 219.Weiner R.S., Normann S.J. - Functional integrity of cryopreserved human monocytes. - J.N.C.I. 1981, 66, 255-260.
- 220.Korbling M., Freidler T.M., Ruber E., Pfliegler H. - Description of a dosed plastic bag system for the collection and cryopreservation of leukapheresis-observed blood mononuclear leukocytes and CFUC from human donors. - Transfusion 1980, 20, 293-300.
- 221.Bank H. - Granulocyte cryopreservation circa 1980. - Cryobiology 1980, 17, 187-197.
- 222.Beaujean F. - Cryopr  servation des granulocytes humains : techniques et résultats. - La Nouvelle Gazette de la Transfusion 1983, 14, 60.
- 223.Ichino Y., Ishikawa T. - Effects of cryopreservation on human lymphocyte functions : comparison of programmed freezing method by a direct control system with a mechanical freezing method. - J.Immunol.Method.1985, 77, 283-289.
- 224.Boonlayangoor P., Telischi M., Boonlayangor S., Sinclair T.F., Millhouse E.W. - Cryopreservation of human granulocytes : study of granulocyte function and ultrastructure. - Blood 1980, 56, 237-245.

- 225.Hill R.S., Mac Kinder C.A. - Freeze preservation of human granulocytes.
Lancet 1980, 19, 878-879.
- 226.Mac Carthy D.M., Skacel P., Raja K., Martin F., Peters T., Goldman J.M.
Granulocytic cryopreservation : further studies on the pathogenesis of impaired cellular function. - Br.J.Hematol.1984, 56, 45-54.
- 227.Scheiwe M.W., Körber C.H., Englich S. - Effect of dimethylsulphoxide/hydroxyethylstarch on granulocyte survival estimated by fluorescence assay. - Cryobiology 1984, 5, 300-306.
- 228.Zaroulis C.G., Leider I.Z. - Successful freeze preservation of human granulocytes. - Cryobiology 1980, 17, 311-317.
- 229.Mac Carthy D.M., Goldman J.M., Peters T.J. - Biochemical studies on the defects induced in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during attempted cryopreservation. - Cryobiology 1980, 17, 595.
- 230.Mac Carthy D.M., Goldman J.M., Peters T. - Biochemical studies on cryopreserved granulocytes : possible explanations for the defects induced. - Br.J.Hematol.1981, 9, 227-234.
- 231.Rowe A.W., Lenny L.L. - Cryopreservation of granulocytes for transfusion : studies on human granulocyte isolation, the effect of glycerol uptake and cryopreservation with dimethylsulfoxide and glycerol. - Cryobiology 1980, 17, 198-212.
- 232.Absolom D.R., Van Oss C.J. - Cryopreservation of ficoll-hypaque isolated human granulocytes. - Cryobiology 1980, 17, 287-296.

- 233.Takahashi T., Bross J.B., Shaber R.E., Williams R.J. - Effect of cryoprotectants on the viability and function of unfrozen human polymorphonuclear cells. - Cryobiology 1985, 22, 336.
- 234.Knight S.C., O'Brien J., Farrant J. - Injury to human granulocytes at low temperature. - Cryobiology 1980, 17, 273-281.
- 235.Takahashi T., Hammett M.F., Cho M.S. - Multifaceted freezing injury in human polymorphonuclear. - Cryobiology 1985, 22, 215.
- 236.Frim J., Mazur P. - Approaches to the preservation of human granulocytes by freezing. - Cryobiology 1980, 17, 282-286.
- 237.Yamashita T. - Preservation of polymorphonuclear neutrophils at cryogenic temperature (-80°C). - Cryobiology 1980, 17, 112-119.
- 238.Yamashita T. - Preservation of polymorphonuclear neutrophils at low temperature (4°C). - Cryobiology 1980, 17, 108-111.
- 239.Schwartz G.J., Diller K.R. - Intracellular freezing of human granulocytes. Cryobiology 1984, 21, 654-660.
- 240.Frim J. - Interaction of cooling rate, warming rate, glycerol concentration and dilution procedure on the viability of frozen-thawed human granulocyte. Cryobiology 1984, 20, 657-676.
- 241.Lionetti F.J., Luscinkas F.W., Valeri C.R., Callahan A.B. - Factors affecting the stability of cryopreserved human granulocytes. - Cryobiology 1980, 17, 297-310.

242.Richman C.M. - Prolonged cryopreservation of human granulocytes. - Transfusion 1983, 23, 508-511.

243.Hill R.S., Mac Kinder C., Challinor S., Postlewaigh B. - Recovery of functional capacity of human granulocytes after freeze-preservation with dimethylsulfoxide. - Cryobiology 1979, 16, 105-111.

244.Hill S. - Improved functional recovery of human granulocytes after cryopreservation. - Cryobiology 1981, 18, 523-540.

245.Tsvetkov T., Nickolov C., Buckureshliev A., Alexiev N., Mincheff M., Milev A. - Aggregate formation in cryopreserved leukocytes suspensions. Cryobiology 1985, 22, 35-43.

246.Lopez M., Beaujean L., Levanra L., Leforestier C. - Freeze-preservation of human granulocytes with dimethylsulfoxide and hydroxyethylstarch-is it a good technique? - Cryo-letter 1984, 5,383.

247.Dankberg F.L., Persidsky M.D., Spring R.J., Olson L.S. - Brief communication : effects of serum on cryoconservation of granulocytes. - Cryobiology 1978, 15, 484-487.

248.Nelson R.D., Mac Cormack R.T., Fiegel R.D. - Chemotaxis of human granulocytes under agarose.In Gallin J.I., Quie P.G. Leukocyte chemotaxis: methods, physiology and clinical implications (Raven Press, 1978), 25-39.

249.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C. - Etude expérimentale d'un modèle de conservation des polynucléaires neutrophiles. - Ann.Biol.Clin.1991, 49, 155-160.

250.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C. - Liquid preservation of granulocytes.Effect of various additives on chemotaxis preservation. - Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.1991, 29, 717-724.

251.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C. - Etude de l'évolution du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles conservés in vitro durant quatre jours. - Ann.Biol.Clin. (sous presse).

252.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C. - L'adénosine triphosphate augmente le maintien du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles. - Path.Biol. (soumis pour publication).

253.Evans W.H., Bednarek J.M., Alvarez V.L., Wright D.G., Terebelo H.R., Taylor G. - Direct analysis of differentiation proteins in normal and leukemic human granulocytes by high performance liquid chromatography. - JNCI 1985, 75, 227-235.

254.Verstraeten L., Marchand-Arvier M., Schooneman F., Vigneron C. - Four days liquid preservation of polymorphonuclear leukocytes collected by cytapheresis. - Transfusion Science (soumis pour publication).

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

de Monsieur VERSTRAETEN Luc

Mention : GENIE BIOLOGIQUE

AUTORISE A IMPRIMER LA THESE

Nancy, le 29 JUIN 1992

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



Professeur M. BOU LANGÉ

