



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

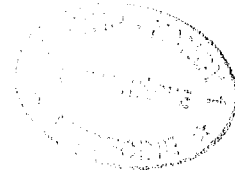
ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

2002

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE  
HENRI-POINCARE NANCY I  
BIOINGÉNIERIE

Spécialité : 



Présentée par Véronique LATGER-CANNARD

et soutenue publiquement le 12 novembre 2002

**IMPLICATION DE LA CYTOMETRIE EN FLUX QUANTITATIVE ET DE LA  
MICROSCOPIE A SECTIONNEMENT OPTIQUE 3D A FLUORESCENCE  
DANS L'EXPLORATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE LEUCOCYTAIRES.  
APPLICATIONS A DIFFERENTS DOMAINES PATHOLOGIQUES.**

Directeur de thèse : Professeur J.F. STOLTZ

**JURY**

Président : Docteur M.L. Viriot

Rapporteurs :

Professeur P. NGUYEN  
Professeur R. SANTUS

Laboratoire d'Hématologie, CHU Reims  
Muséum d'Histoire Naturelle, INSERM, Paris

Juges :

Docteur M.L. VIRIOT  
Professeur P. BORDIGONI

Directeur de Recherche au CNRS, Nancy  
Service de Médecine Infantile II, CHU Nancy  
Unité de Transplantation Médullaire

Professeur J.F. STOLTZ

Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et  
Tissulaire, Equipe LEMTA – UMR CNRS INPL UHP  
7563

## **REMERCIEMENTS**

*A mon directeur de recherche :*

**Monsieur le Professeur J.F. STOLTZ,**

Je vous adresse mes remerciements pour m'avoir apporté votre soutien et vos encouragements afin de finaliser ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance et de tout mon respect.

*A mes juges :*

**Monsieur le Professeur P. BORDIGONI,**

Pour l'enthousiasme et l'intérêt qu'il a manifesté, je lui exprime mes remerciements et ma profonde gratitude. Puisse ce travail symboliser notre active collaboration.

**Madame le Docteur M.L. VIRIOT,**

Je lui exprime ma plus vive reconnaissance pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de faire partie du jury. Que son tempérament énergique et ses qualités humaines nous restent un modèle.

*A mes rapporteurs :*

**Monsieur le Professeur P. NGUYEN,**

Je le remercie vivement pour l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail en acceptant d'en être le rapporteur. Que ce travail puisse se poursuivre par une collaboration soutenue entre les centres d'hématologie de Reims et de Nancy.

**Monsieur le Professeur R. SANTUS,**

Il m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je tiens également à remercier toutes celles et ceux qui ont participé à ce travail :

**Mr le Professeur T. Lecompte**, qui m'a enseigné durant ces années d'assistantat le sens de la rigueur intellectuelle, m'a fait partagé ses connaissances et qui m'a témoigné de sa confiance en acceptant que je poursuive mes fonctions dans son service. Puisse ce travail représenter la continuité de mon mémoire de thèse d'exercice qu'il avait dirigé.

**Véronique Regnault** pour sa disponibilité, son encadrement et ses précieux conseils scientifiques lors de la mise au point des protocoles par cytométrie en flux quantitative.

**Dominique Dumas** pour sa contribution dans la réalisation des expériences par microscopie 3D à sectionnement optique, pour son amitié et son humour.

**Mme M. Marchand-Arvier et Mr le Professeur C. Vigneron** qui m'ont encadrée pour le travail sur les monocytes de sujets présentant une cirrhose alcoolique ainsi que celui sur le patient atteint de glycogénose Ib.

**Mr le Professeur M. Vidailhet** pour ses discussions et précieuses suggestions pour le travail sur la glycogénose Ib.

**Mr le Professeur J.P. Bronowicki** qui a initié le travail sur les monocytes de patients atteints de cirrhose alcoolique, pour son accueil dans son service et pour ses discussions tout au long de ce travail.

**Mme T. Lecompte** pour sa collaboration dans l'étude de validation de la trousse de quantification de l'expression de CD11b pour des patients infectés et pour son accueil dans son service.

**Marie Toussaint** avec laquelle j'ai eu un grand plaisir à travailler.

**Mme J. Buisine** qui me communique, à travers sa passion pour la cytologie et sa jeunesse d'esprit, la motivation pour l'amour de mon métier.

**A toute l'équipe de cytologie** et en particulier, Mesdames **Samantha Lapuyade, Sylvie Viry, Martine Siest, Viviane Chenot** pour leur aide technique.



**A mes parents**

**A mon mari**  
**A mon fils**

## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| Liste des publications et communications réalisées | 1  |
| Liste des abréviations                             | 9  |
| Liste des illustrations                            | 11 |
| INTRODUCTION GENERALE                              | 16 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>PREMIÈRE PARTIE : LES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU LEUCOCYTE.<br/>STRUCTURE ET FONCTIONS : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> | <b>20</b> |
|---|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I- LES RECEPTEURS D'ADHERENCE IMPLIQUES DANS L'INTERACTION<br/>POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE/CELLULES ENDOTHELIALES</b> | <b>20</b> |
| <b>I-1- LES INTEGRINES</b>   | <b>20</b> |
| I-1-A- Structure générale des intégrines   | 20        |
| I-1-B- $\beta_2$ intégrines : intégrines leucocytaires (chaîne $\beta$ =CD18)  | 21        |
| I-1-C- $\beta_1$ intégrine : VLA-4 (chaîne $\beta$ =CD49d/CD29)  | 23        |
| <b>I-2- LES SELECTINES</b>   | <b>25</b> |
| <b>I-3- LA SUPER-FAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES (IgSF)</b>   | <b>30</b> |
| I-3-A- ICAM-1 (CD54) : Intercellular Adhesion Molecule-1   | 31        |
| I-3-B- ICAM-2 (CD102) : Intercellular Adhesion Molecule-2  | 32        |
| I-3-C- VCAM-1 (CD106) : Vascular Cell Adhesion molecule-1  | 33        |
| I-3-D- PECAM-1 (CD31) : Platelet Endothelial Cell Adhesion<br>molecule-1   | 34        |
| <b>II- "THE ADHESION CASCADE"</b>  | <b>36</b> |
| II-1- PREMIERE ETAPE : LE ROULEMENT LENT DES LEUCOCYTES  | 36        |
| II-2- DEUXIEME ETAPE : L'ACTIVATION CELLULAIRE   | 39        |
| II-2-A- Activation du PNN  | 39        |
| II-2-B- Activation des cellules endothéliales  | 42        |
| II-3- TROISIEME ETAPE : L'ADHESION FERME   | 42        |
| II-4- QUATRIEME ETAPE : MIGRATION TRANS-ENDOTHELIALE OU<br>DIAPYCNOSIS   | 43        |
| II-5- ACTIVITE DES PNN AU NIVEAU DU SITE INFLAMMATOIRE   | 44        |
| II-6- RECRUTEMENT DES LEUCOCYTES : ORGANISATION DE LA<br>REponse INFLAMMATOIRE   | 45        |
| II-7- LES AUTRES VOIES DE L'ADHESION PNN - CELLULE<br>ENDOTHELIALE   | 46        |

|  |    |
|--|----|
| <b>III- LES MEDIATEURS SOLUBLES DU DEPLACEMENT</b>                               | 49 |
| <b>III-1- LES MEDIATEURS ACTIVEURS</b>   | 49 |
| <b>III-1-A- Les chimioattractants</b>  | 50 |
| <b>III-1-B- Les chémokines</b>   | 51 |
| III-1-B-①- Les chémokines $\alpha$   | 51 |
| III-1-B-②- Les chémokines $\beta$  | 51 |
| <b>III-1-C- Les cytokines et facteurs de croissance</b>                          | 54 |
| III-1-C-①- Le TNF  | 55 |
| III-1-C-②- L'interleukine 1 (IL-1)   | 56 |
| III-1-C-③- L'interféron $\gamma$   | 56 |
| III-1-C-④- Le granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) endogène | 57 |
| III-1-C-⑤- Actions synergiques   | 57 |
| <b>III-2- LES MEDIATEURS INHIBITEURS</b>   | 58 |

|   |    |
|---|----|
| <b>DEUXIÈME PARTIE : MATERIEL ET METHODES</b> | 59 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>I- PRELEVEMENT DE SANG</b>   | 59 |
| <b>II- ISOLEMENT DES PNN</b>  | 59 |
| <b>II-1- PRINCIPE</b>   | 59 |
| <b>II-2- MATERIEL</b>   | 59 |
| <b>II-3- REACTIFS</b>   | 60 |
| <b>II-4- MODE OPERATOIRE</b>  | 60 |
| <b>III- QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN PAR CYTOMETRIE EN FLUX</b> | 61 |
| <b>III-1- INTRODUCTION SUR LA CYTOMETRIE QUANTITATIVE</b>   | 61 |
| <b>III-1-A- PRINCIPE ET INTERET</b>   | 61 |
| <b>III-1-B- LES PRINCIPAUX CALIBRANTS UTILISES EN CYTOMETRIE QUANTITATIVE</b>                                     | 63 |
| III-1-B-①- Immuno-brite (Coultronics®)- Sphero Rainbow (Pharmigen®)   |    |
| III-1-B-②- Quantum Beads (Flow Cytometry Standards Corporation®)  |    |
| III-1-B-③- Quantum Simply Cellular Micobeads (Sigma®)   |    |
| III-1-B-④- Qifikit (Dako®)  |    |
| <b>III-2- CHOIX ET DESCRIPTION DE L'ETALON</b>  | 67 |
| <b>III-3- MATERIEL ET REACTIFS</b>  | 69 |
| <b>III-4- MODE OPERATOIRE</b>   | 70 |
| <b>III-5- EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSE STATISTIQUE</b>   | 72 |

|  |    |
|--|----|
| <b>IV- ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN PAR MICROSCOPIE A SECTIONNEMENT OPTIQUE A FLUORESCENCE EN 3D</b> | 73 |
| <b>IV-1- ACQUISITION DES IMAGES</b>  | 73 |
| <b>IV-2- TRAITEMENT DES IMAGES</b>   | 76 |

|   |    |
|---|----|
| <b>TROISIÈME PARTIE : ETUDES FONDAMENTALES ET CLINIQUES – RESULTATS ET DISCUSSION</b> | 78 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Chapitre III-1 :<br/>EXPRESSION QUANTITATIVE ET DISTRIBUTION SPATIALE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN POUR DES TEMOINS SAINS EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET APRES STIMULATION</b> | 78 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>I- EXPRESSION QUANTITATIVE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN : VALEURS DE REFERENCES EN FONCTION DU MODE DE PREPARATION CELLULAIRE</b> | 78 |
|---|----|

**Article 1**

**LATGER-CANNARD V., REGNAULT V., DUMAS D., P. NGUYEN, LECOMPTE T., STOLTZ J.F.**

Mesure des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile : influence des paramètres pré-analytiques.

Journal des Maladies Vasculaires, 2000, 25 : 181-186.

|  |    |
|--|----|
| <b>II- EXPRESSION QUANTITATIVE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN A L'ETAT BASAL ET APRES STIMULATION</b> | 78 |
|--|----|

**Article 2**

**LATGER V., REGNAULT V., DUMAS D., VIRION J.M., SCHOONEMAN J.F., STOLTZ J.F, LECOMPTE T.**

Utilisation d'un calibrateur pour quantifier les récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile par cytométrie en flux.

Annales de Biologie Clinique, 2000, 58 : 337-343.

**Article 3**

**LATGER V., DUMAS D., LECOMPTE T., POTRON G., STOLTZ J.F.**

Pathologie vasculaire et activation cellulaire : exploration du phénotype cellulaire adhérent par cytométrie quantitative.

Journal des Maladies Vasculaires, 1999, 24 : 11-18.

**III- DISTRIBUTION SPATIALE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN A L'ETAT BASAL ET APRES STIMULATION** 81

**Article 4**

**LATGER-CANNARD V., DUMAS D., BENSOUSSAN D., STOLTZ J.F.**

Spatial distribution of the  $\beta_2$  integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) adherence receptors on human neutrophils by Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM).

Biorheology, 2002, sous presse.

|  |
|--|
| <b>Chapitre III-2 :</b><br><b>DEFICIT DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU PNN CHEZ UN PATIENT PRESENTANT UNE GLYCOGENOSE IB</b> 82 |
|--|

**I- INTRODUCTION** 82

**I-1- LES DEFICITS EN RECEPTEURS D'ADHERENCE LEUCOCYTAIRES** 82

**I-1-A- DEFICIT DES  $\beta_2$  INTEGRINES ET DE LEURS LIGANDS (IgSF)** 83

I-1-A-①- Le "LAD" syndrome type I (forme initialement décrite) 83

I-1-A-②- Le "LAD" syndrome type I, variant 1 86

I-1-A-③- Le "LAD" syndrome type I, variant 2 87

I-1-A-④- Le "LAD" syndrome type I variant 3 89

**I-1-B-DEFICIT DES SELECTINES ET DE LEURS LIGANDS** 92

I-1-B-①- Le "LAD" syndrome type II 92

I-1-B-②- Le "LAD" syndrome type III ? 100

**I-2- LA GLYCOGENOSE Ib** 105

**II-PATIENT- MATERIELS ET METHODES** 106

**II-1- PATIENT** 106

**II-2- MATERIELS ET METHODES** 110

**II-2-A- PRELEVEMENT** 110

**II-2-B- ISOLEMENT DES PNN** 110

**II-2-C- ETUDE DU CHIMIOTACTISME DES PNN** 110

**II-2-D- ETUDE DU METABOLISME OXYDATIF** 116

II-2-D-①- Technique par chimiluminescence 116

II-2-D-②- Mesure de la génération de l'anion superoxyde par réduction du cytochrome C 118

**II-2-E- ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE** 119

**II-2-F- QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE** 122

**III- RESULTATS** 123

**Article 5**

**LATGER-CANNARD V., MARCHAND-ARVIER M., VIDAILHET M., DONADIEU J., VIGNERON J.C., BORDIGONI P.** and the "Registre Français des Neutropénies Chroniques".

Neutrophil adherence receptors expression deficiency regressing with G-CSF therapy in a case of glycogen storage disease type Ib.

European Journal of Pediatrics, 2002, 161: 87-93.

**Chapitre III-3 :**

**APPROCHE FONCTIONNELLE DE LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE DES MONOCYTES CHEZ LES SUJETS PRESENTANT UNE CIRRHOSE ALCOOLIQUE : QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE, ETUDE DU CHIMIOTACTISME ET EXPOSITION DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES** 132

**I- INTRODUCTION- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES** 132

**I-1- SUSCEPTIBILITE DES PATIENTS ATTEINTS DE CIRRHOSE ALCOOLIQUE A PRESENTER DES INFECTIONS ET MAUVAISE REPONSE VACCINALE AU VIRUS DE L'HEPATITE B (VHB)** 133

**I-2- PERTURBATIONS DU SYSTEME IMMUNITAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CIRRHOSE ALCOOLIQUE** 134

**I-2-A- IMMUNITE HUMORALE : HYPERGAMMAGLOBULINEMIE** 134

**I-2-B- IMMUNITE CELLULAIRE LYMPHOÏDE** 134

**I-2-C- PERTURBATIONS DES CELLULES MONOCYTAIRES ET DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES** 135

**I-3- ALTERATION DE LA FLUIDITE DES MEMBRANES MONOCYTAIRES CHEZ LES CIRRHOTIQUES ALCOOLIQUES** 137

**I-3-A- LA FLUIDITE MEMBRANAIRE : GENERALITES ET DEFINITION**

**I-3-B- FACTEURS INFLUENCANT LA FLUIDITE MEMBRANAIRE** 142

**I-3-B-①- L'adaptation membranaire à la présence d'alcool** 142

**I-3-B-②- Rôle de la maladie hépatique dans les variations de la fluidité membranaire chez l'alcoolique** 143

**I-3-B-③- Influence de la fluidité des membranes monocytaires sur la réponse à la vaccination contre l'hépatite B chez les cirrhotiques alcooliques. (Thèse Barraud H, 2000)** 144

|  |     |
|--|-----|
| <b>II- MATERIELS ET METHODES</b>   | 148 |
| <b>II-1- BUT DU TRAVAIL: CHOIX DES TESTS UTILISES</b>  | 148 |
| <b>II-1-A- FLUIDITÉ MEMBRANAIRE ET CHIMIOTACTISME DES MONOCYTES</b>  | 148 |
| <b>II-1-B- FLUIDITÉ MEMBRANAIRE ET EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE</b>   | 150 |
| <b>II-1-C- FLUIDITÉ MEMBRANAIRE ET ETUDE DE L'ASYMÉTRIE LIPIDIQUE PAR MESURE DE L'EXPOSITION DES PHOSPHOLIPIDES ANIONIQUES</b>     | 151 |
| <b>II-2- PATIENTS ET TEMOINS</b>   | 156 |
| <b>II-2-A- PATIENTS</b>  | 156 |
| <b>II-2-B- TEMOINS</b>   | 157 |
| <b>II-3- DESCRIPTION DES TESTS UTILISES</b>  | 158 |
| <b>II-3-A- ANALYSE DU CHIMIOTACTISME DES MONOCYTES</b>   | 158 |
| <b>II-3-B- QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES MONOCYTES PAR CMF</b>  | 164 |
| <b>II-3-C- MESURE DE L'EXPOSITION DES PHOSPHOLIPIDES ANIONIQUES A LA SURFACE DES MONOCYTES A L'AIDE DE L'ANNEXINE V PAR CMF</b>    | 168 |
| <b>III- RESULTATS</b>  | 172 |
| <b>III-1- ANALYSE DESCRIPTIVE</b>  | 172 |
| <b>III-2- RESULTATS DES TESTS - COMPARAISON DES PATIENTS PAR RAPPORT AUX TEMOINS</b>   | 176 |
| <b>III-3- ETUDE DES RESULTATS CHEZ LES PATIENTS EN FONCTION DE LEUR SUSCEPTIBILITE A PRESENTER DES COMPLICATIONS INFECTIEUSES</b>  | 177 |
| <b>III-4- ETUDE DES RESULTATS CHEZ LES PATIENTS EN FONCTION DE LEUR SUSCEPTIBILITE A PRESENTER DES COMPLICATIONS HEMORRAGIQUES</b> | 178 |
| <b>IV- DISCUSSION</b>  | 180 |

#### **Article 6**

**LATGER-CANNARD V., MARCHAND-ARVIER M., ANCEL D., VIGNERON C., BRONOWICKI JP.**

Quantitative leukocyte adherence receptors and phosphatidylserine expression are altered in alcoholics cirrhosis : its relation with infection and hemorrhagic complications.

Gastroenterology, en cours de rédaction



**Chapitre III-4 :**

**QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU PNN : UN  
MODELE D'ETUDE *IN VITRO* DE L'EFFET DES HEMOGLOBINES DE  
SYNTHESE SUR LES PNN** 191

**Article 7**

TOUSSAINT M., LATGER-CANNARD V., CARON A., LECOMPTE T.,  
STOLTZ J.F., VIGNERON C., MENU P.

Effect of three hemoglobin-based oxygen-carrying solutions on neutrophil  
activation in vitro : quantitative measurement of the expression of adherence  
receptors.

Transfusion, 2001, 41: 226-231.

**Chapitre III-5 :**

**DEVELOPPEMENT D'UNE TROUSSE DE QUANTIFICATION DE CD11B A LA  
SURFACE DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES. APPLICATION A LA  
PATHOLOGIE INFECTIEUSE** 193

|  |     |
|--|-----|
| <b>I- INTRODUCTION</b>   | 193 |
| I-1- VARIATION DE L'EXPRESSION DE CD11B ET PATHOLOGIE<br>INFECTIEUSE   | 193 |
| I-2- VARIATION DE L'EXPRESSION DE CD11B ET PATHOLOGIE<br>INFLAMMATOIRE | 194 |
| I-3- VARIATION DE L'EXPRESSION DE CD11B ET PATHOLOGIE<br>VASCULAIRE    | 195 |
| <b>II- MATERIELS ET METHODES</b>                                       | 197 |
| II-1-PRINCIPE  | 197 |
| II-2- MATERIELS ET REACTIFS  | 197 |
| II-3- MODE OPERATOIRE  | 197 |
| II-4- EXPRESSION DES RESULTATS   | 199 |
| II-5- ANALYSE STATISTIQUE  | 199 |
| <b>III- RESULTATS</b>  | 200 |
| III-1- INFLUENCE DU MODE DE CONSERVATION DU PRELEVEMENT<br>SANGUIN     | 200 |
| III-2- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SANGUINE EN PNN                   | 200 |
| III-3- INFLUENCE DE LA FIXATION ASPECIFIQUE                            | 201 |
| III-4- COMPARAISON DES CLONES D'ANTICORPS ANTI-CD11B                   | 201 |

|  |     |
|--|-----|
| III-5- COMPARAISON ENTRE LES PROCEDURES D'IMMUNOMARQUAGE<br>INDIRECT SANS LAVAGE (TROUSSE WB-QFC) ET AVEC LAVAGE<br>(TROUSSE QIFI) | 201 |
| III-6- CONTROLE DE QUALITE INTERNE   | 202 |
| III-7- QUANTIFICATION DE CD11B A LA SURFACE DE PNN DE TEMOINS<br>ET DE PATIENTS INFECTES   | 202 |

|                |     |
|----------------|-----|
| IV- DISCUSSION | 210 |
|----------------|-----|

**Article 8**

**LATGER-CANNARD V.**, BESSON I, DOCO-LECOMPTE T., LECOMPTE T.  
A standardized procedure for quantitation of CD11b on polymorphonuclear  
neutrophil by flow cytometry : potential application in infectious diseases.  
J Immunol Methods, 2002, soumis.

|   |            |
|---|------------|
| <b>QUATRIÈME PARTIE : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> | <b>217</b> |
|---|------------|

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> | <b>222</b> |
|------------------------------------|------------|

|                |            |
|----------------|------------|
| <b>ANNEXES</b> | <b>248</b> |
|----------------|------------|

A-1-Microscopie en 3D à sectionnement optique



## **LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

## LISTE DES PUBLICATIONS RELATIVES AU MEMOIRE

**LATGER V, DUMAS D, LECOMPTE T, POTRON G, STOLTZ JF.**

Pathologie vasculaire et activation cellulaire : exploration du phénotype cellulaire adhérent par cytométrie quantitative.

J Mal Vascul, 1999, 24 : 11-18.

**LATGER V, REGNAULT V, DUMAS D, VIRION JM, SCHOONEMAN JF, STOLTZ JF, LECOMPTE T.**

Utilisation d'un calibrateur pour quantifier les récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile par cytométrie en flux.

Ann Biol Clin, 2000, 58 : 337-343.

**LATGER-CANNARD V, REGNAULT V, DUMAS D, NGUYEN P, LECOMPTE T, STOLTZ JF.**

Mesure des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile : influence des paramètres pré-analytiques.

J Mal Vascul, 2000, 25 : 181-186.

**TOUSSAINT M, LATGER-CANNARD V, CARON A, LECOMPTE T, STOLTZ JF, VIGNERON C, MENU P.**

Effect of three hemoglobin-based oxygen-carrying solutions on neutrophil activation in vitro : quantitative measurement of the expression of adherence receptors.

Transfusion, 2001, 41: 226-231.

**LATGER-CANNARD V, MARCHAND-ARVIER M, VIDAILHET M, DONADIEU J, VIGNERON JC, BORDIGONI P and the "Registre Français des Neutropénies Chroniques".**

Neutrophil adherence receptors expression deficiency regressing with G-CSF therapy in a case of glycogen storage disease type Ib.

Eur J Pediatr, 2002, 161: 87-93.

**LATGER-CANNARD V, DUMAS D, BENSOUSSAN D, STOLTZ JF.**

Spatial distribution of the  $\beta_2$  integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) adherence receptors on human neutrophils by Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM).

Biorheology, 2003, 40 : 167-172.

**LATGER-CANNARD V, BESSON I, DOCO-LECOMPTE T, LECOMPTE T.**

A standardized procedure for quantitation of CD11b on polymorphonuclear neutrophil by flow cytometry : potential application in infectious diseases".

J Immun Methods, 2002, soumis.

**LATGER-CANNARD V**, MARCHAND-ARVIER M, ANCEL D, VIGNERON C, BRONOWICKI JP.

Quantitative leukocyte adherence receptors and phosphatidylserine expression are altered in alcoholics cirrhosis: its relation with infection and hemorrhagic complications.

Gastroenterology, en cours de rédaction 2002.

|  |
|--|
| <b>AUTRES PUBLICATIONS<br/>(ETUDES COLLABORATIVES)</b> |
|--|

GIGOUT T, DIDELOU J, **LATGER V**, CLAISE C, SCHOONEMAN F, PAULUS F, STOLTZ JF.

Un nouveau test automatisé pour étudier la réponse plaquettaire aux variations de pression osmotique : applications à l'évaluation de la viabilité des concentrés plaquettaires.

Transfus Clin Biol, 1998, 5, : 336-45.

GIGOUT T, BLONDEL W, DIDELOU J, **LATGER V**, DUMAS D, SCHOONEMAN F, STOLTZ JF.

Development and evaluation of an automatic method for the study of platelet.

Technology Health Care, 1999, 7 : 371-80.

DUMAS D, **LATGER V**, VIRIOT ML, BLONDEL W, STOLTZ JF.

Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched endothelial cells.

Clin Hemorheol and Microcircul, 1999, 21 : 255-261.

RIHA P, DUMAS D, **LATGER V**, MULLER S, LABRADOR V, STOLTZ JF.

Molecular mechanisms of leukocyte rolling and tight adhesion to endothelium.

International Journal of Cardiovascular Medicine and Science, 1999, 2: 131-135.

RIHA P, DUMAS D, **LATGER V**, MULLER S, LABRADOR V, STOLTZ JF.

Molecular mechanisms and probability of leukocyte adhesion in shear flow.

Russian Journal of Biomechanics, 1999, 3: 15-23.

LABRADOR V, LEGRAND S, MULLER S, CARL P, SENGER B, VOEGEL JC, **LATGER-CANNARD V**, STOLTZ JF.

Modelisation of leukocyte adhesion on a fibrinogen coated surface in static conditions.

Clin Hemorheol and Microcircul, 1999, 21: 375-382.

LABRADOR V, LEGRAND S, MULLER S, CARL P, SENGER B, VOEGEL JC, **LATGER V**, RIHA P, STOLTZ JF.

Adhésion des leucocytes sur une surface recouverte de fibrinogène en conditions statiques : expérience et modélisation.

J Mal Vascul, 2000, 25 : 47-52.

GIGANT C, **LATGER-CANNARD V**, BENSOUSSAN D, FEUGIER P, STOLTZ JF.  
Quantitative expression of adhesion molecules on G-CSF mobilized peripheral blood, bone marrow and cord blood CD34+ cells.  
J Hemato Stem Cell Res, 2001, 10: 807-14.

GIGANT C, **LATGER-CANNARD V**, BENSOUSSAN D, FEUGIER P, STOLTZ JF.  
Expression quantitative des récepteurs d'adhérence VLA-4, L-sélectine, CD11b/CD18 et ICAM-1 à la surface des cellules CD34+: Etude de leur fonctionnalité au cours de la greffe de cellules souches.  
Revue Française de Transfusion, 2001, 8: 453-59.

GIGANT C, **LATGER-CANNARD V**, BENSOUSSAN D, FEUGIER P, BORDIGONI P., STOLTZ J.F.  
CD34+ cells homing : Quantitative expression of adhesion molecules and adhesion of CD34+ cells to endothelial cells exposed to shear stress.  
Biorheology, 2003, 40, 189-195.

#### PARTICIPATION A DES OUVRAGES

DUMAS D, MULLER S, PADILLA JJ, **LATGER-CANNARD V**, WOODARD S, CARRE MC, BLONDEL W, BAROS F, VIRIOT ML, STOLTZ JF.  
New trends in optical bioengineering : applications to cell biology.  
In : Recent Research Developments in Optical Engineering. Pandelai SG Ed. 1999, 2 : 295-315.

STOLTZ JF, VIRIOT ML, DUMAS D, MULLER S, **LATGER-CANNARD V**, PADILLA JJ, WOODARD S, CARRE MC, BAROS F.  
New trends in optical methods applied to cell biology.  
In : Medical Diagnostic Techniques and Procedures. Ed by Singh M., Radhakrishnan S., Patil KM., Reddy MRS. Narosa Ed (New Dehli), 1999: 160-181.

**LATGER V**, DUMAS D, STOLTZ JF.  
Etude spatiale des récepteurs d'adhérence à la surface des polynucléaires neutrophiles avant et après stimulation par le TNF $\alpha$ .  
Images sélectionnées pour congrès ISAC 1999. - PURDUE Cytometry, ISAC Congress Edition, Purdue University Cytometry Laboratories.

**COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES DANS DES CONGRES et/ou  
COMPTES-RENDUS DE CONGRES**

**LATGER V**, HUMBERT JC, LECOMPTE T, STOLTZ JF.

Approche quantitative des molécules d'adhérence du polynucléaire neutrophile  
*Communication orale* : Société de Médecine de Nancy, 28 mai 1997, Nancy.

**LATGER V**, SCHOONEMAN F, CLAISE C, HUMBERT JC, LECOMPTE T, STOLTZ JF. ^

Activation des plaquettes au cours de la conservation : comparaison entre deux techniques de séparation.  
*Communication orale* : Société de Médecine de Nancy, 28 mai 1997, Nancy.

STOLTZ JF, MULLER S, WANG X, **LATGER V**, SUN S.

Hemorheology and endothelial cells.

*Communication orale* : 10<sup>ème</sup> European Conference on Clinical Haemorheology - Communication inaugurale, 29 juin-2 juillet 1997, Lisbonne.

*Compte Rendu* : Clinical Hemorheology and Microcirculation, 1997, 12, 19.

**LATGER V**, SCHOONEMAN F, CLAISE C, HUMBERT JC, STOLTZ JF.

Platelet quality evaluation during the storage : evaluation of two different concentrates.

*Communication orale* : 10<sup>ème</sup> European Conference on Clinical Haemorheology, 29 juin-2 juillet 1997, Lisbonne.

*Compte Rendu* : Clinical Hemorheology and Microcirculation, 1997, 12, 20.

SCHOONEMAN F, CLAISE C, **LATGER V**.

Platelet concentrate evaluation with Amicus blood cell separator.

*Communication affichée* : 11<sup>ème</sup> Congrès de la Société Européenne d'Hémaphérèse, 14-17 septembre 1997, Dijon.

DUMAS D, GOUIN F, **LATGER V**, VIRIOT ML, STOLTZ JF.

Evaluation of oxygen permeability of endothelial cells monolayer by time-resolved fluorescence microscopy.

*Communication affichée* : Congrès Association Française de Cytométrie, 8-10 octobre 1997, Marseille.

*Compte Rendu* : Analytical Cellular Pathology, 1997, 14, 144.

**LATGER V**, REGNAULT V, DUMAS D, MULLER S, HUMBERT JC, SCHOONEMAN JF., LECOMPTE T, STOLTZ JF.

*Communication affichée* : Quantimetry of neutrophil adhesion molecules in physiologic condition and after inflammatory stimuli incubation.

Congrès Association Française de Cytométrie, 8-10 octobre 1997, Marseille.

*Compte Rendu* : Analytical Cellular Pathology, 1997, 14, 144.

STOLTZ JF, **LATGER V**, MULLER S, WANG X.

Leukocyte-endothelium interactions.

*Communication affichée* : European Congress of Angiology 11<sup>th</sup> Meeting of the European Chapter, 23-26 octobre, 1997, Rome.

*Compte Rendu* : International Angiology, 1997, 16, 22.

MULLER S, WANG X, **LATGER V**, LEGRAND S, SUN S, STOLTZ JF.

Endothelial cells - Hemorheology and mecanotransduction.

*Communication affichée* : European Congress of Angiology 11<sup>th</sup> Meeting of the European Chapter, 23-26 octobre, 1997, Rome.

*Compte Rendu* : International Angiology, 1997, 16, 22.

**LATGER V**, DUMAS D, REGNAULT V, SCHOONEMAN JF, HUMBERT JC, STOLTZ JF.

Importance de l'activation cellulaire dans la pathologie vasculaire.

*Communication orale* : Société de Médecine de Nancy, 4 mars 1998, Nancy.

**LATGER V**, LECOMPTE T, POTRON G, HUMBERT JC, STOLTZ JF.

Pathologie vasculaire et activation cellulaire.

*Communication orale* : XXXI<sup>e</sup> congrès du Collège Français de Pathologie Vasculaire, 18 mars 1998, Paris.

SUN R, **LATGER V**, LEGRAND S, ZHAO H, MULLER S, WANG X, STOLTZ JF.

Expression des ICAM-1 de cultures endothéliales (ECV 304) soumises à des contraintes de cisaillement in vitro.

*Communication orale* : Société de Médecine de Nancy, 27 mai 1998, Nancy.

**LATGER V**, REGNAULT V, DUMAS D, STOLTZ JF.

Quantimetry of neutrophil adhesion molecules : activation by inflammatory stimuli.

*Communication affichée* : 10th international symposium on Vascular Biology, 23-27 August 1998, Cairns, Australia.

MULLER S, LEGRAND S, WACHE P, DUMAS D, WANG X, **LATGER V**, STOLTZ JF.

Cytoskeleton, surface adhesion molecules and  $[Ca^{2+}]_i$  changes of endothelial cells in a vascular singulary pattern. An in vitro fluorescence microscopy study.

*Communication affichée* : 10th international symposium on Vascular Biology, 23-27 August 1998, Cairns, Australia.

SUN RJ, WANG X, **LATGER V**, MULLER S, DUMAS D, STOLTZ JF.

ICAM-1 expression of human endothelial cells ECV304 in laminar and disturbed flows.

*Communication affichée* : 20<sup>th</sup> European Conference on Microcirculation, 30 aout-2 septembre 1998, Paris.

*Compte rendu* : Journal of Vascular Research, 1998, 35, 63.



**LATGER V, DUMAS D, STOLTZ JF.**

Polymorphonuclear neutrophil adhesion molecules : spatial distribution and quantitative variation after stimulation (TNF $\alpha$ ).

*Communication orale et affichée* 5<sup>ème</sup> Congrès Association Française de Cytométrie, 6-9 octobre 1998, Toulouse.

*Compte rendu* : Analytical Cellular Pathology, 1998, 17, 19.

NGUYEN P, **LATGER-CANNARD V**, STOLTZ JF, BOISSEAU MR.

Diabète et leucocytes : études inter-laboratoires et perspectives d'application clinique. *Communication orale* : XXXIII<sup>e</sup> Congrès du Collège de Pathologie Vasculaire. 11-12 mars 1999, Paris.

LABRADOR V, MULLER S, N'NEGUE MA, WANG X, RIHA P, PAULUS F, **LATGER-CANNARD V, DUMAS D, STOLTZ JF.**

In vitro experimental approach of cell adhesion

*Communication orale* : International Conference on "Problems in fluid mechanics and hydrology", 23-26 juin 1999, Prague.

*Compte rendu* : Mechanics of fluids and disperse systems, Rheology and Biomechanics, 1999 : 283-90.

DUMAS D, **LATGER V**, VIRIOT ML, STOLTZ JF.

Permeability oxygen through endothelium by time-resolved fluorescence microscopy : influence of plasma viscosity on tissue hypoxia.

*Communication affichée* : Microscopy and Microanalysis'99, 1-5 août 1999, Portland.

*Compte rendu* : Microscopy and Microanalysis, 1999, 5 : 1106.

DUMAS D, **LATGER V**, STOLTZ JF.

Biological relevancy of quantitative analysis of adherence receptors on polymorphonuclear neutrophil by flow cytometry and optical scanning microscopy.

*Communication affichée* : Microscopy and Microanalysis'99, 1-5 août 1999, Portland.

*Compte rendu* : Microscopy and Microanalysis, 1999, 5 : 1122-1123.

GIGANT C, **LATGER-CANNARD V**, BENSOUSSAN D, DUMAS D, FEUILLER P, BORDIGONI P, STOLTZ JF.

Quantification of adhesion molecules on haematopoietic CD34+ cells.

*Communication affichée* : 6<sup>ème</sup> Congrès Association Française de Cytométrie, 12-15 octobre 1999, Dijon.

*Compte rendu* : Analytical Cellular Pathology, 1999, 18,141.

TOUSSAINT M, **LATGER-CANNARD V**, MENU P, STOLTZ JF, LECOMPTE T, VIGNERON C.

*Communication affichée* : In vitro effects of hemoglobin based oxygen carriers on adherence receptors quantitative expression on polymorphonuclear cells.

6<sup>ème</sup> Congrès de l'Association Française de Cytométrie, 12-15 octobre 1999, Dijon.

*Compte rendu* : Analytical Cellular Pathology, 1999, 18 (3),145.

**LATGER-CANNARD V**, BESSON I, DOCO-LECOMPTE T, CANTON P, LECOMPTE T.

Interest of CD11b expression on polymorphonuclear cells as a significant marker of sepsis. *Communication affichée* : Congrès de la Société Française d'Hématologie, 12-14 mars 2000, Paris.

*Compte rendu* : Hématologie, 2000, 6, 161.

GIGANT C, **LATGER-CANNARD V**, BENSOUSSAN D, BORDIGONI P, STOLTZ JF. Hétérogénéité de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des cellules CD34+ de moelle osseuse, sang de cordon et sang périphérique.

*Communication affichée* : Congrès de la Société Française d'Hématologie, 12-14 mars 2000, Paris.

*Compte rendu* : Hématologie, 2000, 6, 136.

TOUSSAINT M, **LATGER-CANNARD V**, MENU P, LECOMPTE T, STOLTZ JF, VIGNERON JC.

Effet in vitro de 3 transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine sur l'activation du polynucléaire neutrophile et des plaquettes.

*Communication affichée* : Congrès de la Société Française d'Hématologie, 12-14 mars 2000, Paris.

*Compte rendu* : Hématologie, 2000, 6, 40.

BOISSEAU MR, STOLTZ JF, DUMAS D, **LATGER-CANNARD V**, NGUYEN P, POTRON G.

White cell adhesion to the vascular endothelial cells: current data for a comprehensive understanding.

*Communication orale* : 11<sup>th</sup> European Conference on Clinical Hemorheology, 20-22 septembre 2000, Rouen.

*Compte rendu* : Journal des Maladies Vasculaires, 2000, 25, 139.

GIGANT C, **LATGER-CANNARD V**, BENSOUSSAN D, BORDIGONI P, STOLTZ JF. Quantitative expression of adhesion molecules on CD34+ cells.

*Communication orale* : 11<sup>th</sup> European Conference on Clinical Hemorheology, 20-22 septembre 2000, Rouen.

*Compte rendu* : Journal des Maladies Vasculaires, 2000, 25, 151.

RIHA P, DUMAS D, **LATGER-CANNARD V**, MULLER S, LABRADOR V, STOLTZ JF.

The force-dependent regulation of leukocyte adhesiveness by clusters of surface receptors.

*Communication orale* : 11<sup>th</sup> European Conference on Clinical Hemorheology, 20-22 septembre 2000, Rouen.

*Compte rendu* : Journal des Maladies Vasculaires, 2000, 25, 152.

BENSOUSSAN D, **LATGER-CANNARD V**, GREGOIRE MJ, FEUGIER P, ANDRE-BOTTE C, CARRET AS, STOLTZ JF, BORDIGONI P.

Peripheral blood mononuclear cells transplantation in complete DiGeorge syndrome.  
*Communication affichée* : IXth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 5-8 novembre 2000, Jerusalem, Israel.

*Compte rendu* : Blood, 96, 11 : 3810.

RIHA P, DUMAS D, LATGER V, MULLER S, LABRADOR V, STOLTZ JF.

Leukocyte rolling and adhesion to endothelium.

*Communication affichée* : 12st Conference of the European Society of Biomechanics, 2000, Dublin.

**LATGER-CANNARD V**, DUMAS D, BENSOUSSAN D, STOLTZ JF.

Spatial distribution of the  $\beta_2$  integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) adherence receptors on human neutrophils by Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM).

*Communication affichée* : Euromech420 : Mechanobiology of Cells and Tissues, Nancy, 24-26 avril 2001.

GIGANT C, **LATGER-CANNARD V**, BENSOUSSAN D, FEUGIER P, BORDIGONI P, STOLTZ JF.

Is the CD34+ cells homing like the multistep cascade adhesion of leukocyte ?

*Communication affichée* : Euromech420 : Mechanobiology of Cells and Tissues, Nancy, 24-26 avril 2001.

RIHA P, DUMAS D, **LATGER-CANNARD V**, MULLER S, STOLTZ JF.

Force dependent mechanism of leukocyte adhesion to vascular surface.

*Communication affichée* : Euromech420 : Mechanobiology of Cells and Tissues, 24-26 avril 2001, Nancy.

TOUSSAINT M, **LATGER-CANNARD V**, MENU P, LECOMPTE T, STOLTZ JF, VIGNERON JC.

Evaluation de l'effet de 3 transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine sur l'activation du polynucléaire neutrophile *in vitro* et *in vivo*.

*Communication affichée* : VII European Congress of the International Society of Blood Transfusion, 15-18 juillet 2001, Paris.

*Compte rendu* : Transfusion Clinique et Biologique, 2001, 8, 219.

## Liste des abréviations

ABC : "antibody binding capacity"  
ADP : adénosine diphosphate  
CLA : capacité liante de l'anticorps  
CMF : cytométrie en flux  
EDTA :éthylène diamine tétra acétique  
FITC : "fluorescein isothiocyanate" ou isothiocyanate de fluorescéine  
fMLP : N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine  
FSC : "forward scatter"  
GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
G/L : giga par litre  
GM-CSF : "granulocyte macrophage-colony stimulating factor"  
GMP-140 : "granule membrane protein-140"  
GP : glycoprotéine  
G6P : glucose-6-phosphate  
HEV : "high endothelial veinule"  
HTP : hypertension portale  
HUVEC : "human umbilical vein endothelial cell".  
ICAM: "intercellular adhesion molecule"  
IF: immunofluorescence  
Ig: immunoglobuline  
IgSF: superfamille des immunoglobulines  
IL-x : Interleukine x  
IMF : intensité moyenne de fluorescence  
INF $\gamma$  : Interféron  $\gamma$   
LAD syndrome : "Leucocyte Adherence Deficiency syndrome"  
LDL : " low density lipoprotein "  
Le<sup>x</sup> : Lewis<sup>x</sup>  
LFA : "lymphocyte functional antigen"  
LIF : "lymphocyte inhibitor fator"  
LPS : lipopolysaccharide

MCP : "monocyte chemotactic protein"  
MIDAS : "Metal ion-dependent adhesion site"  
MIP-1 $\beta$  : "macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ "  
NIF : "neutrophil inhibitor factor"  
NK: "natural killer"  
PAF: "platelet activating factor"  
PAGDEM : "platelet activation-dependent granule-external membrane protein"  
PC : "phosphatidylcholine"  
PCR : protéine C-réactive  
PE : phosphatidyléthanolamine  
PECAM: "platelet endothelial cell adhesion molecule"  
PMA : 4-phorbol 12-myristate 13-acétate  
PMT : photomultiplicateur  
PNN : polynucléaire neutrophile  
PS : phosphatidylsérine  
sLe<sup>x</sup> : sialyl-Lewis<sup>x</sup>  
SM : sphingomyéline  
SOD : superoxyde dismutase  
SSC : "side scatter"  
TGF $\beta$  : "transforming growth factor"  
TNF $\alpha$  : "tumor necrosis factor  $\alpha$ "  
VCAM: "vascular cell adhesion molecule"  
VHB : virus de l'hépatite B  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
VLA: "very late antigen"  
Vs : vitesse de sédimentation  
ZAS : sérum activé par le zymosan

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### PREMIERE PARTIE : LES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU LEUCOCYTE. STRUCTURE ET FONCTIONS : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

#### Figures.

- Figure n°I-1** : Schéma général de la structure des intégrines. 24
- Figure n°I-2** : Schéma général de la structure des sélectines. 29
- Figure n°I-3** : Schéma général de la structure des immunoglobulines. 35
- Figure n°I-4** : Les différentes phases de l'interaction du PNN avec la cellule endothéliale. 37
- Figure n°I-5** : Régulation de l'affinité et de l'avidité de CD11a/CD18 pour ses ligands. 41

#### Tableaux.

- Tableau n°I-1** : Les différentes intégrines de l'interaction PNN - cellule endothéliale. 24
- Tableau n°I-2** : Les différentes sélectines de l'interaction PNN - cellule endothéliale. 29
- Tableau n°I-3** : Les différentes immunoglobulines de l'interaction PNN - cellule endothéliale. 35
- Tableau n°I-4** : Les différents récepteurs d'adhérence et les principaux stimuli pro-inflammatoires impliqués dans l'interaction du PNN avec la cellule endothéliale, en fonction des étapes de migration. 37
- Tableau n°I-5** : Activités biologiques des  $\alpha$  chémokines. 52
- Tableau n°I-6** : Activités biologiques des  $\beta$  chémokines. 53

### DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE

#### Figures.

- Figure n°II-1** : Principe de la cytométrie quantitative pour la trousse Qifikit : le système appliqué aux billes reproduit l'échafaudage moléculaire du système de détection. 68

**Figure n°II-2** : Quantification de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN, à l'aide des billes de calibration. 73

**Figure n°II-3** : Représentation schématique du microscope à sectionnement optique à fluorescence équipé du système CELLScan™ 75

**Figure n°II-4** : Représentation de l'acquisition des images 2D en x et y selon l'axe z (pas minimum de 0,25 µm). 76

### Tableaux.

**Tableau n°II-1** : Les principaux calibrants utilisés en cytométrie en flux quantitative. 64

**Tableau n°II-2** : Caractéristiques et références des anticorps monoclonaux utilisés. 69

## **TROISIEME PARTIE : ETUDES FONDAMENTALES ET CLINIQUES - RESULTATS ET DISCUSSION**

### **Chapitre III-1 : EXPRESSION QUANTITATIVE ET DISTRIBUTION SPATIALE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN POUR DES TEMOINS SAINS EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET APRES STIMULATION**

Figures et tableaux situés au niveau des articles.

### **Chapitre III-2 : DEFICIT DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU PNN CHEZ UN PATIENT PRESENTANT UNE GLYCOGENOSE IB**

### Figures.

**Figure n°III-2-1**: Localisation des mutations de la chaîne  $\beta_2$  intégrine sur le chromosome 21q22.3, identifiées chez les patients atteints de LAD syndrome type 1. 85

**Figure n°III-2-2**: Métabolisme du fucose. 97

**Figure n°III-2-3**: Synthèse des antigènes de groupes sanguins H, A, B. 99

**Figure n°III-2-4** : Courbe staturale-pondérale de l'enfant atteint de glycogénose Ib après supplémentation appropriée en glucose. 107

**Figure n°III-2-5 :** 109  
A. Courbe d'évolution de la concentration en PNN avant tout traitement par facteurs de croissance.  
B. Effet des facteurs de croissance sur la numération des PNN.

**Figure n°III-2-6 :** Analyse du chimiotactisme des PNN. 114

**Figure n°III-2-7 :** Analyse de la phagocytose des PNN par CMF à l'aide de la trousse Phagotest (Orpegen Pharma, Becton Dickinson). 121

**Figure n°III-2-8:** Histogrammes de fluorescence de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN, chez notre patient atteint de glycogénose Ib, avant et après un an de traitement par facteurs de croissance, par rapport à un témoin sain. 125

**Figure n°III-2-9:** En faisant un parallélisme avec le "LAD" syndrome type II, la glycogénose-Ib est liée à une anomalie de transporteur microsomal du glucose-6-phosphate. 129

**Figure n°III-2-10:** La biosynthèse du dolichol pyrophosphoryl oligosaccharide des oligosaccharides N-liés nécessite la présence de trois résidus glucosés qui sont ajoutés au dolichol pyrophosphoryl oligosaccharide lorsque celui-ci est basculé à la face luminale du réticulum endoplasmique. Ceci nécessite la présence d'un transporteur du glucose. 130

### **Tableaux.**

**Tableau n°III-2-1 :** Manifestations clinico-biologiques des "LAD" syndromes. 103

**Tableau n°III-2-2:** Résultats de l'analyse des fonctions des PNN, chimiotactisme, phagocytose, métabolisme oxydatif, avant et après traitement par facteur de croissance, chez le patient atteint de glycogénose Ib. 124

**Tableau n°III-2-3:** Valeurs quantitatives (en CLA) de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN, chez notre patient atteint de glycogénose Ib, avant et après un an de traitement par facteurs de croissance, par rapport à un témoin sain. 126



### Chapitre III-3 : APPROCHE FONCTIONNELLE DE LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE DES MONOCYTES CHEZ LES SUJETS PRESENTANT UNE CIRRHOSE ALCOOLIQUE : QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE, ETUDE DU CHIMIOTACTISME ET EXPOSITION DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES

#### Figures.

**Figure n°III-3-1:** Composants lipidiques de la membrane plasmique. Le feuillet externe comporte surtout de la phosphatidylcholine, de la sphingomyéline tandis que le feuillet interne contient de la phosphatidyléthanolamine, de la phosphatidylsérine.

139

**Figure n°III-3-2 :** Les trois types de mouvement possibles pour les molécules phospholipidiques dans une double couche lipidique.

140

**Figure n°III-3-3 :** Le rôle du cholestérol dans les membranes cellulaires. [A] montre la structure du cholestérol. [B] montre l'adaptation des molécules phospholipidiques au sein de la double couche lipidique.

140

**Figure n°III-3-4 :** Régulation de l'asymétrie phospholipidique membranaire.

153

**Figure n°III-3-5 :** Analyse du chimiotactisme des monocytes.

162

**Figure n°III-3-6 :** Quantification des récepteurs d'adhérence à la surface des monocytes. Analyse par cytométrie en flux.

167

**Figure n°III-3-7:** Mesure de l'exposition des phospholipides anioniques à la surface des monocytes à l'aide de l'annexine V. Analyse par cytométrie en flux.

171

#### Tableaux.

**Tableau n°III-3-1:** Etude descriptive des patients inclus en fonction des critères du score de Child et Pugh.

173

**Tableau n°III-3-2:** Etude descriptive des patients inclus en fonction des complications infectieuses et hémorragiques et données de l'hémogramme.

174

**Tableau n°III-3-3:** Comparaison des résultats des tests des patients par rapport aux témoins. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type.

176

**Tableau n°III-3-4 :** Résultats des tests pour les patients en fonction de leur susceptibilité à présenter des complications infectieuses. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type.

177

**Tableau n°III-3-5 :** Résultats des tests pour les patients en fonction de leur susceptibilité à présenter des complications hémorragiques. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type.

178

**Tableau n°III-3-6** : Influence du TQ et de la numération plaquettaire sur la susceptibilité à présenter des complications hémorragiques. Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. 179

**Tableau n°III-3-7**: Comparaison de l'expression quantitative des récepteurs d'adhérence pour les PNN et les monocytes. Résultats exprimés en  $\times 10^3$  CLA/cellule. (NR: non réalisé). 184

**Chapitre III-4 : QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU PNN: UN MODELE D'ETUDE IN VITRO DE L'EFFET DES HEMOGLOBINES DE SYNTHESE SUR LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES**

Figures et tableaux sont situés au niveau de l'article.

**Chapitre III-5 : DEVELOPPEMENT D'UNE TROUSSE DE QUANTIFICATION DE CD11B A LA SURFACE DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES. APPLICATION A LA PATHOLOGIE INFECTIEUSE**

**Figures.**

**Figure n°III-5-1**: Méthodologie de la quantification de l'expression de CD11b à la surface des PNN par CMF, à l'aide de la trousse (WB-QFC, Biocytex). 203

**Figure n°III-5-2**: Influence des modalités de conservation de l'échantillon sanguin sur l'expression quantitative de CD11b à la surface des PNN, mesurée à l'aide de la trousse (WB-QFC, Biocytex). 204

**Figure n° III-5-3**: Influence de la concentration en PNN de l'échantillon sanguin sur l'expression quantitative de CD11b à la surface des PNN, mesurée à l'aide de la trousse (WB-QFC, Biocytex). 205

**Figure n° III-5-4**: Quantification de l'expression de CD11b à la surface des PNN, selon la trousse (WB-QFC, Biocytex), à l'aide de deux clones d'anticorps anti-CD11b différents. 206

**Figure n° III-5-5**: Comparaison des deux techniques de quantification antigénique indirecte, sans lavage (WB-QFC, Biocytex) et avec lavage (QIFI, Dako), pour l'expression de CD38 et de CD11b. 207

**Figure n°III-5-6**: Comparaison des valeurs de l'expression de CD11b pour des patients infectés par rapport à des témoins sains. 208

**Tableaux.**

**Tableau n° III-5-1**: Caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant une pathologie infectieuse et expression quantitative de CD11b à la surface des PNN (trousse WB-QFC, Biocytex). 209

## INTRODUCTION GENERALE

## Introduction générale

Le leucocyte circule à travers tout l'organisme afin d'assurer une fonction de surveillance immunologique. En réponse à tout antigène étranger, il migre rapidement en direction du foyer infectieux et y exerce ses pouvoirs de phagocytose : c'est la réaction inflammatoire. Cette extravasation des leucocytes et leur migration vers le site inflammatoire repose sur une activation leucocytaire suivie d'une adhésion des leucocytes à la barrière endothéliale selon un phénomène en cascade déterminé, organisé et localisé au niveau de sites préférentiels, à savoir les veinules post-capillaires, où le flux sanguin est lent. La première réaction, visible *in vivo*, est un roulement lent des leucocytes le long des parois vasculaires adjacentes au site inflammatoire. Puis une activation bidirectionnelle du leucocyte et de la cellule endothéliale va aboutir à un renforcement des forces de liaisons permettant la phase d'adhérence ferme. A la suite de cette interaction hétérotypique, le leucocyte entreprend sa phase de migration trans-endothéliale ou diapédèse et est attiré par des facteurs chimiotactiques vers le site de destruction de sa cible.

Cette interaction leucocyte-cellule endothéliale est réalisée par des récepteurs d'adhérence intervenant de façon spécifique et coordonnée pour chaque étape. Ainsi, durant la phase de roulement lent, la L-sélectine leucocytaire interagit avec les sialomucines endothéliales et les E- et P-sélectines endothéliales interagissent avec les sialomucines leucocytaires. L'activation leucocytaire implique d'une part, un clivage protéolytique de la partie-extracellulaire de la L-sélectine, lui faisant perdre son activité fonctionnelle, ce qui permet de réduire le recrutement leucocytaire et de limiter ainsi l'emballement de cette réaction cellulaire. D'autre part, cette activation agit au niveau des  $\beta_2$  intégrines, avec une augmentation de leur expression membranaire consécutive à la mobilisation du compartiment intracellulaire et une redistribution de ces molécules en "clusters" au sein de la bicouche lipidique aboutissant à une augmentation de leurs avidité et affinité pour leurs ligands endothéliaux. Le leucocyte peut donc renforcer son interaction avec la cellule endothéliale et assurer la phase d'adhérence ferme.

Ainsi, la fonctionnalité du leucocyte durant cette adhésion hétérotypique repose sur des variations quantitatives et spatiales des récepteurs d'adhérence.

Le but de ce travail a été d'explorer *in vitro* le comportement de ces récepteurs d'adhérence par deux approches méthodologiques différentes, permettant de mettre en évidence, à la fois, les changements d'ordre quantitatif et les redistributions spatiales s'opérant lors de l'activation leucocytaire. Pour évaluer les variations quantitatives, nous avons mis au point la méthodologie de la cytométrie en flux quantitative, appliquée à la mesure du niveau d'expression de ces récepteurs membranaires. Nous montrerons que, si la cytométrie en flux est certes une technique bien établie, l'apport récent de la quantification à l'aide de billes de calibration, permet une meilleure standardisation et par conséquent reproductibilité des mesures de densité antigénique. L'utilisation de la microscopie à sectionnement optique de fluorescence 3D nous a permis d'appréhender les redistributions de ces récepteurs. Cette technique récente permet de contourner les problèmes liés à l'utilisation de la microscopie confocale, qui était habituellement usitée jusqu'à présent pour l'exploration ultrastructurale de ces antigènes.

Cette étude a été, dans un premier temps, réalisée pour des leucocytes provenant de sujets sains, afin d'obtenir des valeurs de référence. Puis, dans un second temps, nous avons appliqué la méthodologie de cytométrie en flux quantitative à des domaines pathologiques impliquant aussi bien des défauts d'expression de ces récepteurs d'adhérence que des états d'hyperexpression, correspondant à un état d'activation leucocytaire.

Ce mémoire se présente en trois parties.

Dans la première partie, nous présenterons une étude bibliographique sur l'interaction du leucocyte à la cellule endothéliale. Nous détaillerons les différentes molécules impliquées dans cette interaction, à savoir, les intégrines et en particulier les  $\beta_2$  intégrines, les sélectines et la superfamille des immunoglobulines. Puis, nous exposerons les différentes étapes de cette interaction leucocyte-barrière endothéliale, en précisant le rôle et le comportement des différents récepteurs d'adhérence dans l'organisation de la réponse inflammatoire. Nous rappellerons également les différents médiateurs solubles activateurs et inhibiteurs intervenant au cours de cette réaction.

Dans la deuxième partie, nous aborderons les méthodologies mises en œuvre pour d'une part, préparer les suspensions cellulaires et, d'autre part, explorer les récepteurs d'adhérence. Nous présenterons la cytométrie en flux quantitative, en exposant son principe et ses intérêts techniques et cliniques, les différents calibrants disponibles, et la méthodologie choisie et usitée dans notre travail. La microscopie à sectionnement optique de fluorescence 3D sera détaillée dans son fonctionnement, ainsi que ses avantages par rapport à la microscopie confocale. Le protocole d'étude spatiale des récepteurs d'adhérence sera présenté.

Ensuite, munis de ces outils, nous appliquerons ces techniques à l'exploration des récepteurs d'adhérence à la surface de leucocytes de sujets témoins et pathologiques. Ceci constituera la troisième partie "Etudes fondamentales et cliniques – Résultats et Discussion" qui concerne les résultats observés pour les sujets témoins et pour les différents domaines d'application clinique.

Nous présenterons, dans le premier chapitre, les valeurs de référence déterminées par cytométrie quantitative pour l'expression des récepteurs d'adhérence pour des sujets témoins, à l'état basal et après stimulation des leucocytes par un agoniste fort de la réaction inflammatoire, soit le  $TNF\alpha$ . Nous étudierons l'influence du mode de préparation cellulaire ce qui permettra d'aborder l'ensemble des paramètres pré-analytiques pouvant influencer sur cette mesure. Les résultats concernant les variations de distribution spatiale, à l'état basal et après stimulation, seront également présentés.

Nous aborderons, dans le second chapitre, la pathologie déficitaire en récepteurs d'adhérence, en faisant un rappel bibliographique sur les déficits constitutionnels en récepteurs d'adhérence. Puis, nous rapporterons notre expérience d'un cas de patient atteint de glyco-génose Ib présentant un déficit portant à la fois sur la sélectine CD62L et sur les  $\beta_2$  intégrines, ce déficit étant régressif après traitement par facteur de croissance. Nous présenterons l'implication de ce résultat, à notre connaissance jamais rapporté dans la littérature, dans la compréhension de la pathogénie de cette maladie.

Le troisième chapitre présentera un travail, résultant d'une collaboration avec le service d'Hépatogastro-entérologie, et dont le but est d'explorer par des tests fonctionnels, les variations de fluidité membranaire observées pour des monocytes de patients atteints de cirrhose alcoolique. Nous expliquerons le choix de nos tests, en particulier celui de la mesure quantitative de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface de ces cellules. Les autres tests étant le chimiotactisme et l'exposition des phospholipides membranaires.

Le quatrième chapitre présentera une étude sur l'évaluation de l'effet de transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobines modifiées sur le comportement *in vitro* des PNN et en particulier sur leur état d'activation. Ayant précédemment montré que le niveau d'expression des récepteurs d'adhérence leucocytaires était directement fonction de leur état d'activation, nous avons donc utilisé l'outil cytométrie quantitative développé dans ce mémoire pour étudier le comportement des polynucléaires neutrophiles en présence de substituts d'hémoglobine.

Enfin, fort de cette expérience clinique, le cinquième chapitre sera consacré à la mise au point d'une trousse de quantification de l'expression de CD11b, afin de disposer d'un outil totalement standardisé et reproductible de la mesure de ce récepteur. Les résultats concernant l'application de cette méthodologie à la pathologie infectieuse seront présentés. L'intérêt de cette trousse dans le domaine de la néonatalogie sera abordé.

Ces études seront suivies d'une conclusion générale sur ce travail et d'une présentation des perspectives d'application de la cytométrie quantitative et de l'analyse 3D par sectionnement optique dans d'autres domaines d'applications cliniques.

**PREMIERE PARTIE**

**LES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU LEUCOCYTE -  
STRUCTURE ET FONCTIONS :  
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**



**PREMIÈRE PARTIE :**  
**LES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU LEUCOCYTE. STRUCTURE ET**  
**FONCTIONS : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

**I- LES RECEPTEURS D'ADHERENCE IMPLIQUES DANS L'INTERACTION POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE/CELLULES ENDOTHELIALES**

Cette interaction hétérotypique du PNN à la cellule endothéliale se fait par l'intermédiaire des récepteurs d'adhérence. Ces molécules sont des protéines trans-membranaires appartenant à trois familles différentes qui sont bien identifiées dans la littérature (Carlos TM, 1994).

**I-1- LES INTEGRINES**

Ce sont des glycoprotéines trans-membranaires hétérodimériques, formées de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , présentes à la surface des leucocytes et intervenant dans l'adhésion ferme entre PNN et cellule endothéliale (Hynes RO, 1992). Elles sont en communication avec les protéines du cytosquelette et communiquent avec des signaux d'origine extra-cellulaire.

**I-1-A- Structure générale des intégrines (figure n°I-1)**

Il s'agit d'une famille de glycoprotéines membranaires hétérodimériques, formées de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  liées de façon non covalente (Arnaout A, 1990).

Le nom de la sous-famille est donnée par la chaîne la plus conservée, soit la chaîne  $\beta$ . Une chaîne  $\beta$  peut s'associer avec différentes chaînes  $\alpha$  ; il a été démontré récemment qu'il en était de même pour une chaîne  $\alpha$ .

Les chaînes  $\alpha$  partagent des caractéristiques structurales communes :

- elles possèdent 7 régions répétitives de 60 acides aminés présentant des homologies de séquence avec les domaines "EF-hand" de la calmoduline et troponine ; trois de ces régions sont des domaines cation-dépendant, le cation différant entre les diverses intégrines : magnésium pour  $\alpha_L\beta_2$  (CD11a/CD18) et  $\alpha_2\beta_1$  (VLA-2) et calcium pour  $\alpha_2\beta_1$  (VLA-5) ;

- ces régions en tandem sont séparées par des zones de 180 acides aminés, riches en résidus cystéines et sites de glycosylation ;
- la partie intracytoplasmique possède une région conservée KXGFFKR, en liaison avec la calréticuline et qui semble jouer un rôle dans la régulation de l'avidité des intégrines.

La chaîne  $\beta$  a aussi des caractéristiques communes :

- elle possède des régions répétitives riches en résidus cystéines, qui paraissent fondamentales pour la conservation de la structure tertiaire de la molécule ; cette observation repose sur le fait qu'une désorganisation de ces séquences, consécutive à des mutations ponctuelles, entraîne une absence d'expression des  $\beta_2$  intégrines leucocytaires ("Leukocyte adherence syndrome" (LAD) de type 1) (Cf. Chapitre III, deuxième étude) ;
- la partie intracytoplasmique semble aussi jouer un rôle dans la régulation de l'avidité des intégrines.

Dans cette grande famille, seuls cinq membres font parti des récepteurs d'adhérence impliqués dans l'interaction PNN à la cellule endothéliale : les  $\beta_2$  intégrines leucocytaires (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18) et la  $\beta_1$  intégrine VLA-4.

### **I-1-B- $\beta_2$ intégrines : intégrines leucocytaires (chaîne $\beta$ =CD18)**

■ Classification : le nom de la sous-famille est donné par la chaîne  $\beta_2$ . Les sous unités  $\alpha$  sont CD11a (lymphocyte function-associated-1 ou LFA-1), CD11b (Mac-1, Mo-1), CD11c (p150,95) (*tableau n°I-1*).

■ Distribution cellulaire : l'expression est limitée aux leucocytes mais varie en fonction des sous populations leucocytaires ; les lymphocytes circulants expriment principalement les CD11a/CD18 alors que les PNN, monocytes et cellules "natural killer" (NK) expriment les trois types de  $\beta_2$  intégrines.

■ Stockage intracellulaire : il existe un compartiment intracellulaire pour CD11b/CD18 et CD11c/CD18 au niveau des PNN et monocytes mais non pour CD11a/CD18.

■ Ligands : la plupart des intégrines se lient à plusieurs ligands mais chaque hétérodimère possède une spécificité pour son ligand. Les ligands peuvent être soit des molécules de la super-famille des immunoglobulines (ICAM-1, ICAM-2), soit des protéines de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, fibrinogène, laminine, collagène, vitronectine, thrombospondine, facteur X et facteur de Von Willebrand). Une même cellule peut varier l'expression de ses intégrines (facteurs cinétiques non encore connus), ce qui lui confère des capacités très versatiles d'adhésion et de migration.

■ Nature de l'interaction : se fait par des courtes séquences tripeptidiques (RGD) appelées adhésiotopes ; cette liaison calcium dépendante entraîne une phosphorylation de la région intra-cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$ , qui jouerait un rôle dans la modulation d'expression des intégrines à la surface cellulaire.

■ Régulations : l'activation cellulaire entraîne une augmentation de leur expression membranaire par translocation à la membrane plasmique à partir des granules intra-cytoplasmiques. Mais les intégrines ne deviennent fonctionnelles qu'après stimulation cellulaire par un phénomène nommé dans la littérature anglo-saxonne par "integrin activation" ou "inside-out signaling" (Hughes PE, 1998). Ce processus implique à la fois des changements conformationnels et/ou des phénomènes de regroupement ("clustering") des intégrines. Des protéines du cytosquelette ainsi que des molécules impliquées dans la transduction intracellulaire interagissent directement ou indirectement avec le domaine intracytoplasmique des intégrines contribuant à la modulation d'avidité de ces récepteurs. Ainsi, les intégrines des leucocytes circulants ont une faible avidité pour leurs ligands endothéliaux ; à la suite d'une activation appropriée, leur avidité augmente ce qui entraîne la fixation à leur récepteur. Ce phénomène de modulation de l'avidité permet aux leucocytes de circuler librement dans le flux sanguin circulant, et d'acquérir un phénotype adhérent aux cellules endothéliales pour intervenir au site inflammatoire.

En plus de leur fonction adhésive, les intégrines peuvent moduler le comportement cellulaire en transmettant des signaux de l'extérieur à l'intérieur de la

cellule par un processus nommé "outside-in signaling" (Diamond MS, 1994 ; Dedhar S, 1996).

- Agonistes : l'expression membranaire de CD11b-c/CD18 est augmentée par le N-fMLP (N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine), le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor), le C5a, le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), le flux calcique intracellulaire et les leucotriènes LTB4.
- Fonctions : interviennent dans l'adhérence intercellulaire ainsi qu'entre cellules (cytosquelette) et matrice extra-cellulaire (protéines comme la fibronectine, la vitronectine ou la laminine) ; ce récepteur est aussi capable de transmettre une signalisation intra-cellulaire à la source de certaines divisions cellulaires (activation des FAK-kinases).
- Rôles : inflammation, réponse immunitaire, agrégation plaquettaire, migration cellulaire et dissémination tumorale.

#### **I-1-C- $\beta_1$ intégrine : VLA-4 (chaîne $\beta$ =CD49d/CD29) (tableau n° I-1)**

- Classification : le nom de la sous-famille est donnée par la chaîne  $\beta_1$  (CD29).
- Distribution cellulaire : sur toutes les cellules hématopoïétiques sauf les PNN.
- Ligand : ces molécules sont des récepteurs pour de nombreuses protéines de la matrice extra-cellulaire comme la fibronectine, le collagène, la thrombospondine, la laminine ou la vitronectine et pour des molécules exprimées par les cellules endothéliales comme la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), membre de la super-famille des immunoglobulines.
- Fonction : adhésion des lymphocytes, monocytes et polynucléaires éosinophiles aux cellules endothéliales activées.

## LES INTEGRINES

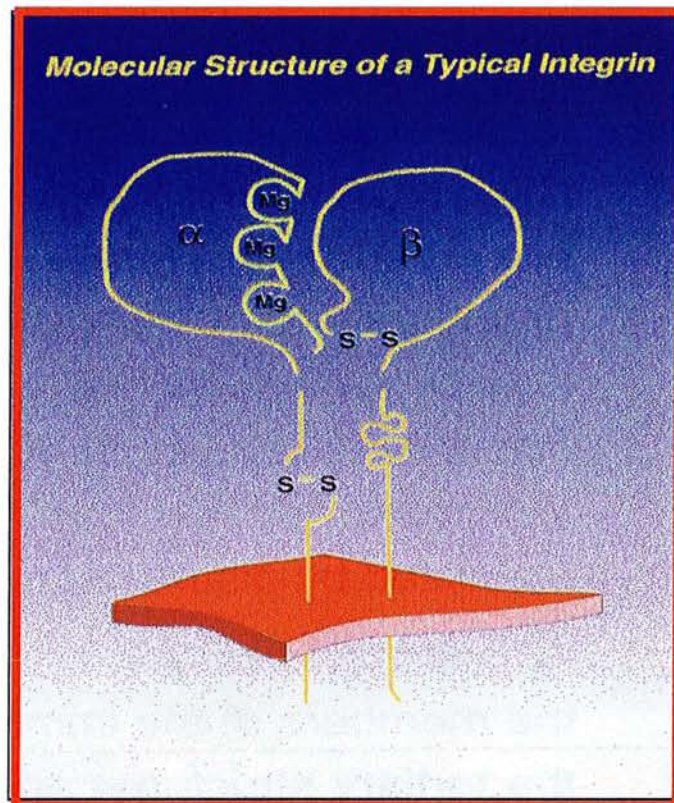


Figure n°I-1 : Schéma général de la structure des intégrines.

| Intégrines impliquées dans l'interaction leucocyte - cellule endothéliale                 |  |   |
|---|--|---|
| <b>Sous famille des <math>\beta_2</math> intégrines</b>                                   |  |   |
| Molécule  | Distribution cellulaire  | Ligand  |
| <b>CD11a/CD18</b><br>LFA-1<br>(Leucocyte Function Antigen)<br>$\alpha_L\beta_2$ intégrine | neutrophiles, lymphocytes,<br>monocytes, macrophages                                   | CD54 (ICAM-1)<br>CD102(ICAM-2)<br>CD50 (ICAM-3) |
| <b>CD11b/CD18</b><br>Mac-1<br>$\alpha_M\beta_2$ intégrine                                 | granulocytes, lymphocytes,<br>monocytes, macrophages,<br>cellules "natural killer"(NK) | ICAM-1<br>C3bi<br>facteur X, fibrinogène        |
| <b>CD11c/CD18</b><br>p150,95<br>$\alpha_X\beta_2$ intégrine                               | granulocytes,<br>monocytes, macrophages,<br>lymphocytes activés,<br>cellules NK        | C3bi<br>fibrinogène                             |
| <b>Sous famille des <math>\beta_1</math> intégrines</b>                                   |  |   |
| <b>CD49d/CD29</b><br>VLA-4<br>$\alpha_4\beta_1$   | lymphocyte, monocyte,<br>éosinophile, basophile,<br>cellules NK.<br>Absent sur PNN     | VCAM-1<br>fibronectine<br>thrombospondine       |

Tableau n°I-1 : Les différentes intégrines de l'interaction PNN - cellule endothéliale. (LFA-1 : lymphocyte function-associated-1 ; ICAM : intercellular adhesion molecule ; VCAM : vascular cell adhesion molecule ; VLA : very late antigen).

## I-2- LES SELECTINES

Ce sont des glycoprotéines présentes sur les leucocytes et les cellules endothéliales, intervenant dans la phase initiale de la reconnaissance PNN-cellule endothéliale.

■ Structure : comprend plusieurs domaines (*figure n° I-2*) :

- un domaine lectine N-terminal très conservé, impliqué dans la liaison au ligand osidique, calcium dépendante ;
- un domaine homologue à la séquence répétitive de "l'epidermal growth factor" (EGF) facteur de croissance épidermique ;
- un domaine regroupant un nombre variable de séquences répétitives analogues à celles des protéines régulatrices du complément (CRP : "complement regulatory proteins") ;
- une région trans-membranaire ;
- un court domaine intra-cytoplasmique COOH-terminal.

Le poids moléculaire de la L-sélectine varie en fonction du sous type de leucocyte, 75 kDa pour les lymphocytes, 95-105 kDa pour les PNN, 110 kDa pour les monocytes ; ces variations s'expliquent par un phénomène de glycosylation post-transductionnelle.

■ Classification : est établie en fonction de leur distribution cellulaire (*tableau n° I-2*).

A ce jour, trois membres sont décrits : la L-sélectine, L pour leucocyte (CD62 L) ; la E-sélectine, E pour endothélial (CD62 E) et la P-sélectine, P pour plaquette (CD62 P).

■ Localisation chromosomique : chromosome 1

■ Distribution cellulaire :

- L-sélectine : uniquement présente à la surface des leucocytes (Ley K, 1991).
- E-sélectine : restreinte aux cellules endothéliales activées.

- P-sélectine : elle est stockée au niveau des granules  $\alpha$  des plaquettes et des corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Après une activation appropriée, la P-sélectine est exprimée à la surface membranaire.
- Ligand : les sélectines interagissent par leur domaine lectine avec des sialomucines, c'est-à-dire des oligosaccharides de type Sialyl Lewis<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>) ou Sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) (antigènes de groupes sanguins) portés par des molécules de type mucine (c'est-à-dire une région riche en résidus séryl/thréonyl avec de nombreuses chaînes carbohydratées).  
Ces ligands sont trouvés aussi bien à la surface des leucocytes que des cellules endothéliales (Mc Gregor JL, 1995).
- Type de l'interaction : la liaison, calcium dépendante, s'établit entre le domaine lectine et le sucre ; le carbohydrate du ligand peut être porté aussi bien par une glycoprotéine qu'un glycolipide. Les sélectines ne reconnaissent pas un récepteur spécifique mais un sucre déterminé.
- Régulation :
- L-sélectine : l'expression membranaire est très sensible à l'activation cellulaire ; il a été observé une augmentation rapide de l'avidité de la molécule pour son ligand (quelques minutes), suivie d'une perte toute aussi rapide (Spertini O, 1991).  
L'activation des leucocytes entraîne une perte de la L-sélectine de surface, par un phénomène de clivage protéolytique près de l'insertion membranaire ; on retrouve alors une forme soluble circulante de la L-sélectine (Jung TM, 1990).
  - E-sélectine : les cellules endothéliales en culture, stimulées par le TNF, l'IL-1 ou les lipopolysaccharides (LPS) expriment la E-sélectine dans un délai assez lent de 4-6 heures, ce qui correspond à une synthèse *de novo*. Le domaine intracellulaire contient de nombreux résidus thyrosine qui sont connus pour participer au phénomène d'internalisation d'autres protéines, ce qui pourrait expliquer la courte demi-vie de la E-sélectine à la surface membranaire.

Cependant des études *in vivo* ont mis en évidence une expression membranaire persistante durant 24 heures, suggérant que d'autres facteurs déterminent la durée de cette expression.

- P-sélectine : contenue dans les granules alpha des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, elle est rapidement exprimée à la surface cellulaire, à la suite d'interactions avec les leucocytes : les granules intracytoplasmiques fusionnent avec la membrane cellulaire, ce qui leur permet ainsi d'externaliser leur contenu.

Les stimuli qui induisent une expression rapide de P-sélectine sur les cellules endothéliales sont la thrombine, le leucotriène C4 (LTC4) et l'histamine.

Le TNF $\alpha$  est capable d'induire l'expression à la fois de E-sélectine et de P-sélectine avec la même cinétique. Cela suggère que la P-sélectine doit être exprimée selon deux mécanismes : une sécrétion rapide des molécules stockées dans les granules alpha et une expression lente, consécutive à l'activation par les cytokines, de molécules néo-synthétisées. En effet, l'expression membranaire de la P-sélectine a été retrouvée initialement rapide (au bout de 10 min après stimulation) et transitoire (20 à 30 min) ; le caractère éphémère de cette expression est attribué à un phénomène d'internalisation secondaire de la protéine. Des études récentes ont mis en évidence une expression membranaire prolongée de plusieurs heures qui serait consécutive, soit à une synthèse *de novo*, soit à une diminution du phénomène d'internalisation.

#### ■ Forme soluble :

- La forme soluble de la E-sélectine est connue comme facteur chimiotactique des PNN en augmentant l'adhésivité de CD11b/CD18 (Lo SK, 1991).
- La forme soluble circulante de la L-sélectine a été trouvée à un taux de 1,6  $\mu\text{g/mL}$  dans le plasma de sujets sains. Il a été démontré qu'elle pouvait, à cette concentration, inhiber l'adhésion des leucocytes à l'endothélium activé ; il se peut donc qu'elle régule l'interaction PNN-cellule endothéliale durant l'inflammation (Schleiffenbaum B, 1992).
- La forme soluble circulante de P-sélectine a été mesurée dans le plasma de sujets sains à 0,15-0,30  $\mu\text{g/mL}$  ; cependant elle peut avoir une origine double,



plaquettaire et endothéliale. Elle interviendrait également dans la régulation de l'adhésion du PNN au niveau de la P-sélectine exprimée par les cellules endothéliales.

- Rôles : adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales activées par les cytokines, phénomènes inflammatoires, processus de dissémination tumorale, adhésion des plaquettes aux PNN (Mc Gregor JL, 1995).

## LES SELECTINES

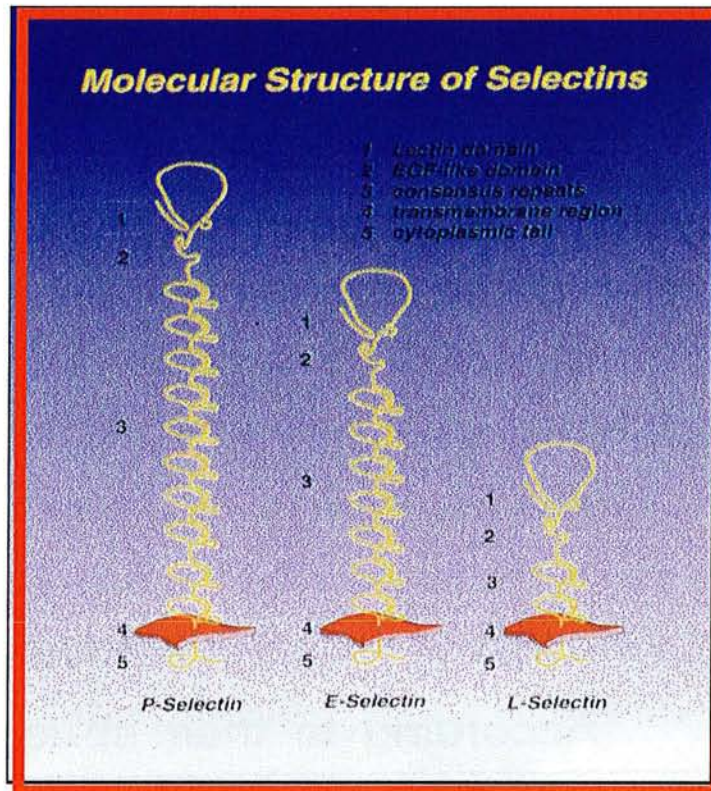


Figure n°1-2 : Schéma général de la structure des sélectines. (1 : domaine lectine ; 2 : domaine EGFlke ; 3 : séquence répétitive ; 4 : domaine transmembranaire ; 5 : extrémité cytoplasmique).

| Sélectines impliquées dans l'interaction leucocyte - cellule endothéliale |  |   |
|---|--|---|
| Molécule  | Distribution cellulaire  | Ligand  |
| <b>L-sélectine</b><br>CD62L<br>LAM-1, LECAM-1, Leu-8                      | tous les leucocytes (microvillosités membranaires)                         | HEV (glycoprotéines, fucosylées et sialylées)<br>Endothélium ( ?) |
| <b>E-sélectine</b><br>CD62E<br>ELAM-1, LACAM-2                            | restreinte aux cellules endothéliales activées (au site de l'inflammation) | sialyl Lewis <sup>x</sup>   |
| <b>P-sélectine</b><br>CD62<br>GMP-140, LECAM-3, PAGDEM                    | plaquettes (α-granules et membrane)<br>cellules endothéliales activées     |   |

Tableau n°1-2 : Les différentes sélectines de l'interaction PNN - cellule endothéliale. (NB : la E-sélectine est un exemple d'adressine, molécule des cellules endothéliales capables de se lier à des structures membranaires des leucocytes). (PAGDEM : platelet activation-dependent granule-external membrane protein ; GMP-140 : granule membrane protein-140 ; HEV : high endothelial veinule).

### I-3- LA SUPER-FAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES (IgSF)

Ce sont des glycoprotéines exprimées à la surface des cellules endothéliales, correspondant aux ligands des intégrines durant la phase d'adhésion ferme.

L'IgSF est la famille la plus abondante en molécules de surface, regroupant plus de 50% des glycoprotéines de surface des leucocytes.

- **Structure** : similaire à celle des immunoglobulines, elle est caractérisée par la présence de domaines répétitifs organisés en feuillets  $\beta$  stabilisés par des ponts disulfures, formant une zone globulaire hydrophobe très résistante à la protéolyse. (*figure n°I-3*)
  
- **Fonctions** : récepteurs de facteurs de croissance, d'Ig au niveau de la région Fc (fragment cristallisable) et molécule d'adhésion.
  
- **Classification** : cinq membres de cette famille, exprimés par les cellules endothéliales, participent au phénomène d'adhésion du leucocyte :
  - ICAM-1 (CD54) : Intercellular Adhesion Molecule-1
  - ICAM-2 (CD102) : Intercellular Adhesion Molecule-2
  - VCAM-1 (CD106) : Vascular Cell Adhesion molecule-1
  - PECAM-1 (CD31) : Platelet Endothelial Cell Adhesion molecule-1
  - MAdCAM-1 : Mucosal addressin Cell Adhesion molecule-1

### **I-3-A- ICAM-1 (CD54) : Intercellular Adhesion Molecule-1**

(Simmons D, 1988 ; Staunton DE, 1988)

- Localisation chromosomique : chromosome 19.
  
- Structure : possède une partie centrale protéique de 55 kDa avec cinq domaines Ig-like extra-cellulaires NH<sub>2</sub> terminaux, en tandem et nommés D1 à D5 ; le poids moléculaire varie de 76 à 114 kDa ce qui fait suggérer la présence de modifications post-traductionnelles. La région intra-cytoplasmique est une séquence de 28 acides-aminés, riche en lysine et arginine, en connexion avec les protéines du cytosquelette ( $\alpha$ -actinine) (*figure n°I-3*).
  
- Distribution cellulaire :
  - expression constitutive sur les cellules endothéliales
  - expression inductible sur les leucocytes (lymphocytes), cellules épithéliales, fibroblastes, cellules dendritiques et macrophages.
  
- Régulation : son expression constitutive sur les cellules endothéliales peut être stimulée par l'action de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4), de lipopolysaccharides bactériens, de radicaux libres ou de situation hypoxique (Michiels C, 1994).
  
- Ligand :  $\beta_2$  intégrines
  - CD11a/CD18 (LFA-1) à la surface des leucocytes par les deux domaines NH<sub>2</sub>-terminaux (Diamond MS, 1991).
  - CD11b/CD18 (Mac-1) à la surface des leucocytes par le troisième domaine.
  
- Forme soluble : ICAM-1 est trouvée sous forme soluble dans le sérum, résultant d'un clivage protéolytique à la surface cellulaire ; son taux est élevé chez des patients présentant un syndrome inflammatoire comme un choc septique, un cancer, ou après transplantation (Gearing AJH, 1992).

### I-3-B- ICAM-2 (CD102) : Intercellular Adhesion Molecule-2

(Staunton DE,1989)

- Localisation chromosomique : chromosome 17.
  
- Structure : forme tronquée de l'ICAM1, elle est composée d'une partie centrale protéique de 55 kDa et de deux domaines Ig like extra-cellulaires (ces deux domaines possèdent 34% d'homologie avec les deux domaines NH2-terminaux de l'ICAM-1). La partie intra-cytoplasmique n'est pas identique à celle d'ICAM-1 ce qui peut expliquer leur différence de signalisation intracellulaire (*figure n°1-3*).
  
- Distribution cellulaire : cellules endothéliales, leucocytes.
  
- Régulation :
  - expression constitutive sur les cellules endothéliales
  - son expression n'est pas augmentée par l'action de cytokines (Staunton DE, 1989).
  
- Ligand : ICAM-2 est le deuxième ligand de CD11a/CD18 (LFA-1) à la surface des leucocytes ; l'interaction se fait par les deux domaines (D1-D2) (Diamond MS,1991).

### I-3-C- VCAM-1 (CD106) : Vascular Cell Adhesion molecule-1

- Structure : poids moléculaire de 110 kDa, comprenant 6 ou 7 domaines extra-cellulaires (*figure n°I-3*).
  
- Distribution cellulaire :
  - expression constitutive à très faible densité sur les cellules endothéliales.
  - expression inductible sur les cellules endothéliales, cellules dendritiques et macrophages, fibroblastes médullaires, myéloblastes.
  - expression à la surface des cellules blastiques d'origine myéloïde et lymphoïde (B), en relation avec la gravité de la maladie ; cette molécule pourrait jouer un rôle dans l'extension des cellules malignes par leur adhésion aux différents tissus (Reuss-Borst MA, 1995).
  
- Ligands : VLA-4.
  
- Régulation : expression membranaire augmentée sous l'action de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) ou de LPS.

Il a été démontré que la cytokine IL-4, synthétisée par les lymphocytes T, stimule l'expression membranaire de VCAM-1 mais non d'ICAM-1 ou de sélectines endothéliales (Thornhill MH, 1990 ; Schleimer RP, 1992). La synthèse d'IL-4 par les lymphocytes au site inflammatoire permettrait un recrutement sélectif de leucocytes ; le ligand principal de VCAM-1 étant la  $\beta_1$  intégrine VLA-4 qui est exprimée sur l'ensemble des leucocytes excepté les neutrophiles.

Cela suggère un rôle de l'IL-4 dans l'évolution progressive de la réponse inflammatoire cellulaire avec remplacement au site inflammatoire, des polynucléaires neutrophiles, acteurs de l'inflammation aiguë, par des cellules mononucléées et des polynucléaires éosinophiles qui vont initier et entretenir la réponse inflammatoire chronique.

### I-3-D- PECAM-1 (CD31) : Platelet Endothelial Cell Adhesion molecule-1

- Structure : glycoprotéine de 130 kDa, comprenant 2 domaines extra-cellulaires ; la fraction glycosylée représente 40% du poids de la molécule.
  
- Distribution cellulaire :
  - plaquettes, cellules endothéliales et certains leucocytes ;
  - plus de 95% des monocytes et des PNN l'expriment contre seulement 50% pour les lymphocytes périphériques sanguins ;
  - parmi les lymphocytes T, 100% des cellules naïves et 50% des cellules T CD8+ sont CD31+, alors que seulement 20% des cellules T CD4+ expriment le CD31.
  
- Régulation :
  - expression constitutive à la surface des cellules endothéliales
  - il n'a pas été noté d'augmentation de son expression en présence de stimuli pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1 ou l'IFN $\gamma$ .
  
- Fonction :
  - rôle dans l'adhésion leucocytaire : cette hypothèse est suggérée par la similitude structurale de PECAM avec l'antigène carcino-embryonnaire et ICAM-1, deux protéines qui sont impliquées dans les interactions cellulaires homotypiques et hétérotypiques. Contrairement à l'ICAM-1 qui est exprimée sur toute la surface membranaire des cellules endothéliales, CD31 est localisée au niveau des jonctions intercellulaires (Albelda SM, 1991) ;
  - rôle dans l'activation leucocytaire : suggéré par sa similitude structurale avec le Fc $\gamma$ R (récepteur  $\gamma$  au fragment Fc des immunoglobulines) ;
  - rôle dans la transduction de signaux activateurs au niveau des leucocytes ;
  - il a été démontré que l'application, soit de CD31 soluble, soit d'anticorps monoclonaux anti-CD31, empêche *in vitro* la migration trans-endothéliale des PNN et monocytes mais non des lymphocytes. De même l'administration *in vivo* d'anticorps polyclonaux anti-CD31 bloque le recrutement de PNN observé lors de péritonites ou de rejet d'allogreffe de peau (Gorcinski RM, 1997).



## LA SUPER-FAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES

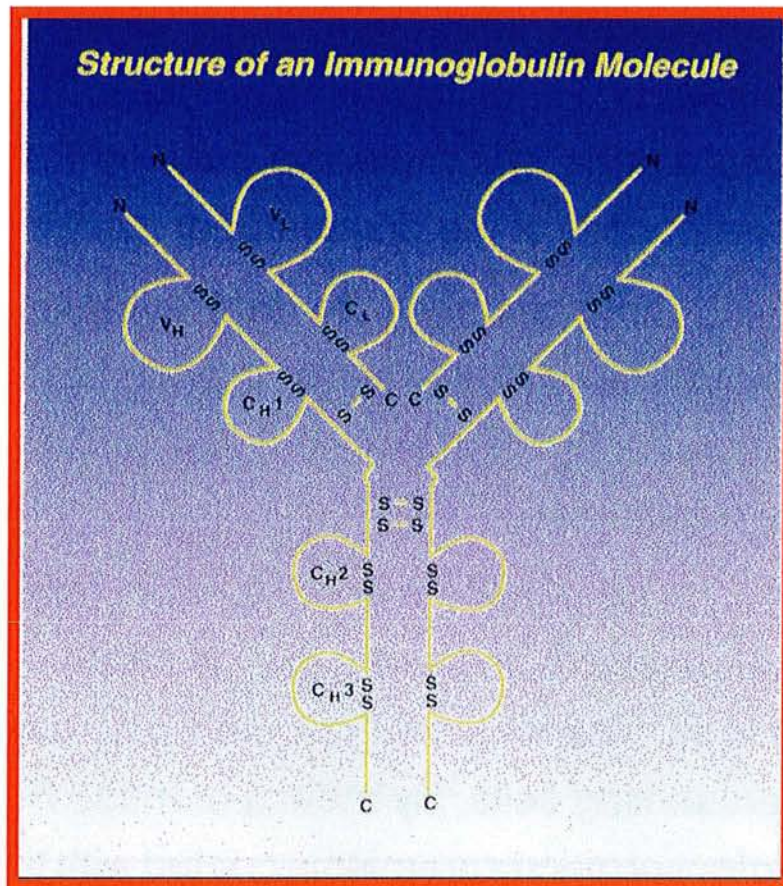


Figure n°1-3 : Schéma général de la structure des immunoglobulines.

| <b>Molécules de la superfamille des immunoglobulines impliquées dans l'interaction PNN - cellule endothéliale</b> |   |                          |
|---|---|--------------------------|
| Molécule  | Distribution cellulaire   | Ligand                   |
| CD54<br><b>ICAM-1</b>   | cellules endothéliales, leucocytes (lymphocytes), cellules épithéliales, fibroblastes et cellules dendritiques. | CD11a/CD18<br>CD11b/CD18 |
| CD102<br><b>ICAM-2</b>  | cellules endothéliales lymphocytes, cellules dendritiques   | CD11a/CD18               |
| CD50<br><b>ICAM-3</b>   | leucocytes<br>cellules dendritiques   | CD11a/CD18               |
| <b>VCAM-1</b>   | cellules endothéliales  | VLA-4 (CD49d/CD29)       |

Tableau n°1-3 : Les différentes immunoglobulines de l'interaction PNN - cellule endothéliale. (ICAM : intercellular adhesion molecule, VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule).



## II- "THE ADHESION CASCADE"

L'adhésion des leucocytes circulants à l'endothélium vasculaire est un processus dynamique, impliquant plusieurs étapes (Nourshargh S, 1995 ; Carlos TM, 1994 ; Smith CW, 1992).

Il existe une cinétique d'expression membranaire et d'intervention des différentes classes des récepteurs d'adhérence et il est décrit dans la littérature plusieurs séquences : après une lésion vasculaire, la vasoconstriction réflexe, suivie d'une vasodilatation, entraîne un ralentissement du courant circulatoire, ce qui va permettre l'interaction entre le PNN et la cellule endothéliale (*figure n°1-4 et tableau n°1-4*).

### II-1- PREMIERE ETAPE : LE ROULEMENT LENT DES LEUCOCYTES

Le contact du leucocyte à la paroi endothéliale est probablement un phénomène aléatoire, accru par certaines conditions anormales du flux sanguin. La première réaction visible *in vivo* est un **roulement lent des leucocytes** le long des parois vasculaires post-capillaires, adjacentes au site inflammatoire : c'est le phénomène de "**rolling**".

Ce roulement est seulement observé dans certaines conditions dynamiques de flux, et correspond à la résultante des forces de cisaillement appliquées par le flux sanguin sur le leucocyte et des forces d'adhésion hétérotypiques entre leucocyte et cellule endothéliale.

Il est à noter que ce roulement se fait préférentiellement au niveau des capillaires et surtout des veinules post-capillaires, cela pour des raisons hémorhéologiques et biodynamiques : à ce niveau les PNN sont refoulés à la périphérie de la lumière vasculaire par les globules rouges qui sont groupés au centre en forme de rouleaux ; cette répartition, associée au ralentissement circulatoire qui survient dans les veinules post-capillaires négative le bilan des forces qui propulsent les PNN et celles qui les rattachent aux cellules endothéliales.

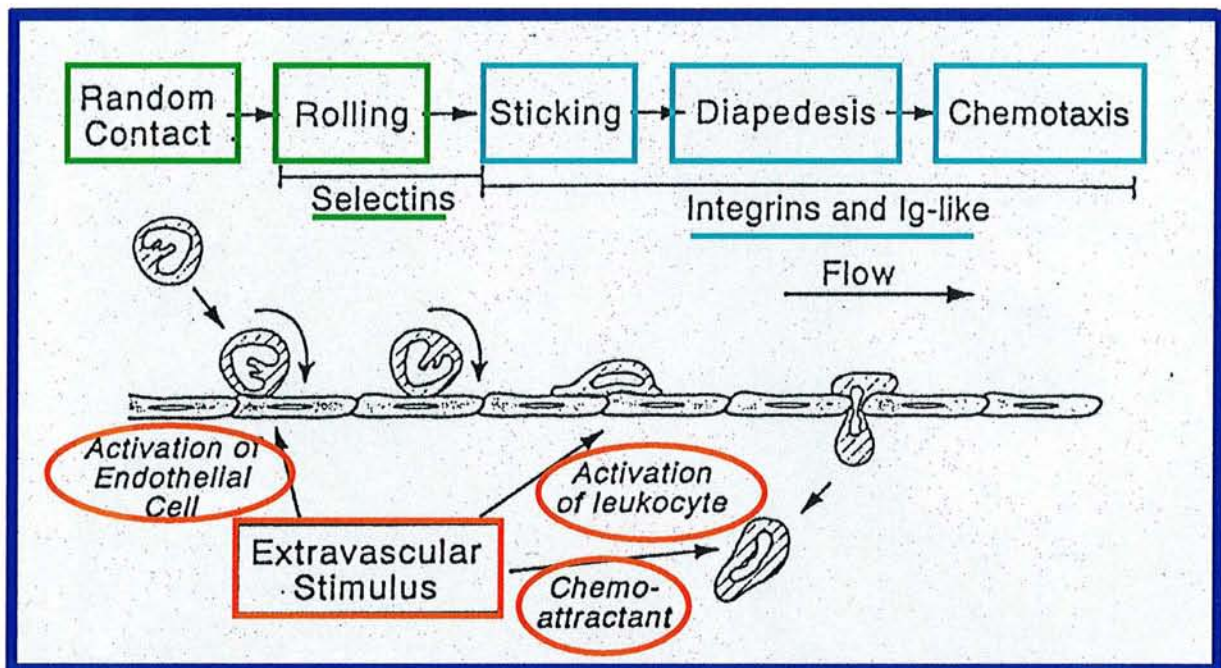


Figure n°1-4 : Les différentes phases de l'interaction du PNN avec la cellule endothéliale (d'après Carlos TM, 1994). Dans les conditions de flux, les PNN rentrent en contact de façon aléatoire avec l'endothélium veineux post-capillaire adjacent au site inflammatoire ; ils sont animés d'un mouvement de roulement lent le long de cette paroi. Des changements qualitatifs et quantitatifs des récepteurs d'adhérence, provoqués par des stimuli inflammatoires vont induire une adhésion ferme du PNN à la cellule endothéliale. Ainsi recruté, il pourra par diapédèse entre les cellules endothéliales, migrer vers sa cible, attiré par les facteurs chimiotactiques.

|                             | <b>Roulement ("Rolling")</b>  | <b>Activation cellulaire ("Activation")</b>  | <b>Adhésion ferme ("Sticking")</b>  | <b>Migration trans-endothéliale ("Diapedesis")</b>  |
|-----------------------------|---|--|---|---|
| <b>Leucocyte</b>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ L-sélectine</li> <li>♦ oligosaccharides type sialyl Lewis (sLe<sup>x</sup>) et fucosyl</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Cytokines et facteurs de croissance</li> </ul>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ <math>\beta_1</math> et <math>\beta_2</math> intégrines</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ <math>\beta_1</math> et <math>\beta_2</math> intégrines</li> </ul> |
| <b>Cellule endothéliale</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ P-sélectine</li> <li>♦ E-sélectine</li> <li>♦ oligosaccharides type sialyl Lewis (sLe<sup>x</sup>) et fucosyl (ligands de la L-sélectine)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Facteurs chimiotactiques</li> <li>♦ Chémokines</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ ICAM-1 et ICAM-2</li> <li>♦ VCAM-1</li> </ul>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ ICAM-1</li> <li>♦ VCAM-1</li> <li>♦ PCAM-1</li> </ul>              |

Tableau n°1-4 : Les différents récepteurs d'adhérence et les principaux stimuli pro-inflammatoires impliqués dans l'interaction du PNN avec la cellule endothéliale, en fonction des étapes de migration.

De plus, ce phénomène est beaucoup plus fréquemment observé au niveau de l'endothélium des veinules qu'au niveau de l'endothélium artériel ; des différences de pression du flux peuvent en être une explication. Cependant, si la pression artériolaire est diminuée de façon expérimentale, la fréquence de survenue du roulement est toujours prédominante au niveau veineux ; ce qui suggère une différence de répartition des molécules d'adhérence.

La libération de médiateurs solubles au niveau de la réaction inflammatoire entraîne une activation des cellules endothéliales, qui à leur tour, exprimeront les récepteurs d'adhérence nécessaires au recrutement spécifique des leucocytes.

Les molécules impliquées dans cette étape sont (Paulson JC, 1992) :

- ***L-sélectines leucocytaires / sialomucines endothéliales sialyl Lewis x (sLe<sup>x</sup> ; CD15s)***
- ***E- et P-sélectines endothéliales / sialomucines leucocytaires.***

Cette étape de roulement lent a pour but de freiner les leucocytes et de les mettre en contact avec les cytokines et facteurs chimiotactiques produits au niveau du foyer inflammatoire.

## II-2- DEUXIEME ETAPE : L'ACTIVATION CELLULAIRE

Il s'agit d'une **activation bidirectionnelle** du leucocyte et de la cellule endothéliale, consistant en une variation de l'expression des molécules d'intégrines leucocytaires et une expression *de novo* des molécules endothéliales, le tout aboutissant à une augmentation des forces des liaisons hétérotypiques. Cette activation permettra de passer d'un état d'adhérence "lâche" à un état d'adhérence "ferme".

Ce phénomène réversible est un prérequis indispensable pour l'étape ultérieure.

### II-2-A- Activation du PNN

Les PNN peuvent être activés par différents stimuli exprimés à la surface des cellules endothéliales ou en solution, générés alors au niveau du site inflammatoire. Des facteurs chimiotactiques (C5a, fMLP), des chémokines (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  : "macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ "), ou des cytokines (IL-5, GM-CSF) agissent sur les leucocytes en augmentant leur adhésion  $\beta$  intégrine dépendante. Ces médiateurs solubles proviennent de cellules de tissus agressés, de micro-organismes et même de cellules endothéliales (IL-8, PAF: "platelet activating factor", MIP-1 $\beta$ ).

La fonction des intégrines est liée à des signaux bidirectionnels, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule ("outside-in") et inversement ("inside-out"). L'activation cellulaire entraîne des variations du domaine cytoplasmique de l'intégrine, comme des phosphorylations, des polymérisations/dépolymérisations des fibres d'actine, activations de protéine kinase (signal "outside-in"). Ces événements intracellulaires vont en retour agir sur la partie extra-membranaire de l'intégrine en induisant des changements conformationnels (signal "inside-out"). Ce récepteur va ainsi transiter d'un état de faible affinité à celui de forte affinité pour son ligand afin d'assurer sa fonction d'adhésion ferme à son ligand endothélial.

Au niveau des intégrines leucocytaires, l'activation des PNN induit des changements rapides, en quelques minutes, qui peuvent être d'ordre qualitatif et/ou quantitatif :

- ♦ une augmentation rapide de l'expression membranaire des  $\beta_2$  intégrines (CD11b, CD11c) à la surface du PNN, pouvant atteindre dix fois la normale.

Cette augmentation est consécutive à la mobilisation du compartiment intracellulaire, par translocation des glycoprotéines contenues dans les granulations spécifiques (secteur de réserve) vers la membrane (Todd RF, 1984). Cependant cette régulation positive n'est ni suffisante, ni nécessaire à l'adhésion des PNN aux cellules endothéliales (Vedder NB, 1988).

- ♦ des variations qualitatives de l'avidité et de l'affinité des récepteurs jouent un rôle majeur dans l'adhésion du leucocyte à l'endothélium : les intégrines à la surface des leucocytes circulants sont à l'état normal inactifs et ont une faible avidité pour leur ligand endothélial ; une activation appropriée induit une augmentation de l'avidité des molécules d'intégrines pour leur ligand (Hynes RO, 1992).

Cette modulation d'avidité est un phénomène rapide (survenant en 5-10 minutes) et transitoire (30 minutes). Il est attribué à un changement conformationnel des molécules d'intégrines passant d'un état inactif à un état actif qui est alors capable d'interaction avec ses ligands.

Les autres mécanismes évoqués pour expliquer ces changements sont une augmentation de l'avidité et/ou affinité consécutive à des remaniements du cytosquelette entraînant une redistribution de ces molécules au sein de la bicouche lipidique (phénomène de "clustering" ou multimérisation). La *figure n°1-5* illustre les modifications d'affinité et d'avidité de la molécule CD11a/CD18 (Royer C, 1997). C'est une redistribution dynamique de l'actine par augmentation transitoire de la forme monomère, qui permettrait la reformation du récepteur et la reconnaissance de ses ligands.

Les intégrines qui sont devenues alors fonctionnelles, renforcent l'interaction en se liant aux ICAM endothéliales.

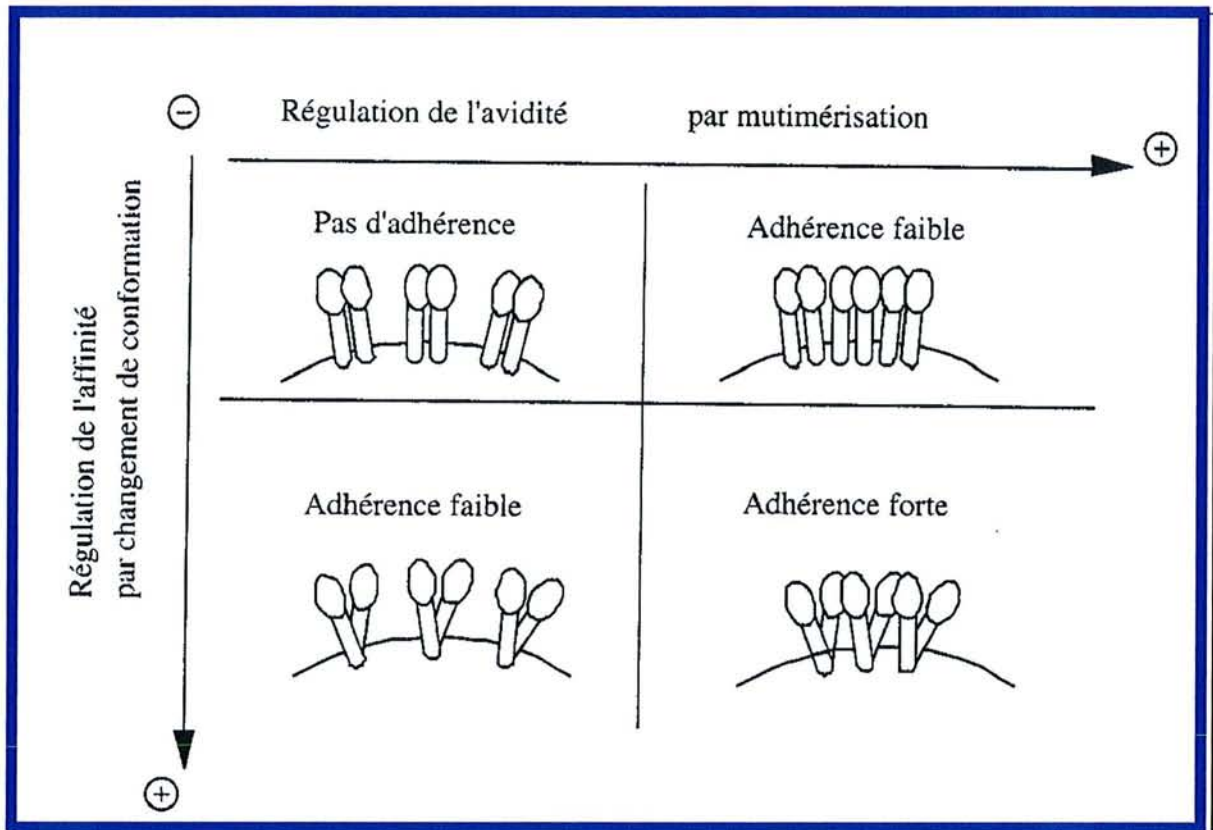


Figure n°I-5 : Régulation de l'affinité et de l'avidité de CD11a/CD18 pour ses ligands (d'après Royer C, 1997).

Parallèlement à cette variation des intégrines, une décroissance de la L-sélectine membranaire qui assurait une liaison faible avec les cellules endothéliales est notée. Cette variation est due à l'action d'une protéase endogène qui clive la partie extra-cellulaire. La signification fonctionnelle de la diminution d'expression membranaire de la L-sélectine semble être de réduire le recrutement leucocytaire et de limiter ainsi l'emballement de la réaction cellulaire.

Des variations qualitatives semblent exister également pour les sélectines mais n'ont pas été bien documentées.



## II-2-B- Activation des cellules endothéliales

■ Une autre voie aboutissant à la naissance des liaisons fortes est l'activation des cellules endothéliales, qui expriment alors de nouvelles protéines de l'adhérence. Deux formes d'activation des cellules endothéliales sont connues :

→ La première est celle qui se développe rapidement après stimulation des cellules endothéliales par de la thrombine ou de l'histamine.

Ces cellules expriment de manière constitutive l'ICAM-1 et ICAM-2 (super-famille des immunoglobulines). Après stimulation par la thrombine ou l'histamine, elles expriment en quelques minutes des E-sélectines et P-sélectines qui pourront se lier aux motifs sialyl Lewis<sup>x</sup> des PNN. Les cellules endothéliales stimulées libèrent aussi du PAF-acéther qui pourra se lier aux PNN ; cette coexpression conduit à une adhérence maximale.

→ La deuxième est celle qui survient tardivement après stimulation des cellules endothéliales par les lipopolysaccharides (LPS) ou des molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le "tumor necrosis factor" (TNF $\alpha$ ) ou l'interféron  $\gamma$ . Les cellules endothéliales synthétisent alors de l'IL-8 et expriment des E-sélectines en deux heures environ ; l'IL-8 se fixe sur les PNN marginés qu'elle active, et formera un gradient chimiotactique trans-endothélial qui participe au déplacement orienté de la diapédèse.

## II-3- TROISIEME ETAPE : L'ADHESION FERME

L'étape suivante consiste en une **adhérence ferme et définitive** consécutive aux changements conformationnels et/ou numériques des récepteurs d'adhérence CD18 et ICAM-1 : les leucocytes sont dits marginés.

L'interaction intégrines-ICAM, calcium dépendante, entraîne une phosphorylation de la région intra-cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  qui jouerait un rôle dans la modulation d'expression des intégrines à la surface cellulaire (Hibbs ML, 1991).

La modulation d'affinité de CD11b/CD18 serait régulée par la synthèse *de novo* du facteur lipidique IMF-1 (Integrin Modulating Factor-1) (Hermanowski-Vosatka A, 1992).

L'importance de CD18 dans l'adhésion du PNN a été mise en évidence dès 1988 (Smith CV, 1988) par l'utilisation d'anticorps bloquants anti-CD18 inhibant l'adhésion des leucocytes à des cellules endothéliales en culture.

#### **II-4- QUATRIEME ETAPE : MIGRATION TRANS-ENDOTHELIALE OU DIAPEDESE**

L'étape d'adhésion ferme déclenche une seconde activation du leucocyte et peut-être, de la cellule endothéliale, qui entraîne à son tour la migration irréversible des leucocytes hors des vaisseaux, à travers les jonctions endothéliales.

***C'est le phénomène de diapédèse ou de migration trans-endothéliale*** défini par le passage entre deux cellules endothéliales avec adhérence intercellulaire étroite et impliquant l'interaction entre les molécules d'adhésion suivantes (Lobb RR, 1992) :

- ***les intégrines leucocytaires et les ICAM-1 et PECAM-1 endothéliales (molécules de la super-famille des immunoglobulines),***
- ***les intégrines leucocytaires et les composants de la matrice extra-cellulaire.***

Cette étape nécessite une modulation de l'avidité des intégrines leucocytaires afin que le PNN puisse se déplacer sur la paroi endothéliale et rejoindre la matrice sous-endothéliale. Les molécules impliquées sont les mêmes que celles de la phase d'adhésion ferme, mais leur participation et leur cinétique d'intervention sont différentes (Luscinskas FW, 1991).

Ce phénomène de diapédèse existe de façon spontanée, à faible niveau pour les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et de manière plus importante pour les monocytes et lymphocytes. La stimulation des cellules endothéliales par l'IL-1 ou le



TNF- $\alpha$  a pour conséquence une augmentation de la migration trans-endothéliale des PNN, polynucléaires éosinophiles et monocytes. Cela souligne l'imbrication constante des médiateurs solubles et des récepteurs d'adhérence, au niveau de toutes les phases de l'interaction PNN-cellule endothéliale.

Il a été montré par des expériences d'inhibition, que le flux calcique peut également réguler la migration trans-endothéliale du PNN sans affecter la phase d'adhésion (Huang AJ, 1993). Le mécanisme suggéré est l'activation, par le flux calcique trans-endothélial, des cellules endothéliales qui ouvriraient leur jonction intercellulaire, ce qui permettrait le passage de leucocytes.

## II-5- ACTIVITE DES PNN AU NIVEAU DU SITE INFLAMMATOIRE

Les PNN recrutés peuvent alors migrer vers les tissus victimes d'agressions et à ce niveau exercer leurs activités tueuses et dégradatives sur les cibles qui les ont attirées : **phénomène de déplacement**. Leur puissante batterie d'enzymes lysosomiales (myéloperoxydase, élastase, protéinase, lactoferrine...), stockées dans les granules, leur permettra d'exercer leur pouvoir de phagocytose afin de dégrader les substances toxiques et les germes.

De plus ils amplifient la réponse inflammatoire en libérant des molécules qui vont induire le recrutement d'autres PNN.

Les PNN ont donc pour rôle, au niveau du site inflammatoire, d'éliminer les résidus bactériens, cellulaires et moléculaires mais aussi les PNN qui sont morts en assurant leurs fonctions.

Comme le fait remarquer Pardi, les leucocytes phagocytes sont les seules cellules somatiques nucléées qui, durant une grande partie de leur vie, expriment un phénotype non adhérent leur permettant de circuler librement dans le courant sanguin et qui changent l'expression de leurs récepteurs membranaires afin de devenir adhérents à l'endothélium et de se rendre au contact des particules étrangères (Pardi R, 1994). On note un parallélisme de mécanisme d'action avec la plaquette, symbolisant les interrelations entre réaction inflammatoire et coagulation.

## II-6- RECRUTEMENT DES LEUCOCYTES : ORGANISATION DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE

Ces multiples voies d'interaction et de modulation doivent être organisées pour conduire à une réponse immunologique coordonnée et efficace.

Des modèles expérimentaux de l'inflammation rendent compte de la cinétique d'intervention des différentes cellules inflammatoires. L'injection intra-dermique de LPS induit un afflux initial de PNN qui culmine au bout de quatre heures ; alors que l'intervention des cellules mononucléées s'étend de la 12<sup>ème</sup> heure post-injection à la 48<sup>ème</sup> heure.

De plus, la nature des cellules recrutées varie en fonction du type de la réaction immunitaire : un exemple démonstratif en est l'afflux de polynucléaires éosinophiles au niveau de sites extra-vasculaires, lors de la réaction allergique. La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une accumulation de lymphocytes T au niveau du tissu synovial.

Une des hypothèses pour expliquer le recrutement spécifique des sous-populations leucocytaires consiste en une expression des récepteurs d'adhérence combinée et spécifique, qui entraînerait l'adhésion préférentielle de certains leucocytes ; soit une forme de code déterminé par les cellules endothéliales, en réponse à des stimuli activateurs.

Ce mécanisme repose sur la spécificité de ligand des récepteurs d'adhérence : VCAM-1 se lie à des leucocytes mononucléés mais pas à des PNN, la E-sélectine se lie uniquement à des cellules phagocytaires et à des lymphocytes T mémoire, la P-sélectine se lie aux cellules phagocytaires, mais jamais aux lymphocytes B.

Les médiateurs solubles activateurs possèdent également leur spécificité d'action ; on distingue :

① les cytokines et médiateurs inflammatoires qui induisent l'expression membranaire des sélectines et de leur ligand : l'IL-1 et les TNF- $\alpha$  régulant les E-sélectine, P-sélectine et L-sélectine ;

② les cytokines qui induisent l'expression des ligands endothéliaux pour les intégrines leucocytaires : l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  régulant ICAM-1 et VCAM-1, l'IFN $\gamma$  régulant ICAM-1 et l'IL-4 régulant VCAM-1 ;

③ les facteurs chimiotactiques (C5a, fMLP), les chémokines (IL-8 pour PNN et lymphocytes, RANTES pour monocytes, polynucléaires éosinophiles et lymphocytes T mémoires, MCP-1 pour les monocytes), les médiateurs lipidiques (leucotriènes et PAF pour les cellules phagocytaires) et les cytokines (TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-3, IL-5) qui modulent l'expression des intégrines.

En conclusion, cette combinaison de mosaïque de récepteurs d'adhérence et de ce répertoire sélectif de médiateurs solubles est à la base de la communication intercellulaire leucocyte-cellule endothéliale.

## **II-7- LES AUTRES VOIES DE L'ADHESION PNN - CELLULE ENDOTHELIALE**

En plus de ces protéines et voies de l'adhérence inter-cellulaire précédemment définies, de nouvelles molécules sont découvertes conduisant à l'ébauche de nouvelles voies interactives :

**SAP-1 (Synovial Adhesion Protein-1)** : est exprimée par l'endothélium synovial, les ganglions lymphatiques périphériques mais est absente de l'endothélium des grands vaisseaux ; elle serait impliquée dans l'adhésion du lymphocyte à la cellule endothéliale.

**Le CD14** pourrait représenter un récepteur d'adhérence spécifique du monocyte ; en effet certains anticorps monoclonaux anti-CD14 inhibent l'adhésion du monocyte à la cellule endothéliale, et non celle du PNN. CD14 est une protéine glycosyl-phosphatidyl-inositol liée ; la nature du ligand endothélial n'est pas encore déterminée.

Dans certaines conditions de flux, les PNN peuvent adhérer aux cellules endothéliales activées via les **intégrines**  $\alpha_4\beta_1$ , ce qui constitue une voie alternative de recrutement des PNN lors de la réaction inflammatoire (Reinhardt PH, 1997).

**Le fibrinogène** est un ligand soluble pour CD11b/CD18. En 1993, Languino et al. (1993) démontrent que le fibrinogène facilite l'interaction PNN-cellule endothéliale en établissant des ponts entre les molécules de CD11b/CD18 portées par les leucocytes et les molécules d'ICAM-1 portées par les cellules endothéliales. Il a été trouvé à ICAM-1 une fonction de récepteur du fibrinogène. La signification de ce phénomène n'est pas connue.

Un an plus tard, Higazi et al. (1994) mettent en évidence un rôle inhibiteur du fibrinogène sur l'activation du PNN, en démontrant une régulation négative sur certaines activités chimiotactiques (C5a, IL-8) et sur leur consommation d'oxygène.

Nous voyons que le fibrinogène est à la croisée de nombreux systèmes biologiques, coagulation, inflammation, réponse immunitaire.

① Au niveau de la coagulation, il constitue la clef de voûte de l'hémostase par formation du caillot de fibrine (transformation du fibrinogène en fibrine par la thrombine) ; il est le point de départ de la cascade fibrinolytique par action de la plasmine.

② Il constitue une protéine majeure de la phase aiguë de l'inflammation.

③ Il intervient dans la réponse immunitaire en établissant des ponts entre PNN-cellule endothéliale et en inhibant l'activation du PNN.

Il apparaît que le fibrinogène joue un rôle régulateur de la réaction inflammatoire ; son taux augmente dès le début de l'inflammation ; il empêcherait l'interaction du PNN à la cellule endothéliale en formant des ponts séparateurs ; si ces deux verrous sont forcés, il reste un troisième mécanisme de modulation, à savoir l'inhibition de leur activation.

■ **L'adhésion entre plaquettes et PNN** est un événement clé de la thrombose et de l'inflammation.

L'adhésion des plaquettes aux PNN :

- est un phénomène rapide (maximum de réponse en une minute) et réversible ;
- requiert des ions calcium et magnésium ;
- est inhibée par des anticorps monoclonaux anti P-sélectine, anti-CD11b et anti-CD18.

Des plaquettes au repos n'adhèrent pas à des PNN non activés. L'adhésion de plaquettes non stimulées aux PNN activés par le fMLP est inhibée par des anticorps anti-CD18 mais non par des anticorps anti P-sélectine. Les auteurs proposent un schéma d'adhésion des plaquettes à la cellule endothéliale en deux temps : la première étape consisterait en une étape de reconnaissance cellulaire P-sélectine-dépendante ; la deuxième étape se poursuit par une activation de tyrosine kinase et une interaction  $\beta_2$  intégrine-dépendante. Le récepteur plaquettaire n'est pas encore identifié (Evangelista V, 1996).

De plus la P-sélectine exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales pourrait stimuler les leucocytes, provoquant l'expression par ces cellules de CD11/CD18, la production d'anions superoxydes, la synthèse de thrombospondine et d'un protéoglycane sulfaté (Mc Gregor JL, 1995). Des anticorps monoclonaux, des peptides cycliques et des molécules organiques de bas poids moléculaire, bloquant les fonctions de la P-sélectine pourraient jouer un rôle primordial en tant qu'agent thérapeutique dans l'inflammation aiguë et chronique.

### III- LES MEDIATEURS SOLUBLES DU DEPLACEMENT

#### III-1- LES MEDIATEURS ACTIVATEURS

L'accumulation de leucocytes *in vivo* est sous la dépendance de stimuli inflammatoires générés :

- par les cellules tissulaires : protéines du complément (C5a résultant de l'activation du complément) ;
- par les cellules inflammatoires : cytokines, PAF, LTB<sub>4</sub> ;
- par des micro-organismes : peptides formylés et LPS ;
- et même par les cellules endothéliales.

Les médiateurs de l'inflammation peuvent être fonctionnellement classés en trois catégories :

- les stimuli qui induisent sélectivement le recrutement de certains leucocytes comme C5a et LTB<sub>4</sub>,
- les stimuli qui rendent les leucocytes adhérents aux cellules endothéliales comme l'IL-1 et le TNF $\alpha$ ,
- les stimuli qui agissent indirectement en induisant la sécrétion d'autres médiateurs (l'IL-1 et le LPS induisent la synthèse d'IL-8 par les macrophages tissulaires, les fibroblastes et les cellules endothéliales).

En fait cette classification est artificielle et un médiateur appartient, le plus souvent, à plusieurs catégories.

Le mécanisme exact par lequel les médiateurs de l'inflammation provoquent une accumulation de leucocytes n'est pas encore complètement élucidé :

- certaines expériences *in vitro* ont mis en évidence la présence de récepteurs de haute affinité pour les facteurs chimiotactiques sur les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (Nourshargh S, 1995).
- d'autres études *in vitro* démontrent la présence de ces récepteurs sur les cellules endothéliales.

- l'hypothèse la plus retenue actuellement consiste en une présentation des facteurs chimiotactiques aux PNN, dans la lumière vasculaire via les récepteurs des cellules endothéliales.

Ces agents seront mentionnés par classe biochimique.

### **III-1-A- Les chimioattractants (Nourshargh S, 1995)**

Les chimioattractants ont été initialement reconnus par leur pouvoir d'induire une orientation et une cinétique du déplacement des PNN ; en leur présence, le PNN change de forme par réorientation des éléments du cytosquelette ; des expansions cytoplasmiques apparaissent au pôle cellulaire frontal (lamellipode) et au pôle opposé (uropode).

Ces molécules, qui possèdent chacune leur récepteur spécifique sur la membrane des PNN, ont, en fait, des effets qui dépassent largement le chimiotactisme. L'effet obtenu dépend de la concentration du chimioattractant et va de l'adhérence au déclenchement de leurs activités tueuses et dégradatives.

Les chimioattractants physiologiques les plus importants sont :

- + la fraction C5a du complément ;
- + le leucotriène B<sub>4</sub> (LBT<sub>4</sub>) résultant de la lipoxygénation de l'acide arachidonique ;
- + des produits provenant de bactéries en phase de multiplication. Ils possèdent une structure peptidique N-formylée. S'en approche un dérivé de synthèse très utilisé pour étudier l'activité chimiotactique et activatrice des PNN : le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP). Il a été démontré que son activité chimiotactique envers les PNN consiste en une augmentation de la migration trans-endothéliale des PNN, qui repose sur les récepteurs d'adhérence ICAM-1, CD11a/CD18 et CD11b/CD18 (Furie MB, 1991) ;
- + la thrombine, l'activateur tissulaire du plasminogène et du fibrinopeptide B, résultant de la transformation du fibrinogène en fibrine, ce qui laisse suggérer que les PNN peuvent participer au processus de coagulation (De Prost D, 1995).
- + le PAF-acether dérivé de la phosphatidylcholine.

### **III-1-B- Les chémokines (Adams DH, 1997)**

Récemment décrites, les chémokines peuvent se diviser en deux familles se distinguant sur des critères structuraux qui se traduisent par d'importantes différences au niveau des activités biologiques :

#### **III-1-B-①- Les chémokines $\alpha$**

Les chémokines  $\alpha$  agissent préférentiellement sur les polynucléaires neutrophiles. Le chef de file en est l'IL-8 ; les autres dont le NAP-2, la  $\beta$ -thromboglobuline sont mentionnées dans le *tableau n°1-5*. Leur structure se différencie des chémokines  $\beta$  par la présence d'un acide aminé entre les deux premiers résidus cystéines (famille C-X-C).

#### **III-1-B-②- Les chémokines $\beta$**

Les chémokines  $\beta$  agissent préférentiellement sur les cellules mononucléées. Le chef de file en est le MCP-1 ; les autres dont le RANTES et le MIP-1 sont mentionnées dans le *tableau n°1-6*. Leur structure se différencie des chémokines  $\alpha$ , par le fait que les deux premiers résidus cystéines sont adjacents (famille C-C).

Les chémokines, ainsi nommées par le fait qu'elles sont des cytokines connues initialement pour induire le chimiotactisme, ont en fait d'autres activités ; elles sont douées de capacités d'activation des cellules, d'angiogenèse, et de fonctions anti-microbiennes en particulier dans la réponse au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et jouent un rôle majeur dans la réponse inflammatoire.



| <b>α Chémokines</b>  |  |   |
|--|--|---|
| <b>Chémokine</b>   | <b>Cellule cible</b>   | <b>Activités biologiques<br/><i>in vitro</i></b>  |
| <b>Interleukine-8<br/>(IL-8)</b>                                   | Neutrophile<br><br>Lymphocyte T<br>Cellule NK (Natural Killer)<br>Cellule endothéliale | Activités chimiotactique,<br>d'adhésion,<br>de sécrétion des granules et<br>tueuse<br><br>Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique<br>Angiogenèse |
| <b>Interferon-<br/>inductible<br/>protein-10<br/>(IP-10)</b>       | Lymphocyte T<br>Cellule NK (Natural Killer)<br>Cellule endothéliale                    | Activités chimiotactique,<br>d'adhésion<br><br>Activités chimiotactique et<br>cytolytique<br><br>Inhibition de l'angiogenèse                                |
| <b>Granulocyte<br/>chemotactic<br/>protein-2<br/>(GCP-2)</b>       | Neutrophile  | Activité chimiotactique   |
| <b>Monokine<br/>induced by γ-<br/>interferon<br/>(HuMIG)</b>       | Monocyte<br>Lymphocyte T activé<br>Cellule NK  | Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique   |
| <b>Platelet factor-4</b>   | Monocyte<br>Neutrophile<br>Cellule endothéliale  | Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique<br>Inhibition de l'angiogenèse   |
| <b>Platelet basic<br/>proteins<br/>(CTAP III, β-TG,<br/>NAP-2)</b> | Neutrophile  | Activité chimiotactique   |

Tableau n°I-5 : Activités biologiques des α chémokines (d'après Adams DH, 1997).

| <b>β Chémokines</b>   |  |   |
|---|--|---|
| <b>Chémokine</b>  | <b>Cellule cible</b>                                       | <b>Activités biologiques<br/><i>in vitro</i></b>  |
| Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)                                | Monocyte<br><br>Lymphocyte T<br><br>Cellule souche         | Activités chimiotactique, d'adhésion, de sécrétion de superoxyde, de phagocytose et tueuse<br>Activités chimiotactique, sécrétion d'histamine<br>Inhibition de la formation de colonies (CFU-GM)              |
| Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2)                                | Monocyte<br>Lymphocyte T                                   | Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique  |
| Monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3)                                | Monocyte<br><br>Lymphocyte T<br>Cellule dendritique        | Activité chimiotactique et du métabolisme de l'acide arachidonique<br>Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique  |
| Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4)                                | Monocyte<br>Lymphocyte T                                   | Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique  |
| Macrophage inflammatory protein- 1α (MIP-1α)                          | Monocyte<br>Lymphocyte T<br><br>Lymphocyte B<br>Cellule NK | Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique, d'adhésion, sécrétion de collagénase, cytotoxicité tumorale<br>Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique, d'adhésion et de cytotoxicité tumorale |
| Macrophage inflammatory protein- 1β (MIP-1β)                          | Monocyte<br>Lymphocyte                                     | Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique, d'adhésion  |
| Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) | Monocyte<br>Lymphocyte<br>Cellule NK                       | Activité chimiotactique<br>Activité chimiotactique, d'adhésion<br>Activité chimiotactique   |

Tableau n°I-6 : Activités biologiques des β chémokines (d'après Adams DH, 1997).

### III-1-C- Les cytokines et facteurs de croissance

Les cytokines sont des facteurs solubles élaborés principalement par les cellules impliquées dans les réponses immunitaires, les réactions inflammatoires et allergiques (Cavaillon JM, 1996). Elles délivrent des signaux de communication intercellulaire, tantôt activateurs, tantôt inhibiteurs.

Les cytokines se distinguent des hormones par la grande diversité des cellules productrices et des cellules cibles, par leur mode d'action qui peut être autocrine, paracrine, voire endocrine ; de plus il existe une forte redondance de leurs activités, un même type pouvant être obtenu avec des cytokines différentes.

Ce sont des glycoprotéines de faible masse moléculaire (inférieure à 30 kDa), de structures et fonctions très hétérogènes mais obéissant à quelques grandes caractéristiques :

- elles sont produites très rapidement en réponse à un signal activateur ;
- leur production est fortement régulée ;
- elles agissent sur des récepteurs membranaires spécifiques et de haute affinité (de  $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  mol.L<sup>-1</sup>), de telle sorte qu'elles sont actives à très faible concentration.

On distingue plusieurs sous-groupes de cytokines (Ponvert C, 1995) :

- les interleukines, qui n'ont en commun que leur appellation, mais qui ne présentent aucune parenté biochimique, ni fonctionnelle ;
- les interférons qui regroupent des cytokines qui ont en commun une puissante activité antivirale, mais possèdent de nombreuses autres activités fonctionnelles ;
- les « colony-stimulating factors » (CSF) qui sont des facteurs directement impliqués dans l'hématopoïèse, mais qui peuvent aussi moduler les fonctions des cellules matures auxquelles ils ont donné naissance ;
- d'autres cytokines n'ont pas été regroupées en sous-groupes, et conservent leur nom, le plus souvent lié à la première fonction qui leur a été attribuée comme le MIF (facteur inhibant la migration des macrophages) ou le TNF (facteur de nécrose des tumeurs).

Les trois cytokines chefs d'orchestre de l'inflammation sont l'IL-1, le TNF et l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) ; d'autres cytokines comme l'IL-6 et l'IL-8 jouent aussi un rôle important dans la réaction inflammatoire.

### **III-1-C-①- Le TNF**

Il existe deux types de TNF, le TNF $\alpha$  et le TNF $\beta$  (anciennement appelé lymphotoxine). Leurs gènes ont été clonés et sont localisés dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), sur le chromosome 6 humain. Le TNF $\alpha$  est synthétisé par de nombreuses catégories de cellules (macrophages, lymphocytes T et B, cellules NK, PNN, cellules de Langerhans, kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales et musculaires lisses...).

Il existe également deux types de récepteurs pour le TNF, chacun d'entre eux fixant aussi bien le TNF $\alpha$  que le TNF $\beta$ . Ils sont exprimés de façon conjointe sur la plupart des cellules cibles du TNF. Des formes solubles de ces récepteurs ont été mises en évidence, dans l'urine, dans le plasma des cancéreux et des insuffisants rénaux, dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire d'adultes atteints de syndrome de détresse respiratoire et dans le liquide céphalo-rachidien des méningites. Ces récepteurs solubles fixent parfaitement bien le TNF et, à forte concentration, inhibent les activités biologiques de cette cytokine ; ils pourraient donc se comporter comme des antagonistes physiologiques du TNF. Toutefois, il est aussi probable qu'à des concentrations plus faibles, ils puissent protéger les molécules de TNF de la protéolyse et accroître leur demi-vie.

Le TNF a été initialement caractérisé par ses propriétés cytotoxiques sur les cellules tumorales. Mais il active également de nombreux types de cellules impliquées dans les réactions inflammatoires : il est l'un des principaux médiateurs de l'inflammation et du choc septique. Il entraîne une interaction du PNN à la cellule endothéliale, en stimulant à la fois la cellule endothéliale et le PNN. Son rôle dans les réponses immunitaires est manifeste dans la résistance aux infections microbiennes,

fungiques et parasitaires. Il agit aussi sur les cellules hématopoïétiques (il favorise la reconstitution hématopoïétique après irradiation ou chimiothérapie), et pourrait jouer un rôle dans l'embryogénèse.

### **III-1-C-②- L'interleukine 1 (IL-1)**

L'IL-1 est une protéine non glycosylée, dont la synthèse est codée par des gènes localisés sur le chromosome 2. Il existe en fait deux molécules d'IL-1, l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , qui représentent 25% d'homologie, et donc des propriétés biologiques comparables.

De nombreuses catégories de cellules peuvent produire de l'IL-1 : cellules macrophagiques, cellules dendritiques et cellules de Langerhans, lymphocytes B, cellules NK, cellules endothéliales.

L'IL-1 est connue avant tout pour son action immuno-stimulante (activation des lymphocytes T, induction de la prolifération lymphocytaire, accroissement de l'activité des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques). Mais elle se comporte aussi comme un puissant agent proinflammatoire, en augmentant l'adhérence des leucocytes à la paroi vasculaire : elle stimule la cellule endothéliale mais pas le polynucléaire neutrophile (Bevilacqua MP, 1985). Elle stimule de même les propriétés phagocytaires, sécrétoires et cytotoxiques des macrophages.

Des taux élevés d'IL-1 sont détectés dans de nombreux sites inflammatoires (parodontites, maladies rhumatismales, sarcoïdose pulmonaire, infections pulmonaires et méningites). Elle agit aussi sur les cellules hématopoïétiques primitives, dont elle prolonge la survie et accroît la prolifération.

### **III-1-C-③- L'interféron $\gamma$**

L'interféron  $\gamma$  (ou IFN de type II) est un dimère glycosé, dont le gène est localisé sur le chromosome 12 humain.

Il est essentiellement produit par les lymphocytes T (type Th1) mais aussi par les cellules NK.

En interagissant avec ses récepteurs spécifiques, il induit un certain nombre de signaux d'activation, à l'origine de ses propriétés biologiques :

- activité antivirale ; il confère aux cellules qui lui sont réceptives un état réfractaire aux infections virales. C'est une action spécifique d'espèce mais pas du virus inducteur ;
- activation des monocytes/macrophages en stimulant leurs propriétés phagocytaires, cytotoxiques et anti-infectieuses ;
- activation des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK ;
- à côté de ses propriétés immuno-stimulantes, il ne lui est pas connu d'action sur l'adhérence des PNN aux cellules endothéliales.

#### **III-1-C-④- Le granulocyte macrophage - colony stimulating factor (GM-CSF) endogène**

Le GM-CSF est particulièrement connu pour son action positive sur les progéniteurs hématopoïétiques mais possède également des effets sur les PNN ; il stimule leur activité phagocytaire, leur chimiotactisme, augmente l'adhérence cellulaire et l'expression des molécules d'adhésion.

#### **III-1-C-⑤- Actions synergiques**

L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  produits par les macrophages et de nombreuses autres cellules initient l'inflammation en provoquant une série de cascades de productions de médiateurs directement impliqués dans les processus inflammatoires (médiateurs lipidiques, radicaux libres, enzymes protéolytiques). Les cellules endothéliales, cibles privilégiées de ces cytokines, augmentent leur expression de molécules d'adhésion, et facilitent ainsi l'adhérence des cellules circulantes.

### III-2- LES MEDIATEURS INHIBITEURS

Trois mécanismes d'action ont été reconnus :

① Le premier comporte une inactivation de l'attractant. Dans le sérum humain normal existe un inactivateur des facteurs chimiotactiques dont la concentration peut être augmentée dans le sérum de certains malades.

② Le deuxième mécanisme implique une compétition entre l'inhibiteur et le facteur chimiotactique pour les récepteurs membranaires du PNN. Les anti-inflammatoires ont cet effet.

③ Le troisième groupe d'inhibiteurs agit directement sur le PNN, soit en bloquant sa reconnaissance des attractants, soit en interférant avec les systèmes de transmission des messages membranaires.

■ Le **“neutrophil immobilizing factor” (NIF)** est une glycoprotéine de 41 kDa, comprenant 274 acides aminés, découverte en 1994, par une équipe qui travaillait sur la recherche de nouveaux agents anti-inflammatoires en explorant les bases moléculaires qui soutiennent l'échappement immunitaire des parasites. Issue de l'ankylostome de chien (*Ancylostoma caninum*), elle est relarguée par les PNN au cours de la phagocytose et agit sur les PNN activés en empêchant leur adhésion endothéliale, CD11/CD18 dépendante et en inhibant la sécrétion de peroxyde d'hydrogène. Il a été par ailleurs trouvé un site de liaison de haute affinité du NIF pour les intégrines CD11b/CD18 mais le mécanisme d'action n'est pas encore déterminé. Cette nouvelle molécule pourrait appartenir à l'arsenal thérapeutique contre la réaction inflammatoire (Barnard JW, 1995).

**DEUXIEME PARTIE**

**MATERIEL ET METHODES**



## **DEUXIÈME PARTIE : MATERIEL ET METHODES**

Dans ce chapitre, nous présentons les méthodologies générales de nos travaux. Cependant certaines techniques et protocoles particuliers à chaque étude seront décrits dans le chapitre correspondant.

### **I- PRELEVEMENT DE SANG**

Le sang veineux est recueilli par ponction veineuse dans un tube contenant l'anticoagulant EDTA (éthylène diamine tétra acétique)-K3 (tube Vacutainer, Becton Dickinson), en respectant le volume de remplissage recommandé.

Pour établir les valeurs de référence de notre étude, nous avons sélectionné des donneurs volontaires sains adultes (entre 20 et 60 ans; âge moyen de 40 ans, sexe ratio = 1). L'interrogatoire associé à une exploration biologique ont permis d'éliminer la prise médicamenteuse (à l'exception des contraceptifs oestro-progestatifs), un syndrome inflammatoire ou infectieux (virus de l'hépatite B, virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus HTLV-1 (Human T Leukemia Virus-1), syphilis). L'échantillon est prélevé en début de don à vue transfusionnelle.

De façon générale, pour les témoins et pour les patients, le délai entre le prélèvement et l'analyse a été inférieur à 30 min afin de limiter toute activation artéfactuelle cellulaire *in vitro*.

### **II- ISOLEMENT DES PNN**

#### **II-1- PRINCIPE**

Les PNN sont séparés des autres cellules sanguines à l'aide d'un milieu de séparation, selon un gradient de densité par centrifugation.

#### **II-2- MATERIEL**

- Tubes coniques en polypropylène de 12,5 mL et 50 mL (Becton Dickinson).
- Centrifugeuse GR 4-12 (Jouan).
- Propipette automatique (Polylabo).
- Automate d'hématimétrie Technicon H2 (Bayer Diagnostic).

### II-3- REACTIFS

- Milieu de séparation Polymorphprep® (Nycomed Pharma) :
  - . Métrizoate de sodium 13,8% (P/V)
  - . Dextran 500 8,0% (P/V)
- Tampon PBS (Phosphate-buffered saline) glucosé 1mmol/L pH (25°C 7,4 ) :
  - . Chlorure de sodium anhydre (Prolabo) : 8 g
  - . Chlorure de potassium anhydre (Prolabo) : 0,2 g
  - . Hydrogénophosphate de sodium anhydre (Prolabo) : 1,15 g
  - . Dihydrogénophosphate de sodium anhydre (Prolabo) : 0,2 g
  - . D (+) Glucose (Prolabo) : 0,18 g
  - . Eau distillée : 1 litre
- Liquide de lavage : cell WASH (Becton Dickinson).

### II-4- MODE OPERATOIRE

- Les tubes de sang sont homogénéisés par retournements successifs, après avoir vérifié l'absence de caillot, et sont gardés à température ambiante (20- 24°C) ainsi que le milieu de séparation Polymorphprep.
- Préparation du gradient : dans un tube en polypropylène, le sang est déposé délicatement sur le milieu de séparation volume à volume, afin de respecter une interface nette entre les deux milieux. Tout mélange nuit à la bonne séparation des éléments cellulaires et est donc sanctionné par la répétition de cette étape dans des bonnes conditions.
- Procédure de séparation : centrifugation des tubes à 500 g, pendant 30 minutes à température ambiante.
- Récupération des PNN : après centrifugation, deux bandes sont visibles :
  - La bande supérieure à l'interface sang/Polymorphprep rassemble les cellules mononucléées.
  - La bande inférieure correspond aux leucocytes ; cette bande est aspirée à l'aide d'une propipette, et suspendue dans du cell WASH volume à volume, afin de rétablir une osmolarité normale.
- Après une nouvelle centrifugation, les PNN sont remis en suspension dans du PBS glucosé, pour comptage par un automate d'hématimétrie (comptage des cellules selon le principe de la diffraction de la lumière et analyse sous plusieurs angles).

### **III- QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN PAR CYTOMETRIE EN FLUX**

#### **III-1- INTRODUCTION SUR LA CYTOMETRIE QUANTITATIVE**

##### **III-1-A- PRINCIPE ET INTERET**

###### **PRINCIPE**

L'information quantimétrique est apportée par un étalon, permettant de transformer l'intensité moyenne de fluorescence (IMF), en nombre de "sites antigéniques par cellule", considéré comme équivalent au nombre de molécules d'anticorps fixées, en supposant une fixation monovalente de l'anticorps.

Ce calibrant se présente sous forme de billes de latex, simulant les cellules, recouvertes de quantités croissantes d'immunoglobulines de souris. Il permet, après marquage à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorochrome et analyse cytométrique, de tracer une droite d'étalonnage reliant l'IMF (unité arbitraire et relative) au nombre de molécules d'anticorps monoclonal fixées par cellule ou "Antibody Binding Capacity" (ABC) en terme anglo-saxon ou "Capacité liante de l'anticorps" (CLA). Ce nombre d'anticorps fixés à la surface de la cellule est directement proportionnel au nombre de sites antigéniques par cellule (unité absolue) (Schwartz A, 1993). C'est le concept de "phénotypage immunoquantitatif".

La calibration de ces billes a été réalisée, soit par technique de spectrofluorométrie (Le Bouteiller P, 1983 ; Oonishi T, 1985), soit par dosage radio-immunologique.

###### **INTERET TECHNIQUE**

L'analyse quantitative par cytométrie en flux est généralement exprimée en unité arbitraire représentée par l'intensité moyenne de fluorescence. Cependant, ces données manquent de standardisation du fait de la diversité des méthodes de préparation cellulaire de l'échantillon, de l'hétérogénéité des protocoles d'immunomarquage et de la grande variété de réactifs proposés par les fournisseurs.

Par conséquent, l'exploitation usuelle des mesures de fluorescence s'est limitée jusqu'à ces dernières années à la détermination de cellules "positives" ou "négatives" au sein d'une population cellulaire. Le seuil de positivité est arbitrairement fixé à  $10^1$  sur l'échelle logarithmique d'intensité de fluorescence comprenant quatre décades. Les paramètres des filtres sont arbitrairement réglés de

telle façon que l'auto-fluorescence de la population cellulaire analysée et le contrôle isotypique (cellules recouvertes d'immunoglobulines non spécifiques) soient situés dans la première décade, c'est-à-dire avant  $10^1$ . Nous voyons donc que la positivité de fluorescence est fixée par rapport à l'auto-fluorescence d'une population cellulaire, cette dernière variant pour chaque type cellulaire et conduisant à régler en conséquence, pour chaque population, analysée le gain du photomultiplicateur (PMT ; valeurs FL1, FL2, FL3). La quantification, en utilisant toujours la même valeur du PMT pour l'analyse des billes et des cellules, permet de rectifier cette cause de fluctuation.

L'utilisation de méthodes de quantimétrie permet :

- de définir de façon objective les limites de la positivité d'un immunomarquage,
- de garantir la reproductibilité et la sensibilité des résultats d'un jour à l'autre au sein d'un laboratoire et entre différents laboratoires,
- d'éviter l'expression des résultats en unités arbitraires,
- de disposer de valeurs de référence d'expression antigénique.

## **INTERET CLINIQUE**

L'intérêt général des techniques de quantimétrie a très bien été perçu, dès 1988, par G Stelzer qui énonçait : « la quantification des paramètres structuraux comme l'expression des antigènes de membrane amène des informations directement reliées à l'activité fonctionnelle des cellules analysées » (Stelzer G,1988).

La fonctionnalité d'une population cellulaire et son état de différenciation dépendent, non seulement du nombre d'éléments qui la composent, mais aussi du nombre de récepteurs portés individuellement par chaque cellule ; d'où la nécessité de quantifier ces récepteurs si l'on veut relier le phénotype à la fonction.

La quantification des données de la biologie cellulaire permet d'avoir une représentation de l'hétérogénéité d'expression des molécules, c'est-à-dire de discerner au sein d'un unique échantillon cellulaire, plusieurs populations (données en pourcentage) exprimant à des taux différents les molécules de surface étudiées : si certaines populations cellulaires montrent une distribution unimodale, d'autres peuvent montrer un profil plurimodal. Cette variation d'expression est à la base de la détection dans certaines maladies définies par un déficit quantitatif de molécules de

surface (Hémoglobinurie paroxystique nocturne, "Leucocyte Adherence Deficiency" syndrome, thrombasthénie de Glanzmann ou syndrome de Bernard-Soulier).

### **III-1-B- LES PRINCIPAUX CALIBRANTS UTILISES EN CYTOMETRIE QUANTITATIVE**

Pour répondre aux besoins de standardisation des mesures cytométriques, scientifiques et sociétés commerciales ont cherché à développer différents types de calibrants destinés à étalonner le signal fluorescent.

Ces calibrants se présentent sous forme de billes de latex dont les caractéristiques, avantages et limites, varient d'un système à l'autre, chacun étant optimisé pour répondre à un type de question (Dignat-George F., 1996).

Quatre systèmes qui permettent de couvrir des densités antigéniques allant de 2 à 5000  $10^3$  sites par cellule, sont actuellement disponibles (*tableau n°II-1*).


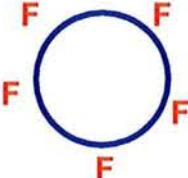
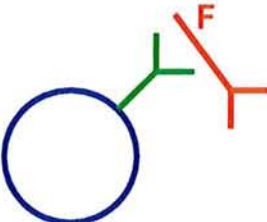
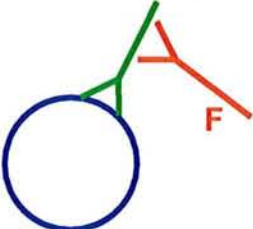
| Désignations<br>Origines          | Immuno-brite<br>(Coultronics®) ;<br>Sphero Rainbow<br>(Pharmigen®)                         | Quantum Beads<br>(Flow Cytometry<br>Standards<br>Corporation®)   | Quantum Simply<br>Cellular Microbeads<br>(Sigma®)   | Qifikit<br>(Dako®)   |
|-----------------------------------|--|--|---|--|
| Description<br>(F : fluorochrome) |           |                               |   |   |
| Caractéristiques<br>principales   | - Stabilité à long<br>terme<br>- Vérification des<br>performances<br>analytiques du<br>CMF | - Fluorochrome<br>identique à celui<br>pour révéler les<br>cellules<br>- Comparaison avec<br>cellules possible | - Immuno-fluorescence<br>directe<br>- Billes recouvertes<br>d'anticorps anti-Ig de<br>souris<br>- Billes et cellules sont<br>marquées parallèlement | - Immuno-<br>fluorescence indirecte<br>- Billes recouvertes<br>d'Ig de souris<br>- Billes introduites<br>pour Ac révélant. |
| Fluorochromes                     | Tous<br>(pour un même<br>type de billes)   | La majorité<br>(un type de billes<br>par fluorochrome)   | Tous<br>(fluorochrome porté par<br>l'Ac primaire)   | Tous<br>(fluorochrome porté<br>par l'Ac secondaire)  |
| Marquages<br>possibles            | IF directe<br>Multicouleur   | IF directe<br>Multicouleur   | IF directe<br>IF indirecte<br>Multicouleur  | IF indirecte<br>Multicouleur   |
| Anticorps<br>primaire             | Toutes espèces<br>tout isotype   | Toutes espèces<br>tout isotype   | Ac de souris  | Ac de souris<br>isotype IgG  |

Tableau n°II-1 : Les principaux calibrants utilisés en cytométrie en flux quantitative (d'après Dignat-George F, 1996) (IF : immunofluorescence ; Ac : anticorps ; CMF : cytométrie en flux).

### **III-1-B-①- Immuno-brite (Coultronics®) - Sphero Rainbow (Pharmigen®)**

#### **Principe**

Ce système utilise un fluorochrome noyé de façon hermétique dans la masse de latex ; ainsi n'est-il pas soumis aux influences de l'environnement (pH, fixation, conservation, stockage, température...) comme l'est celui fixé aux cellules.

Les billes sont calibrées en spectrofluorimétrie par comparaison à des solutions titrées de fluorochromes solubles d'où l'unité MESF (Molécule Equivalent Soluble Fluorochrome).

#### **Avantages – limites**

Ce système donne priorité à la vérification des performances analytiques des appareils. Ce type de billes est utilisé pour vérifier la stabilité et la linéarité du signal fluorescent dans le temps, paramètre utile pour détecter d'éventuelles dérives dans les performances du cytomètre.

Ce paramètre s'applique bien pour mesurer la fixation d'anticorps monoclonaux et polyclonaux ou de ligands fluorescents. Son utilisation pour quantifier un immunomarquage se heurte aux problèmes de variabilité du taux de marquage des conjugués (rapport fluorochrome/protéine).

### **III-1-B-②- Quantum Beads (Flow Cytometry Standards Corporation®)**

#### **Principe**

Ce système propose des billes recouvertes du même fluorochrome que celui utilisé sur les cellules, mais cette fois-ci à la surface, en contact du milieu. La préparation des billes est similaire au calibrant précédent.

#### **Avantages – limites**

La stabilité est moins bonne à long terme, mais la comparaison avec des cellules marquées est plus juste.

L'application de ce calibrant connaît les mêmes limites que le calibrant précédent.

### **III-1-B-③- Quantum Simply Cellular Microbeads (Sigma®)**

#### **Principe**

Ce système est restreint à l'utilisation d'anticorps monoclonal qui, en plus de sa spécificité, représente une seule entité moléculaire. Sa fixation à la surface d'une cellule reflète la présence de l'antigène associé, et le niveau de cette fixation dépend du nombre de sites antigéniques.

Dans la pratique, il s'agit d'un mélange de quatre populations de billes simulant les cellules, non fluorescentes à l'origine, couplées d'anticorps anti-souris à concentration croissante. Billes et cellules sont marquées parallèlement. La gamme de calibration utilise le même conjugué fluorescent que celui utilisé pour marquer les cellules. En conséquence, une droite d'étalonnage individuelle, reliant la moyenne de fluorescence à la capacité de liaison de l'anticorps, est nécessaire pour chaque antigène étudié.

#### **Avantages – limites**

Le marquage en conditions saturantes permet théoriquement la fixation d'une seule molécule d'anticorps monoclonal par site antigénique et permet d'établir une équivalence entre nombre de molécules d'anticorps monoclonal fixées et le nombre de sites antigéniques. Cet étalon nécessite la construction d'une courbe de calibration pour chaque antigène exploré, ce qui peut représenter une inflation technique lors d'un immuno-phénotypage incluant de nombreux marqueurs (Denny TN, 1996).

### **III-1-B-④- Qifikit (Dako®)**

#### **Principe.**

Ce système propose cinq populations de billes recouvertes de quantité croissante d'immunoglobulines de souris. Les cellules sont incubées avec l'anticorps de première couche à concentration saturante. Les billes sont introduites lors du marquage par l'anticorps de deuxième couche et sont alors traitées parallèlement aux cellules. Ceci permet de tracer une droite d'étalonnage reliant l'intensité moyenne de fluorescence au nombre de molécules d'anticorps monoclonal fixées par cellule et par extension, au nombre de sites antigéniques recherchés par cellule.



Les billes du Qifikit sont calibrées par comparaison à des standards cellulaires, eux-mêmes calibrés par méthode radio-immunologique.

### **Avantages – limites**

La détermination du nombre de sites antigéniques est similaire. Contrairement au système précédent, la même droite étalon est utilisée quel que soit le nombre d'antigènes analysés, puisque l'anticorps primaire est déjà fixé aux billes. Cette procédure implique de ne travailler qu'en immuno-fluorescence indirecte (Bikoue A, 1996).

### **III-2- CHOIX ET DESCRIPTION DE L'ETALON**

Afin d'établir, pour notre travail, les valeurs de références de l'expression quantitative des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN, nous avons choisi l'étalon QIFIQIT (Dako). Ce choix a été réalisé afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux d'une des rares études de quantification qui a mesuré l'expression des principaux récepteurs d'adhérence à la surface des leucocytes (Bikoue A, 1996).

Cet étalon est constitué de billes de latex, de 10 µm de diamètre, recouvertes de quantités déterminées de molécules d'anticorps monoclonal, à savoir un anticorps de souris anti-CD5 humain de haute affinité, clone ST1, isotype IgG2a.

La calibration de ces billes a été réalisée à partir de la lignée lymphoblastique CCRF-CEM qui possède des sous-populations exprimant à des taux variables l'antigène CD5. Cette expression a été mesurée par des méthodes radio-immunologiques. Ces sous-populations ont été incubées en présence de concentrations saturantes d'anticorps anti-CD5 (clone ST1) ; après révélation par un anticorps secondaire, anti-immunoglobuline, marqué au FITC, la calibration des billes est réalisée par cytométrie en flux (Poncelet P, 1985).

Le procédé, par lequel l'anticorps anti-CD5 se fixe sur les billes de latex qui ne possèdent pas l'antigène CD5, reste un secret de fabrication commercial.

L'échafaudage moléculaire de l'immuno-marquage des billes se veut reproduire celui appliqué à la détection des antigènes cellulaires (*figure n°II-1*) :

- dans une première étape les cellules sont incubées en présence de l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène recherché, en concentration saturante afin que l'anticorps puisse exprimer sa monovalence. Cet anticorps primaire devra être obligatoirement d'isotype IgG, c'est-à-dire de même isotype que l'anticorps primaire utilisé pour les billes (déjà marquées dans la trousse),
- cet anticorps primaire est révélé, dans une deuxième étape, par un anticorps secondaire, anti-immunoglobuline, marqué au fluorochrome FITC, qui sera appliqué en conditions saturantes, en parallèle sur les cellules et sur les billes.

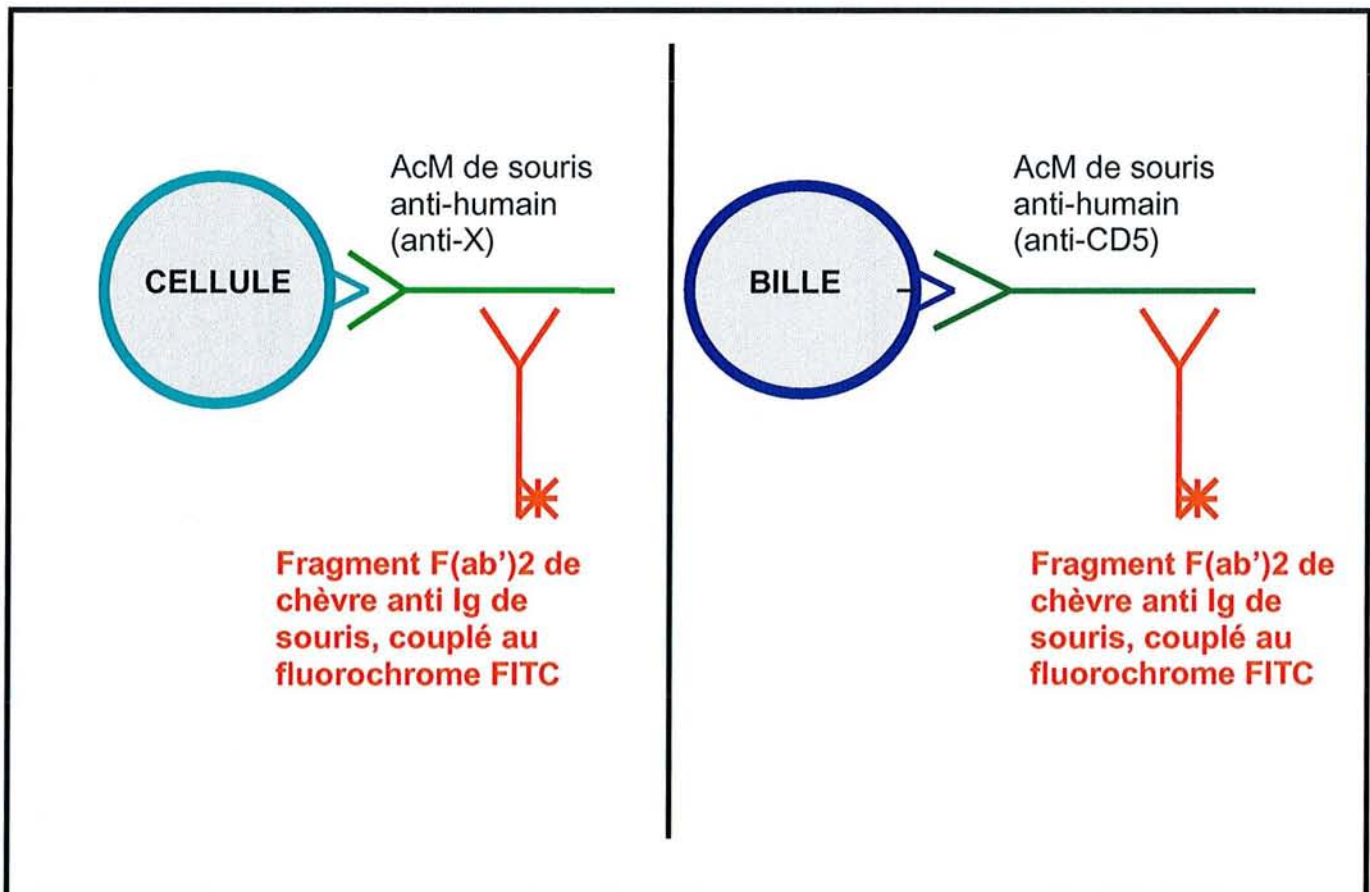


Figure n°II-1 : Principe de la cytométrie quantitative pour la trousse Qifikit (Dako) : le système appliqué aux billes reproduit l'échafaudage moléculaire du système de détection.

### III-3- MATERIEL ET REACTIFS

#### Matériel

- Tubes à fond rond, en polypropylène, de contenance 4,5 mL (Becton Dickinson).
- Centrifugeuse GR 4-12 (Jouan).
- Cytomètre en flux FACScan ou FACSCalibur (Becton Dickinson).
- Agitateur rotatif (Vortex Génie).

#### Réactifs

- Billes de calibration QIFIKIT (DAKO).
- Tampon PBS (Phosphate-buffered saline) glucosé 1mmol/L pH (25°C 7,4 ) :
  - . Chlorure de sodium anhydre (Prolabo) : 8 g
  - . Chlorure de potassium anhydre (Prolabo) : 0,2 g
  - . Hydrogénophosphate de sodium anhydre (Prolabo) : 1,15 g
  - . Dihydrogénophosphate de sodium anhydre (Prolabo) : 0,2 g
  - . D (+) Glucose (Prolabo) : 0,18 g
  - . Eau distillée : 1 litre
- Anticorps monoclonaux primaires (*tableau n°II-2*).
- Anticorps secondaire : fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobulines de chèvre anti-souris conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine FITC (*tableau n°II-2*).
- Liquide de lavage : cell WASH (Becton Dickinson).
- Réactif de lyse (Ortho-Mune).

| Spécificité             | Isotype             | Clone    | Origine commerciale     |
|-------------------------|---------------------|----------|-------------------------|
| Contrôles isotypiques   | IgG1 ; IgG2b        |          | Dako (référence X928)   |
| CD45                    | IgG1, kappa         | t29/33   | Dako (référence M0701)  |
| CD62L                   | IgG2b, kappa        | FMC46    | Dako (référence M7084)  |
| CD11a                   | IgG1, kappa         | MHM24    | Dako (référence M 0782) |
| CD11b                   | IgG1, kappa         | 2LPM19c  | Dako (référence M 0741) |
| CD11c                   | IgG1, kappa         | KB90     | Dako (référence M 732)  |
| CD18                    | IgG1, kappa         | MHM23    | Dako (référence M 0783) |
| Anticorps conjugué-FITC | F(ab') <sub>2</sub> | 101(106) | Dako (référence F 0479) |

Tableau n°II-2 : Caractéristiques et références des anticorps monoclonaux utilisés.

### **III-4- MODE OPERATOIRE**

#### **Immunomarquage des billes**

- Mettre dans un tube 100  $\mu$ L de la suspension de billes de calibration.
- Ajouter 100  $\mu$ L du conjugué FITC dilué au 1/50.
- Incubation 45 minutes, à température ambiante, à l'obscurité.
- Faire deux lavages : ajouter 2 mL de PBS, agiter et centrifuger à 300 g pendant 5 minutes, à température ambiante ; jeter le surnageant.
- Suspendre le culot dans 500  $\mu$ L de PBS et analyser les billes en même temps que les échantillons cellulaires.

#### **Immunomarquage des PNN**

- Mettre 100  $\mu$ L de suspension cellulaire d'une solution contenant environ  $10^6$  cellules/mL dans chaque tube, un tube servant à la détection d'une seule molécule, en prévoyant le contrôle négatif (cellules et tampon) et le contrôle isotypique (cellules, tampon et anticorps monoclonal non spécifique, de même classe, de même isotype et incubé à la même concentration).
- Ajouter dans chaque tube 10  $\mu$ L d'anticorps monoclonal primaire de souris non conjugué.
- Incubation 45 minutes, à température ambiante, à l'obscurité.
- Lavage : ajouter 2 mL de Cell WASH, agiter et centrifuger à 300 g pendant 5 min ; jeter le surnageant.
- Faire un deuxième lavage dans les mêmes conditions.
- Ajouter 100  $\mu$ L de l'anticorps secondaire conjugué au FITC dilué au 1/50.
- Incubation 45 minutes, à température ambiante, à l'obscurité.
- Faire deux lavages dans les conditions similaires décrites ci-dessus.
- Suspendre le culot dans 500  $\mu$ L de PBS et analyser les échantillons au cytomètre, dans un délai inférieur à 30 min.

#### **Lyse des globules rouges**

La lyse des globules se fait selon un phénomène osmotique à l'aide d'un réactif à base de chlorure d'ammonium (Hamblin A, 1992). Il se produit une accumulation de chlorure d'ammonium à l'intérieur des hématies ; cette accumulation

augmente la pression osmotique dans les hématies entraînant une rupture des membranes cellulaires.

- Ajouter 2 mL de solution de lyse à chacun des tubes et agiter (Vortex) immédiatement.
- Incuber à température ambiante jusqu'à ce que la lyse soit complète (10 à 15 min sont nécessaires) et que la solution apparaisse transparente.
- Lavage : ajouter 2 mL de cell WASH, agiter et centrifuger à 300 g pendant 5 min ; jeter le surnageant.
- Suspendre dans 100 µL de PBS. Conserver à température ambiante, à l'obscurité.

### **Analyse par cytométrie de flux**

Les analyses ont toujours été réalisées sur 10 000 événements (billes ou cellules) (*figure n°II-2*).

#### **①-Analyse des billes de calibration.**

- Sur le cytogramme représentant la taille cellulaire (forward scatter : FSC) en fonction de la structure (side scatter : SSC), régler les valeurs des gains des photomultiplicateurs (PMT) de ces deux paramètres de façon à bien visualiser les billes. Chaque événement analysé est représenté par un point.
- Réaliser une fenêtre électronique sur cette population homogène de billes.
- Sur l'histogramme de la fluorescence FL1 (fluorochrome FITC) conditionné sur la population de billes, régler la valeur du gain du PMT de telle façon que l'intensité de fluorescence de la 1<sup>ère</sup> population de billes apparaisse après le seuil  $10^1$  sur l'échelle logarithmique comprenant quatre décades. Cette valeur du PMT, une fois déterminée, sera la même utilisée pour toutes les analyses ultérieures. Le respect de cette condition assure la reproductibilité des résultats. Le nombre d'évènements analysés est représenté en ordonnée.
- Cet histogramme de fluorescence montre cinq pics correspondant aux cinq populations de billes.

## **②- Construction de la droite d'étalonnage**

- Une représentation logarithmique est réalisée, reliant en abscisse les valeurs d'intensité moyenne de fluorescence, et en ordonnée les valeurs de capacité de fixation des anticorps par cellule (ABC : Antibody Binding Cell ou CLA : Capacité liante de l'anticorps) indiquées sur le lot, pour chaque population de billes.
- Pour valider cette droite d'étalonnage, il faut s'assurer que le coefficient de corrélation ( $r^2$ ) soit supérieur à 0,9.

## **③- Analyse des échantillons cellulaires**

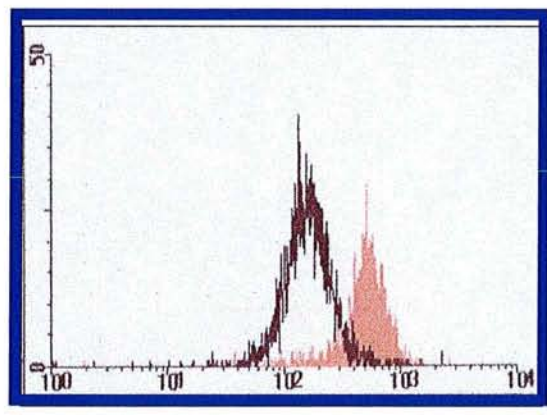
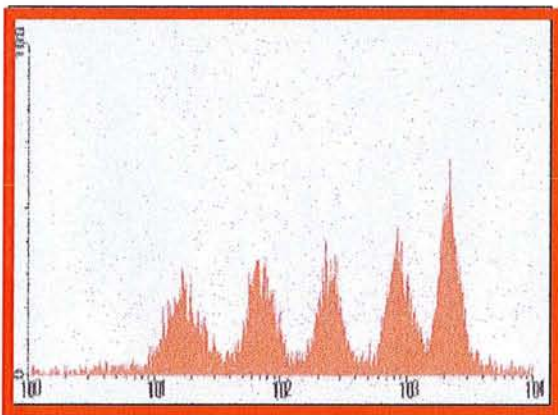
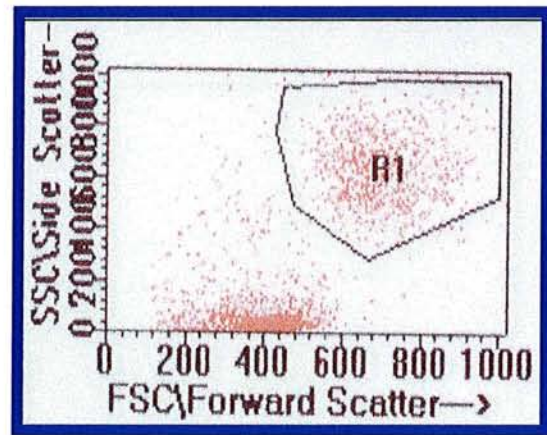
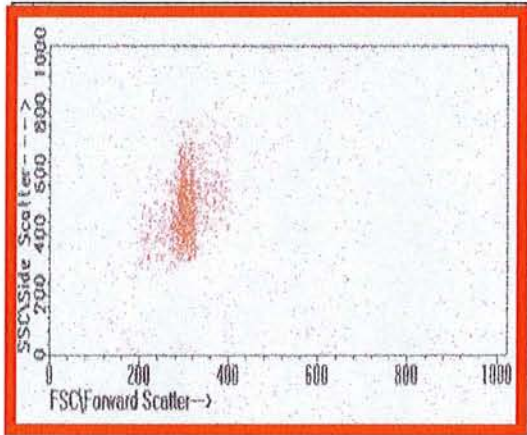
- Les PNN étant de taille plus grande que celle des billes, il faut ajuster les valeurs des PMT de SCC et de FSC afin de bien discerner cette population cellulaire.
- Réaliser une fenêtre électronique sur la région des PNN (cellules de grande taille et de forte granulosité).
- Sur l'histogramme de la fluorescence FL1 (fluorochrome FITC) conditionné sur la population de PNN, mesurer la valeur d'IMF du pic de fluorescence qui correspond à l'expression du récepteur étudié.

## **④- Transformer les valeurs d'intensité moyenne de fluorescence en nombre de sites reconnus par l'anticorps (CLA)**

- Après avoir soustrait à l'IMF de l'échantillon choisi, la valeur d'IMF du contrôle isotypique, la valeur de CLA est extrapolée à partir de la droite d'étalonnage, et ce pour chaque récepteur étudié.

## **III-5- EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSE STATISTIQUE**

- Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- écart-type.
- La comparaison de l'expression des récepteurs d'adhérence en fonction des différents modes de préparation de PNN a été réalisée par un test non paramétrique de comparaison de médianes, appliqué à des séries appariées : test de Wilcoxon. Les résultats sont considérés significativement différents lorsque  $p < 0,05$ .



Histogramme de fluorescence FL1

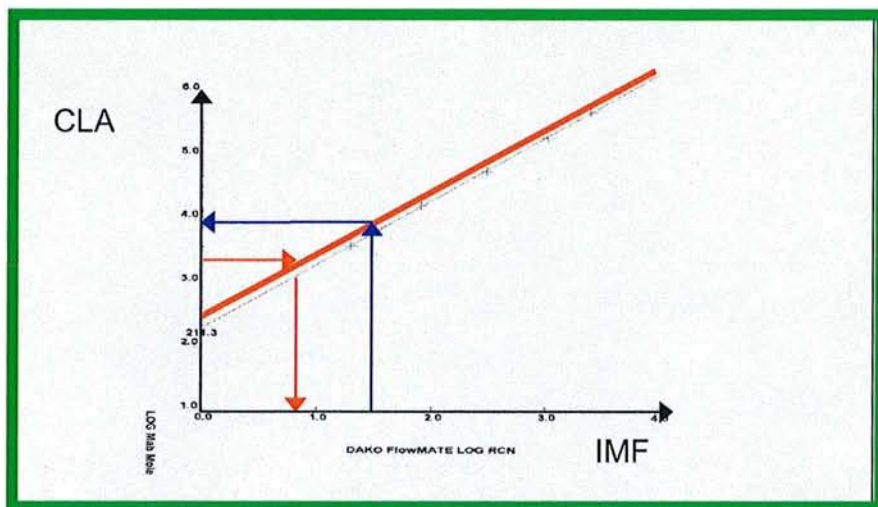


Figure n°II-2 : Quantification de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN, à l'aide des billes de calibration. (IMF : intensité moyenne de fluorescence, CLA : capacité liante de l'anticorps).



#### **IV- ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN PAR MICROSCOPIE A SECTIONNEMENT OPTIQUE A FLUORESCENCE 3D**

Cette technique utilise un microscope à fluorescence conventionnel (Olympus IX-70) associé à un système CELLScan™ (Scanalytics, USA et Bionis, France) composé d'un module d'acquisition et d'un module de traitement. Le microscope est associé à un dispositif de déplacement axial nanométrique et à de puissants algorithmes de restauration et de reconstruction d'images qui permettent de visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions (*figure n°II-3*) (Dumas D, 1999). L'objet est illuminé en entier, à la différence de l'approche confocale.

Cette technique a été développée pour contourner les problèmes liés à l'utilisation de la microscopie confocale soit :

- une vitesse de balayage du laser insuffisante pour suivre des cinétiques rapides,
- une concentration du faisceau laser en un point de focalisation entraînant une photodégradation du marqueur sonde,
- et un faible rendement quantique des capteurs : 0,1 à 0,35 pour un photomultiplicateur et 0,6 à 0,8 pour des caméras de type SIT ou CCD.

##### **IV-1- ACQUISITION DES IMAGES**

Les objectifs 60x/1,25 NA et 100x/1,30NA sont utilisés pour l'observation. Les images sont acquises à l'aide d'une caméra CCD (Charge-Coupled Device, Princeton Instruments Inc, USA). Une série d'images 2D est acquise en déplaçant le plan focal à travers l'objet, grâce un système de déplacement en l'axe z par un module piézo-électrique contrôlé par ordinateur (*figure n°II-4*). Dans notre protocole, les images sont acquises tous les 0,25  $\mu\text{m}$ . Chacune des images 2D contient des informations de son plan de focalisation (partie "nette") et de tous les autres plans adjacents (partie "floue"). La partie nette de l'image correspond aux informations relatives au plan focal, le flou dans l'image provient des informations de tous les autres plans. Ces informations peuvent être séparées par traitement d'images afin d'estimer la vraie structure 3D de l'objet étudié.



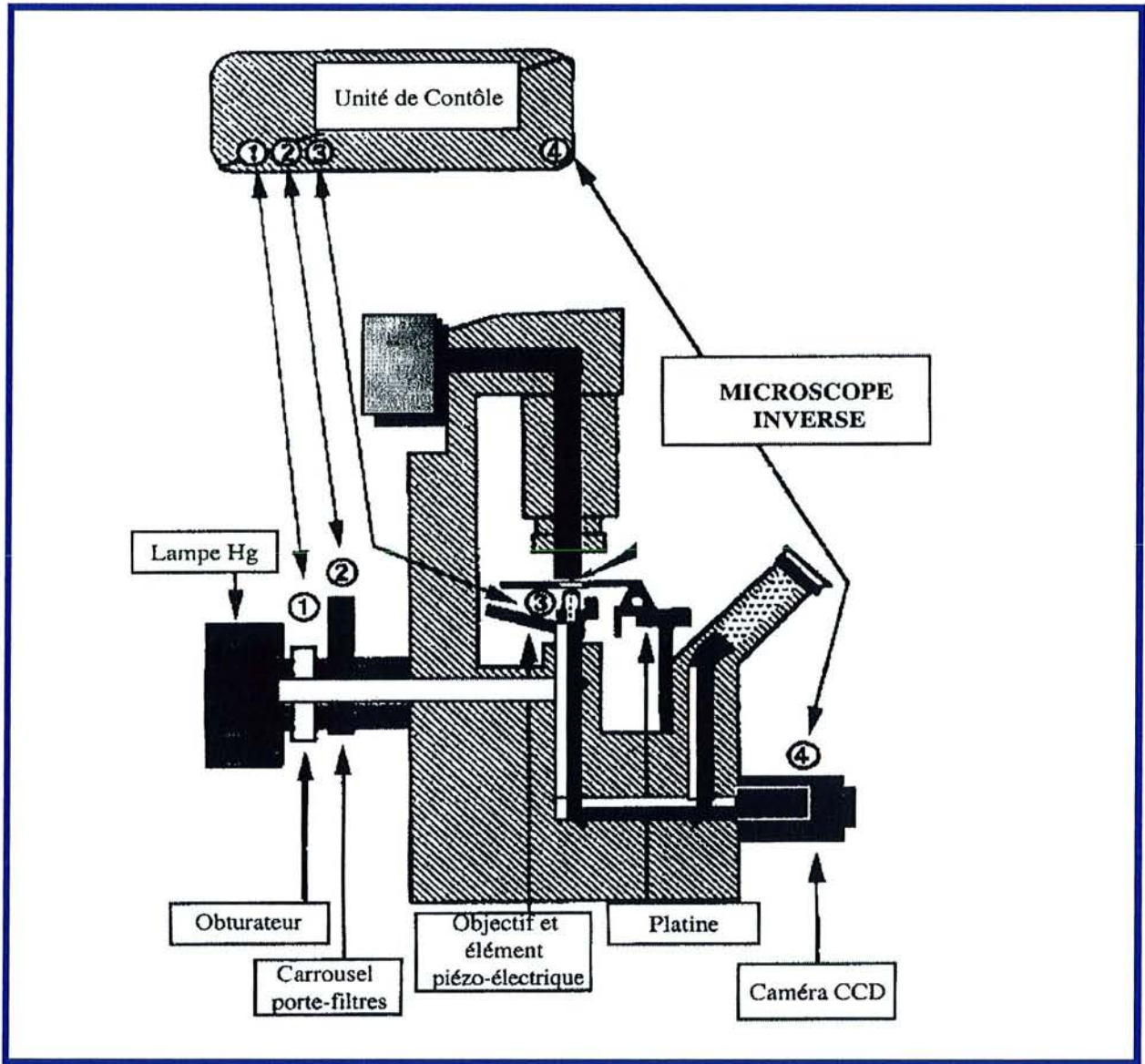


Figure n°II-3 : Représentation schématique du microscope à sectionnement optique à fluorescence équipé du système CELLScan™.

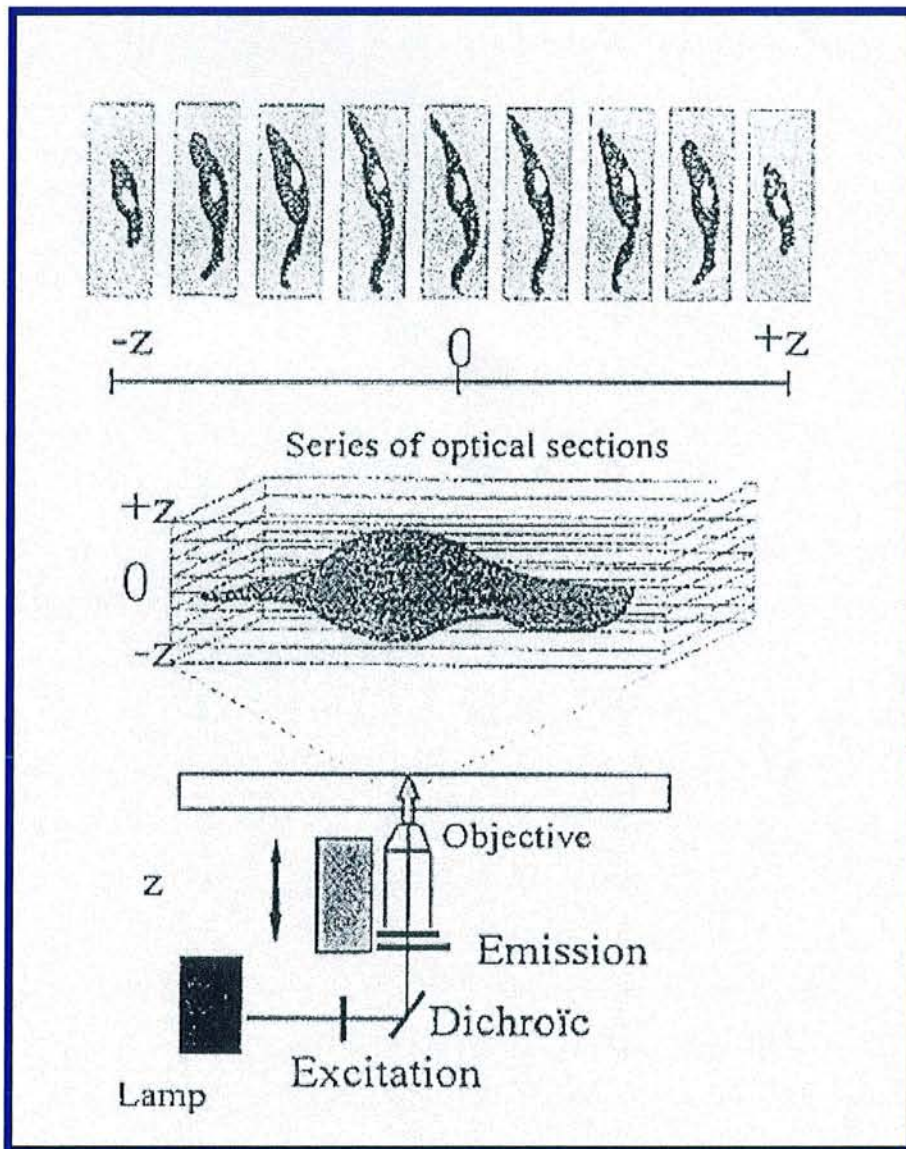


Figure n°II-4 : Représentation de l'acquisition des images 2D en x et y selon l'axe z (pas minimum de 0,25  $\mu\text{m}$ ).

#### IV-2- TRAITEMENT DES IMAGES (cf. Annexe 1)

Le traitement d'image concerne la manipulation et l'image (restauration, reconstruction et rehaussement ; numérisation et compression ; description et reconnaissance des formes). Le but de restauration d'image est de retrouver la scène originelle à partir d'observations dégradées.

Afin de supprimer l'information située en dehors du plan de focalisation, la PSF (point spread function) ou la fonction de transfert optique du système complet (microscope/détecteur) est mesurée et utilisée pour le déflouage.

La fonction de transfert optique décrit comment une source lumineuse ponctuelle est déformée lorsqu'elle est imagée par un système optique. D'une manière synthétique, la PSF caractérise la fonction de transfert du microscope pour des conditions expérimentales particulières, propres à chaque expérience (incrément entre chaque plan, ouverture numérique, milieu de montage, objectif, filtres, traceurs fluorescents, longueur d'onde...). On utilise des billes fluorescentes en latex pour mesurer la PSF dont la longueur d'onde d'émission est la même que celle des spécimens biologiques à étudier.

La préparation de billes fluorescentes de  $0,17\ \mu\text{m}$  (Microscope Point Source Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) est placée sur la lame. On fait l'acquisition de coupes constituant le fichier "PSF" du bas vers le haut de la bille afin de minimiser l'influence du "bleaching". La normalisation permet d'avoir la même quantité d'énergie lumineuse dans chacun des plans et de compenser un éventuel "bleaching" du signal et/ou la fluctuation de la source d'excitation.

Sur le principe des acquisitions par sectionnement optique, le système mathématique met en œuvre une étape de déconvolution numérique à l'aide d'algorithmes. CELLScan™ fait appel à une technologie de pointe en matière de corrections d'images; l'EPR™ (Exhaustive Photon Reassignment, Bionis, France) ou reconstitution quantitative des photons issus d'un point source à leur plan d'origine. Elle consiste en une minimisation au sens des moindres carrés avec contraintes, qui conduit à une déconvolution 3D itérative. Pour chaque image, les photons défocalisés sont évalués et réinsérés à leur point d'origine. Dans la méthode EPR, les propriétés de distorsion et de profondeur de champ du microscope sont analysées mathématiquement afin d'obtenir des images plus nettes et plus contrastées.

La reconstitution des images 3D est effectuée à partir des coupes 2D.

**TROISIEME PARTIE**

**ETUDES FONDAMENTALES ET CLINIQUES  
RESULTATS ET DISCUSSION**



## **Chapitre III-1**

**EXPRESSION QUANTITATIVE ET DISTRIBUTION SPATIALE  
DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES  
PNN POUR DES TEMOINS SAINS EN CONDITIONS  
PHYSIOLOGIQUES ET APRES STIMULATION**

## CHAPITRE III-1

### EXPRESSION QUANTITATIVE ET DISTRIBUTION SPATIALE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN POUR DES TEMOINS SAINS EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET APRES STIMULATION

#### I- EXPRESSION QUANTITATIVE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN : VALEURS DE REFERENCES EN FONCTION DU MODE DE PREPARATION CELLULAIRE

##### Article 1

**LATGER-CANNARD V**, REGNAULT V, DUMAS D, NGUYEN P, LECOMPTE T, STOLTZ JF.

Mesure des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile : influence des paramètres pré-analytiques.

Journal des Maladies Vasculaires, 2000, 25 : 181-186.

Ce travail étudie l'influence de trois modes de préparation cellulaire sur la mesure de l'expression quantitative des principaux récepteurs d'adhérence à la surface des PNN. Il a été quantifié, à l'aide des billes de calibration (QIFIKIT, Dako), l'expression de la sélectine CD62L et des  $\beta_2$  intégrines CD11a,b,c/CD18 à la surface de PNN dans différentes conditions : ① PNN analysés en sang total recueilli en présence d'EDTA, ② PNN isolés à l'aide du gradient de densité Polymorphprep 1,113 (Nycomed Pharma) à partir de sang total recueilli en présence d'EDTA, ③ PNN fixés par du formaldéhyde à 0,4% à partir de sang total recueilli en présence d'EDTA. Les résultats ont montré que les procédures d'isolement des PNN et de leur fixation entraînent une diminution de l'expression de l'ensemble des récepteurs étudiés par rapport aux PNN étudiés en sang total. Ainsi, ces deux modes de préparation cellulaire entraîne une altération des PNN affectant la reconnaissance épitopique des sites antigéniques par les anticorps monoclonaux. Cette étude illustre l'incidence d'un paramètre analytique sur la mesure de la densité antigénique et permet de mettre en exergue la nécessité de prendre en compte l'ensemble des paramètres pré-analytiques et analytiques lors de l'interprétation d'un résultat de mesure antigénique. Cette étude permet également d'aborder l'ensemble de ces paramètres. La quantification, à l'aide d'un calibrateur de l'immunomarquage, représente une étape de standardisation de cette mesure mais il est absolument nécessaire de mettre en œuvre des pratiques consensuelles, afin de pouvoir intégrer ces résultats dans des démarches comparatives multicentriques et/ou longitudinales.

# MESURE DES RÉCEPTEURS D'ADHÉRENCE DU POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE

## Influence des paramètres pré-analytiques

V. LATGER-CANNARD (1, 2), V. REGNAULT (1), D. DUMAS (1), P. NGUYEN (3), T. LECOMPTE (1, 2),  
J.-F. STOLTZ (1)

(1) Angiohématologie-Hémorhéologie, LEMTA, UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy.

(2) Hématologie Biologique, CHU Nancy.

(3) Laboratoire Central d'Hématologie, CHU Robert Debré, 51092 Reims.

### RÉSUMÉ :

#### Mesure des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile. Influence des paramètres pré-analytiques.

L'expression des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile (PNN) varie avec l'état d'activation leucocytaire. Leur quantification nécessite une méthode précise, reproductible, n'entraînant pas d'activation artefactuelle.

**Objectif :** Le but de ce travail a été d'étudier l'influence de la préparation cellulaire sur la détermination des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile.

**Matériels et méthodes :** Il est proposé de quantifier, à l'aide d'un calibrateur de l'immuno-marquage (QIFIKIT®, Dako), l'expression des principales molécules d'adhérence (L-sélectine et  $\beta_2$  intégrines) à la surface de PNN préparés selon trois méthodes : PNN analysés en sang total recueilli en présence d'EDTA ; PNN isolés par le gradient de densité Polymorphprep<sup>®</sup> 1,113 (Nycomed Pharma) ; et PNN fixés par le formaldéhyde, à partir de sang prélevé en présence d'EDTA.

**Résultats :** Il a été noté une diminution de l'ensemble des marqueurs analysés après isolement et après fixation au formaldéhyde par rapport à l'analyse des PNN en sang total. Ces résultats vont à l'encontre des données de la littérature qui notent la présence d'un phénotype d'activation (augmentation de l'expression des  $\beta_2$  intégrines) après utilisation d'autres procédés d'isolement ou de fixation.

**Conclusion :** Ce travail représente un exemple de variation biologique en fonction d'un paramètre pré-analytique. Il rappelle la nécessité de prendre en compte, lors de l'interprétation d'un résultat biologique, l'ensemble des paramètres pré-analytiques et analytiques. Il souligne l'intérêt de mettre en œuvre des pratiques consensuelles lors de la détermination de ces facteurs afin de pouvoir intégrer les résultats dans des démarches comparatives multicentriques et/ou longitudinales. (J Mal Vasc 2000 ; 25 : 181-186)

**Mots-clés :** Polynucléaire neutrophile. Récepteurs d'adhérence. Paramètres pré-analytiques. Cytométrie en flux.

### ABSTRACT :

#### Determination of polymorphonuclear neutrophil adhesion receptors: influence of pre-analytic factors.

Polymorphonuclear neutrophil (PMN) adherence receptors expression varies with leukocyte activation state. Their quantification need accurate and inter-laboratories reproducible methods, without artefactual activation.

**Objective :** The aim of this study was to study the influence of cell preparation on PMN adherence receptors expression.

**Materials and methods :** It was proposed to quantify, using immunolabeling standard (QIFIKIT®, Dako), surface expression of the main adherence receptors (L-selectin and  $\beta_2$  integrins), from different preparations of PMN: total blood collected with EDTA, isolated PMN by density gradient Polymorphprep<sup>™</sup> 1,113 (Nycomed Pharma) and formaldehyde fixed PMN.

**Results :** A decrease of all receptors was noted after isolation and fixation of PMN, in comparison with whole blood PMN analysis. These results differed from data previously reported since, in these studies, activated phenotypes (increased of  $\beta_2$  integrins) were observed after isolation and fixation methods.

**Conclusion :** The present study provides strong evidence that pre-analytical conditions are sources of biological variations and thus extreme care must be taken in the interpretation of results. It underlines the interest of consensual practices for these pre-analytic and analytic parameters in order to compare results in multicenter and longitudinal studies. (J Mal Vasc 2000; 25: 181-186)

**Key-words :** Polymorphonuclear neutrophil. Adherence receptors. Pre-analytic parameters. Flow cytometry.

Travail présenté au : XXXIII<sup>e</sup> congrès du Collège Français de Pathologie Vasculaire, Session d'Hémorhéologie clinique sur « Les marqueurs de l'activation cellulaire », Paris le mercredi 10 mars 1999.

Reçu le 17 janvier 2000.

Acceptation par le comité de Rédaction le 31 janvier 2000.

Tirés à part : V. LATGER-CANNARD, adresse ci-dessus.

E-mail : v.latger-cannard@chu-nancy.fr

|        |  |
|--------|--|
| CLA :  | Capacité de liaison de l'anticorps                 |
| EDTA : | Acide éthylènediamine tripotassique                |
| FITC : | Isothiocyanate de Fluorescéine                     |
| PBS :  | Phosphate buffered saline (tampon salin phosphaté) |
| PNN :  | Polynucléaires neutrophiles                        |

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) présentent à leur surface plusieurs récepteurs d'adhérence qui leur permettent de communiquer avec leur environnement lors de la réaction inflammatoire (tableau I). L'interaction du PNN avec les cellules endothéliales implique la sélectine leucocytaire (L-sélectine, CD62L) lors de la phase dite de « roulement lent » et les  $\beta_2$  intégrines (CD11a, b, c/CD18) qui assurent l'adhérence ferme du PNN aux cellules endothéliales lors de la réaction inflammatoire (1-4). Puis le passage trans-endothélial est assuré par les récepteurs  $\beta_2$  intégrines (CD11a, b, c/CD18) et PECAM-1 (CD31). Le PNN pourra alors phagocyter sa cible opsonisée et exercer sa fonction de bactéricidie dans les tissus.

La connaissance du niveau d'expression de ces différents récepteurs apporte des renseignements sur l'état d'activation leucocytaire (5). La mesure de leur expression membranaire par des méthodes précises et reproductibles inter-laboratoires constitue un prérequis indispensable à l'établissement de valeurs de référence, à la réalisation d'études multicentriques, ainsi qu'à la compréhension des variations physiologiques et pathologiques.

La cytométrie en flux est une méthode reconnue pour explorer les fonctions leucocytaires et les variations d'expression des différents récepteurs (6, 7). Cependant, à ce jour, les données quantitatives obtenues par les intensités moyennes de fluorescence (IMF), provenant de dif-

férentes études n'ont pu faire l'objet d'études multicentriques et/ou longitudinales. La variabilité observée a été attribuée à celle des paramètres analytiques. Récemment des calibrateurs de l'immunomarquage, représentés par des billes de latex recouvertes d'immunoglobulines, ont été commercialisés. Ils permettent de mesurer la capacité liante de l'anticorps spécifique et donc de renseigner sur la densité antigénique du récepteur analysé (8).

Le but de ce travail a été de mesurer l'influence de la préparation cellulaire sur la détermination des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile. Nous avons quantifié, à l'aide d'un calibrateur de l'immunomarquage (QIFIKIT<sup>®</sup>, Dako), l'expression des principales molécules d'adhérence (L-sélectine et  $\beta_2$  intégrines) à la surface de PNN préparés selon trois méthodes utiles pour l'étude de la physiologie leucocytaire : PNN analysés en sang total recueilli en présence d'EDTA, PNN isolés par le gradient de densité Polymorphprep<sup>™</sup> 1,113 (Nycomed Pharma) et PNN fixés par le formaldéhyde à 0,4 %, à partir de sang prélevé en présence d'EDTA. L'expression de ces récepteurs d'adhérence à la surface des PNN isolés ou fixés a été comparée à celle trouvée pour les PNN analysés en sang total. Ces résultats ont été confrontés aux données de la littérature concernant l'influence des conditions pré-analytiques et analytiques sur la mesure des récepteurs cellulaires.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### SUJETS

Le sang a été prélevé au niveau du pli du coude chez des donneurs sains (n=10) à la fin d'un don transfusionnel et a été recueilli dans des tubes Vacutainer (Becton Dickinson) de 5 mL

TABLEAU I. — Principaux récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile : famille structurale, ligands et fonction principale.

*Main adherence receptors of polymorphonuclear neutrophil: structural family, ligands and main function.*

| Récepteur du PNN   | Famille                           | Ligand  | Fonction  |
|--|-----------------------------------|---|---|
| CD62-L<br>L-sélectine  | Sélectine                         | Sialomucines fucosylées et sialylées<br>Endothéliales | — Roulement lent du PNN   |
| CD11a/CD18<br>$\alpha_L\beta_2$<br>(LFA-1)                                 | $\beta_2$ intégrine               | CD54 (ICAM-1)<br>CD102 (ICAM-2)<br>CD50 (ICAM-3)      | — Adhérence ferme du PNN à la cellule endothéliale<br>— Migration transendothéliale |
| CD11b/CD18<br>$\alpha_M\beta_2$<br>(Mac-1, CR3)                            | $\beta_2$ intégrine               | CD54 (ICAM-1)<br>C3b<br>Fibrinogène                   | — Adhérence ferme du PNN à la cellule endothéliale<br>— Migration transendothéliale |
| CD11c/CD18<br>$\alpha_X\beta_2$<br>(p150, 95, CR4)                         | $\beta_2$ intégrine               | C3b<br>Fibrinogène                                    | — Adhérence ferme du PNN à la cellule endothéliale<br>— Migration transendothéliale |
| CD31<br>(PECAM-1)  | Superfamille des immunoglobulines | CD31<br>(PECAM-1)                                     | — Migration transendothéliale   |
| CD64 (Fc $\gamma$ RI)<br>CD32 (Fc $\gamma$ RII)<br>CD16 (Fc $\gamma$ RIII) | Superfamille des immunoglobulines | Immunoglobulines                                      | — Adhérence aux micro-organismes opsonisés  |



contenant 0,339 M d'acide éthylènediamine tripotassique (EDTA, K<sub>3</sub>).

#### PRÉPARATION CELLULAIRE

Pour la fixation des PNN, le sang est mélangé, volume à volume à du formaldéhyde (formaldéhyde en solution aqueuse 37 % p/v stabilisée par 10 % de méthanol R.P. Normapur, Pro-labo) dilué à 0,4 % dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) isotonique (9, 10). Ce mélange est incubé durant 4 minutes, à température ambiante. Après un lavage par ajout du même volume d'une solution tamponnée saline isotonique (Cell WASH, Becton Dickinson) suivi d'une centrifugation à 300g durant 10 minutes et de l'élimination du surnageant par renversement du tube, les cellules sont resuspendues dans du PBS isotonique.

Pour l'isolement des PNN, le gradient de densité utilisé est le Polymorphprep<sup>®</sup> 1,113 (Nycomed Pharma), composé de métrizoate de sodium (13,8 %) et de dextran (8,0 %) (11). Il est conseillé d'utiliser le sang dans les deux heures après le prélèvement. Le sang total anticoagulé est délicatement déposé sur le Polymorphprep<sup>®</sup>, volume à volume. Après centrifugation (500 g durant 30 min, à température ambiante), l'anneau de PNN est recueilli à l'aide d'une pipette Pasteur puis resuspendu dans du tampon PBS. Après un lavage par la solution saline isotonique, les cellules sont resuspendues dans du PBS isotonique.

L'immuno-marquage a été réalisé dans un délai inférieur à 15 minutes après la fin de la préparation cellulaire, aussi bien pour les PNN fixés que pour ceux isolés.

#### IMMUNOMARQUAGE ET ANALYSE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Les cellules sont marquées selon une réaction d'immuno-fluorescence indirecte en concentrations données comme saturantes par le fabricant. Cent µL de suspension cellulaire (environ 10<sup>6</sup> cellules/mL) sont incubés 45 minutes à température ambiante, avec 10 µL d'anticorps primaire : anti-CD62L (FMC46, Dako), anti-CD11a (MHM24, Dako), anti-CD11b (2LPM19c, Dako), anti-CD11c (KB90, Dako) et anti-CD18 (MHM23, Dako). Une étape de lavage à l'aide de la solution saline isotonique est réalisée ; 100 µL d'anticorps de révélation, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'IgG de chèvre anti-souris (F0479, Dako) conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), dilués au 1/20, sont ajoutés dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'anticorps primaire. Une lyse érythrocytaire hyperosmotique à base de chlorure d'ammonium (Ortho-mune<sup>®</sup> Lysing Reagent, Ortho Diagnostic System) est ensuite effectuée dans le but de faciliter la mesure cytométrique. A la suite d'un second lavage, les cellules sont analysées à l'aide d'un cytomètre en flux de type FACScan (Becton Dickinson) équipé du programme d'analyse PCLysis. Les PNN sont repérés selon leurs paramètres morphométriques (taille, granulométrie). Pour chaque marqueur, l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) est calculée à partir de 5000 événements enregistrés.

#### UTILISATION D'UN CALIBRATEUR POUR QUANTIFIER L'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS

Le calibrateur QIFIKIT<sup>®</sup> (Dako) est constitué de billes de latex, simulant les cellules, recouvertes de quantités croissantes et connues d'immunoglobulines de souris, qui sont utilisées lors de l'étape de révélation de l'immuno-marquage. L'analyse des

différentes distributions de fluorescence permet de tracer une droite de régression reliant le nombre de molécules d'anticorps monoclonaux (AcM) fixées et l'IMF. La fixation du fragment F(ab')<sub>2</sub> étant considérée comme monovalente, chaque site antigénique est occupé par une molécule d'anticorps monoclonal. Dans ces conditions, il existe une équivalence entre le nombre de molécules d'AcM fixées ou capacité liante de l'anticorps (CLA) et le nombre de sites antigéniques par cellule (8).

#### ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. L'expression de ces récepteurs d'adhérence à la surface des PNN isolés ou fixés a été comparée à celle trouvée pour les PNN analysés en sang total à l'aide du test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis adapté au faible échantillonnage ; les différences sont considérées significatives pour  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

Pour les trois modes de préparation, les PNN sont facilement identifiables sur le cytogramme FSC/SSC de par leur grande taille et leur importante granulométrie. Les histogrammes de distribution de la fluorescence suivent une distribution gaussienne permettant une lecture simple de l'IMF (données non montrées). Les valeurs obtenues, exprimées en 10<sup>3</sup> x CLA/cellule, sous forme de moyenne ± écart type, sont mentionnées et comparées dans le *tableau II*. Les niveaux d'expression basale de ces récepteurs d'adhérence sont hétérogènes : CD62L, récepteur principal de la phase de roulement et CD11b, récepteur essentiel à la phase d'adhésion ferme, sont les antigènes majoritairement représentés avec 49,6 x 10<sup>3</sup> CLA/cellule pour CD62L et 42,9 x 10<sup>3</sup> CLA/cellule pour CD11b.

La procédure d'isolement des PNN par Polymorphprep<sup>®</sup> entraîne, par rapport à l'étude en sang total, une diminution statistiquement significative de l'expression de l'ensemble des molécules d'adhérence (excepté pour CD11c). Ces variations ne correspondent pas à un profil phénotypique d'activation qui serait constitué par une diminution de l'expression de CD62L associée à une augmentation de celle des β<sub>2</sub> intégrines. La fixation des PNN par le formaldéhyde entraîne également, par rapport à l'étude en sang total, une diminution de l'expression de tous les récepteurs analysés, cette variation étant plus importante que celle observée pour l'étape d'isolement (excepté pour CD11a).

## DISCUSSION

Ce travail a consisté en l'étude de l'influence de différents procédés de préparation cellulaire sur la mesure de l'expression des principaux récepteurs d'adhérence leucocytaire, quantifiés à l'aide d'un calibrateur de l'immuno-marquage.

Cette méthode de quantification a permis de mesurer et de comparer des CLA indépendamment des paramètres de réglage des photomultiplicateurs de la fluorescence, de garantir la reproductibilité des résultats intra- et interlabo-

TABLEAU II. - Expression quantitative (QIFIKIT<sup>®</sup>, Dako) des principaux récepteurs d'adhérence ( $L$ -sélectine et  $\beta_2$  intégrines) à la surface de polynucléaires neutrophiles (PNN) de sang total anticoagulé par l'acide éthylènediamine tripotassique (EDTA,  $K_3$ ), de PNN fixés par le formaldéhyde et de PNN isolés par gradient de densité Polymorphprep<sup>®</sup> 1.113 (Nycomed Pharma). Les résultats sont exprimés en capacité de liaison de l'anticorps (CLA)  $\times 10^3$ /cellule (moyenne  $\pm$  écart type). L'expression de ces récepteurs d'adhérence à la surface des PNN isolés ou fixés a été comparée à celle trouvée pour les PNN analysés en sang total à l'aide du test de variance de Kruskal-Wallis ; les différences sont considérées significatives pour  $p < 0,05$ .

Quantitative expression (QIFIKIT<sup>®</sup>, Dako) of the main surface adherence receptors ( $L$ -selectin and  $\beta_2$  integrins) of polymorphonuclear neutrophil (PMN) from ethylenediamine tripotassium acid (EDTA,  $K_3$ ) anticoagulated whole blood, formaldehyde fixed PMN and isolated PMN by density gradient Polymorphprep<sup>®</sup> 1.113 (Nycomed Pharma). Results were expressed in antibody binding capacity (ABC)  $\times 10^3$ /cell (mean  $\pm$  standard deviation). Adherence receptors expression of isolated or fixed PMN were compared to those of whole blood PMN by means of Kruskal-Wallis one-way ANOVA.  $P$  values  $< 0.05$  were considered to be of statistical significance.

|       | PNN analysés en sang total | PNN isolés par le Polymorphprep <sup>®</sup> | PNN fixés par le formaldéhyde      |
|-------|----------------------------|--|------------------------------------|
| CD62L | 49,6 $\pm$ 15,9            | 38,5 $\pm$ 17,3<br>( $p = 0,0027$ )          | 12,5 $\pm$ 3,8<br>( $p < 0,0001$ ) |
| CD11a | 12,0 $\pm$ 1,1             | 10,7 $\pm$ 1,7<br>( $p = 0,0134$ )           | 13,0 $\pm$ 1,6<br>( $p = 0,0463$ ) |
| CD11b | 42,9 $\pm$ 10,4            | 36,5 $\pm$ 10,4<br>( $p = 0,0494$ )          | 13,6 $\pm$ 3,8<br>( $p < 0,0001$ ) |
| CD11c | 4,4 $\pm$ 1,7              | 4,3 $\pm$ 1,0<br>( $p = 0,0610$ )            | 2,6 $\pm$ 0,6<br>( $p = 0,001$ )   |
| CD18  | 28,0 $\pm$ 11,5            | 16,8 $\pm$ 8,6<br>( $p = 0,0097$ )           | 15,0 $\pm$ 6,8<br>( $p < 0,0001$ ) |

ratoires, d'éviter l'expression des résultats en unités arbitraires et par conséquent de disposer d'une méthode pour établir des valeurs de références et de comparaison (12, 13). Le respect du protocole analytique associé à l'utilisation de ce calibrateur de l'immuno-marquage offre la possibilité d'effectuer des études multicentriques et longitudinales (8).

L'utilisation de PNN provenant de sang total représente certainement la condition d'analyse la plus proche de la physiologie. Cependant, il est obligatoire de recueillir les cellules en présence d'anticoagulant, qui est connu pour influencer l'expression des molécules de surface. Macey MG. et coll. (10) ont étudié l'effet de deux anticoagulants communément utilisés pour l'analyse des cellules sanguines, citrate et EDTA, sur la quantification des molécules d'adhérence leucocytaires et notent qu'il est préférable, de réduire au maximum le temps de contact pour minimiser les variations artefactuelles de l'expression de ces antigènes. Une étude comparant l'effet des anticoagulants EDTA tripotassique, ACD et héparine conclut que l'EDTA est le moins adapté à la mesure de l'expression de CD11b *ex vivo* du fait de sa propriété chélatrice du calcium (14). Finalement, l'EDTA, anticoagulant couramment utilisé pour l'analyse cellulaire, serait déconseillé pour l'analyse de CD11b. Une étude comparant l'expression de plusieurs récepteurs d'adhérence à partir de PNN provenant de sang prélevé en présence de différents anticoagulants semble nécessaire.

L'isolement des PNN par un milieu de séparation offre la possibilité de réaliser des expériences sur une population plus ciblée et permet d'éliminer les effets d'éventuelles coopérations inter-cellulaires qui pourraient survenir après le prélèvement. La procédure d'isolement des PNN par le Polymorphprep<sup>®</sup> entraîne, par rapport aux PNN

provenant de sang total, une diminution significative de CD62L et de l'ensemble des  $\beta_2$  intégrines (sauf pour CD11c). Ces données vont à l'encontre de celles de Link et coll. (15) qui trouvent une augmentation non statistiquement significative de CD11b lors de l'isolement des PNN par le milieu Polymorphprep mais de densité différente ( $d = 1,150$ ) suivi d'une étape de fixation par le paraformaldéhyde à 1 % après immunomarquage. Il en est de même pour Macey et coll. (16) qui observent une augmentation de CD11b à la surface de PNN qui ont sédimenté sur dextran. L'augmentation de l'expression des  $\beta_2$  intégrines est attribuée, dans la littérature, à une activation *ex vivo* des PNN lors de la phase de séparation. Dans notre expérience, la diminution d'expression observée pourrait être la conséquence d'une altération cellulaire, reliée à la viscosité du Polymorphprep<sup>®</sup> utilisé, entraînant la perte de reconnaissance de certains antigènes. Il a été récemment proposé une technique de séparation des PNN par un procédé immuno-magnétique simple, rapide permettant d'obtenir des PNN hautement purifiés (rendement supérieur à 99 % des leucocytes) n'altérant pas l'expression et les fonctions antigéniques (17).

La fixation par le formaldéhyde est souvent utilisée dans le but de différer l'analyse de 24 heures. Dans notre étude, elle entraîne une diminution significative de l'expression de l'ensemble des récepteurs d'adhérence. L'explication la plus plausible consiste en une altération des sites antigéniques, consécutive à une désorganisation de la structure protéique tertiaire par le fixateur. La littérature à ce sujet est contrastée. Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par McCarthy DA. (18) qui montre que les techniques de préparation leucocytaires utilisant le formaldéhyde à 0,4 % sous-estime l'expression des récepteurs CD62L, CD11b et CD18. Par contre ces données

vont à l'encontre de celles d'Hamblin et coll. (9) qui préconisent la fixation rapide des cellules immédiatement après le prélèvement afin d'éviter toute activation artéfactuelle pouvant survenir *in vitro* lors des différentes étapes de préparation cellulaire.

Dans notre étude, toutes les étapes de la mesure de l'expression des récepteurs d'adhérence leucocytaires ont été réalisées à température ambiante. Cependant la température d'analyse est également sujette à débat. Après avoir noté une augmentation de l'expression de CD11b d'un facteur quatre entre les procédures de préparation des PNN à 4°C et à 20°C, Fearon DT. *et al.* (19) pensent que les étapes de purification des PNN devraient s'effectuer à 4°C. Ces données semblent confortées par des études plus récentes (20) qui montrent une augmentation de l'expression de CD11b à la surface des PNN préparés à température ambiante par rapport à ceux traités à 4°C, cette différence disparaissant après incubation à 37°C. Repo et coll. (21) ont décrit une méthode d'analyse permettant de limiter l'activation cellulaire spontanée *in vitro* : un « buffy coat » est préparé dans de la glace et toutes les étapes de manipulations cellulaires sont ensuite réalisées à 0-4°C. D'autres auteurs recommandent de préparer les PNN à température ambiante (22) après avoir constaté que les étapes consécutives de refroidissement à 4°C puis de réchauffement à température ambiante provoquent une activation des PNN. Les variations de température entraîneraient, selon les auteurs, une activation cellulaire, similaire à celle produite par des stimuli inflammatoires, avec expression à la membrane des  $\beta 2$  intégrines stockées en position intracellulaire.

Le procédé de préparation cellulaire, l'anticoagulant de recueil, la température d'analyse sont donc des facteurs décrits dans la littérature pour influencer l'expression antigénique. Pour être complet, il faudrait citer la variabilité liée à la diversité des réactifs, il est bien décrit dans la littérature des différences d'intensité moyenne de fluorescence pouvant varier de plus d'un facteur deux, en fonction de l'anticorps utilisé (variation du site épitopique et/ou de la saturation des épitopes), de la technique de détection (plus grande sensibilité de la méthode d'immunofluorescence indirecte par rapport à celle d'immunofluorescence directe) ou des caractéristiques des fluorochromes (spectres d'absorption/émission, rendement quantique, accessibilité déterminée par le poids moléculaire, stœchiométrie, photostabilité). Ces faits soulignent le fait qu'une meilleure connaissance de la cartographie épitopique, de la spécificité et de l'affinité des anticorps permettrait de cibler les anticorps les plus pertinents.

Enfin, après avoir pris en compte la variabilité liée au mode de prélèvement, il faut interpréter le résultat en fonction de l'ensemble des paramètres pré-analytiques. Ces derniers sont liés à l'hétérogénéité inter-individuelle (âge, sexe, race), à l'influence des thérapeutiques administrées, aux pathologies associées (infectieuses, vasculaires, inflammatoires...) ainsi qu'à l'heure du prélèvement par rapport au rythme biologique (horaire post-prandial, effort physique, stress psychique, rythme circadien, ...) (23). Le délai d'acheminement est aussi à prendre en compte puisque les cellules recueillies dans le tube ne sont pas fixées et poursuivent leur métabolisme, voire l'augmentent

consécutivement à une activation liée au prélèvement. Un interrogatoire systématique et approprié permet de connaître ces variations extrinsèques liées au patient et au prélèvement ; elles doivent être soigneusement consignées et prises en compte lors de l'interprétation des résultats.

## CONCLUSION

En conclusion, ce travail souligne les exigences à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats obtenus par quantification des récepteurs membranaires leucocytaires, l'absence actuelle d'attitude consensuelle et la nécessité de considérer de nombreux facteurs de variation, pré-analytiques et analytiques, afin de les intégrer dans une démarche comparative inter-laboratoires. MG. Macey et coll. pensent « qu'il n'existe pas de procédure correcte d'isolement des leucocytes circulants, à savoir qui n'engendre pas de variation artéfactuelle de l'expression antigénique » (10, 18). L'anticoagulant utilisé pour le prélèvement, les procédés de préparation des leucocytes, la température de conservation et d'analyse, la méthode d'immunomarquage, le type d'anticorps primaire utilisé, la technique d'analyse sont autant de facteurs influençant les résultats. De plus, un résultat biologique ne doit pas être interprété en dehors du contexte clinique et des conditions d'analyse.

La voie vers la standardisation et la reproductibilité inter- et intra-laboratoires des résultats ne pourra être atteinte que par une harmonisation de ces différents facteurs de variabilité et par l'application de pratiques consensuelles lors de la détermination des protocoles analytiques. Le but de ces efforts est de mettre en place un consensus de bonnes pratiques, de les intégrer dans une démarche de qualité (23) et de permettre de futures études multicentriques et/ou longitudinales.

## RÉFÉRENCES

- ADAMS DH, SHAW S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet*, 1994 ; 343 : 831-36.
- CARLOS TM, HARLAN JM. Leucocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Blood*, 1994 ; 84 : 2068-101.
- GRANGER DN, KUBES P. The microcirculation and inflammation : modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*, 1994 ; 55 : 662-75.
- NOURSHARGH S. Interactions between granulocytes and endothelium. In *Immunological Aspects of the Vascular Endothelium*. Ed by C.O.S Savage, J.D Rearson. Reviews in Clinical Immunology. Cambridge 1995.
- VIEDMA CONTRERAS JA. Leukocyte activation markers in clinical practice. *Clin Chem Lab Med*, 1999 ; 37 : 607-22.
- BELLOC F, VINCENTEAU P, FREYBURGER G, DUMAIN P, BOISSEAU MR. Flow cytometric study of the activation of polymorphonuclear cells. *J Leukoc Biol*, 1990 ; 48 : 353-8.
- FREYBURGER G, LABROUCHE S. Flow cytometry assessment of leukocyte functions in vascular pathologies. *Hematol Cell Ther*, 1996 ; 38 : 513-26.
- PONCELET P, GEORGE F, PAPA S, LANZA F. Quantification of hematopoietic cell antigens in flow cytometry. *Eur J Histochem*, 1996 ; 40 : 15-32.
- HAMBLIN A, TAYLOR M, BERNHAGEN J, SHAKOOR Z, MAYALL S, NOBLE G, MCCARTHY D. A method of preparing blood leukocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leukocyte integrins. *J Immunol Methods*, 1992 ; 146 : 219-28.

10. MACEY MG, MCCARTHY DA. Quantification of adhesion molecules and other function associated antigens on human peripheral blood leukocytes. *Cytometry*, 1993 ; 14 : 898-908.
11. FERRANTE A, THONG YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human peripheral blood by the Ficoll-Hypaque method. *J Immunol Methods*, 1980 ; 36 : 109-15.
12. BIKOUE A, GEORGE F, PONCELET P, MUTIN M, JANOSSY G, SAMPOL J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression : normal adult values. *Cytometry*, 1996 ; 26 : 137-47.
13. BARNETT D, STORIE I, WILSON GA, GRANGER V, REILLY JT. Determination of leukocyte binding capacity (ABC) : the need for standardization. *Clin Lab Haematol*, 1998 ; 20 : 155-64.
14. REPO H, JANSSON SE, LEIRISALO-REPO M. Anticoagulant selection influences flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J Immunol Methods*, 1995 ; 185 : 65-79.
15. LINK A, HUMMEL B, SCHWERDT H, SCHWAMBORN J, JUNG F, SCHIEFFER H. Influence of neutrophil separation on the expression of adhesion molecules. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1997 ; 17 : 175-80.
16. MACEY MG, JIANG XP, VEYS P, MCCARTHY D, NEWLAND AC. Expression of functional antigens on neutrophils : effects of preparation. *J Immunol Methods*, 1992 ; 149 : 37-42.
17. ZÄHLER S, KOWALSKI C, BROSIG A, KUPATT C, BECKER BF, GERLACH E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods*, 1997 ; 200 : 173-79.
18. MCCARTHY DA, MACEY MG, CAHILL MR, NEWLAND AC. Effect of fixation on quantification of the expression of leukocyte function-associated surface antigens. *Cytometry*, 1994 ; 17 : 39-49.
19. FEARON DT, COLLINS LA. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. *J Immunol*, 1983 ; 130 : 370-75.
20. YOUSSEF PP, MANTZIORIS BX, ROBERTS-THOMSON PJ, AHERN MJ, SMITH MD. Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. *J Immunol Methods*, 1995 ; 186 : 217-24.
21. REPO R, JANSSON SE, LEIRISALO-REPO M. Flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo. *J Immunol Methods*, 1993 ; 164 : 193-202.
22. FORSYTH KD, LEVINSKY RJ. Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Methods*, 1990 ; 128 : 159-65.
23. D'HAUTCOURT JL. Quality control procedures for flow cytometric applications in the hematology laboratory. *Hematol Cell Ther*, 1996 ; 38 : 467-70.

## II- EXPRESSION QUANTITATIVE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN A L'ETAT BASAL ET APRES STIMULATION

### Article 2

**LATGER V**, REGNAULT V, DUMAS D, VIRION JM, SCHOONEMAN JF, STOLTZ JF, LECOMPTE T.

Utilisation d'un calibrateur pour quantifier les récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile par cytométrie en flux.

Annales de Biologie Clinique, 2000, 58 : 337-343.

Ce travail se propose de présenter l'outil d'étalonnage que représentent les billes de calibration pour la quantification de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN dans différents états de stimulation. Il est mesuré l'expression quantitative de ces récepteurs d'adhérence pour des PNN provenant de sang total, immédiatement analysés après prélèvement et pour des PNN stimulés par des agonistes prépondérants de la réaction inflammatoire, soit le fMLP et le TNF $\alpha$ . Les variations obtenues, à savoir la diminution de l'expression de CD62L associée à l'augmentation de celle des  $\beta_2$  intégrines sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature. La possibilité de disposer de valeurs quantitatives, exprimées en nombre de sites antigéniques reconnus par l'anticorps monoclonal, présente l'avantage de pouvoir entreprendre des études comparatives dans le cadre d'un protocole standardisé, ce qui n'a jamais été possible jusqu'à ce jour. Ce travail permet de présenter les différents avantages et limites de ce nouvel outil de quantification antigénique. Il permet également d'introduire tout l'intérêt de cette nouvelle approche méthodologique pour évaluer l'état fonctionnel cellulaire. C'est la nouvelle notion de "phénotypage quantitatif" qui sera abordée dans l'article suivant.

## Utilisation d'un calibrateur pour quantifier les récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile par cytométrie en flux

V. Latger-Cannard<sup>1, 2</sup>

V. Regnault<sup>2</sup>

D. Dumas<sup>2</sup>

J.-M. Virion<sup>3</sup>

J.-F. Schooneman<sup>4</sup>

J.-F. Stoltz<sup>2</sup>

T. Lecompte<sup>1, 2</sup>

**Résumé.** Les récepteurs d'adhérence représentent un élément essentiel aux interactions cellulaires hétérotypiques (cellule endothéliale, plaquettes) du polynucléaire neutrophile. La connaissance de leur niveau d'expression apporte des renseignements sur l'état d'activation et la fonctionnalité du polynucléaire neutrophile. L'utilisation de la cytométrie en flux associée à un calibrateur de l'immunomarquage, représenté par des billes de latex recouvertes de quantités déterminées d'immunoglobulines (Qifikit®, Dako), permet de mesurer la capacité liante de l'anticorps spécifique et donc de renseigner sur la densité antigénique du récepteur analysé. L'application de cette méthodologie à l'exploration des principaux récepteurs d'adhérence, la L-sélectine (CD62L) et les  $\beta_2$ -intégrines (CD11a-c/CD18), à la surface de polynucléaires neutrophiles au repos et incubés en présence des stimulus pro-inflammatoires, le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) et le *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), permet d'une part d'obtenir des valeurs d'expression basale et d'autre part d'étudier la réactivité des polynucléaires neutrophiles. Cette méthode de quantification est applicable à de nombreux domaines cliniques comme le diagnostic des déficits en récepteurs d'adhérence, les pathologies inflammatoire, infectieuse ou thrombotique.

**Mots clés :** Polynucléaire neutrophile – Récepteurs d'adhérence – Cytométrie en flux – Calibrateur.

**Summary.** Adherence receptors are essential for heterotypic (endothelial cell, platelet) polymorphonuclear neutrophil (PMN) interaction. Determination of their expression level give information about activation state and functionality of PMN. Use of flow cytometry associated with an immunolabeling standard, represented by beads coated by a determined amount of immunoglobulins (Qifikit®, Dako), allows analysis of specific antibody binding capacity and gives information about antigen density. Using this methodology, the exploration of surface adherence receptors, L-selectin (CD62L) and  $\beta_2$ -integrins (CD11a-c/CD18) from PMN unstimulated and incubated with pro-inflammatory stimuli, formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) and *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), allows, on the one hand, the establishment of basal expression values on resting PNN and on the other hand, the study of PNN reactivity. This method of quantification can be applied to clinical studies as adherence receptor deficiency syndromes or inflammatory, infectious and vascular diseases.

**Key words:** Polymorphonuclear neutrophil – Adherence receptors – Flow cytometry – Immunolabeling standard.

<sup>1</sup> Laboratoire d'hématologie, CHU Nancy, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

<sup>2</sup> Laboratoire d'angio-hématologie, UMR CNRS 7563 Faculté de Médecine, Nancy

<sup>3</sup> Service d'épidémiologie et d'évaluation clinique, Hôpital Marin, CHU Nancy

<sup>4</sup> EFS, Nancy

Article reçu le 4 février 2000,  
accepté le 24 février 2000.

Pour assurer son rôle de défense de l'organisme, le polynucléaire neutrophile doit adhérer à l'endothélium, traverser la barrière endothéliale (diapédèse) et, attiré par des facteurs chimiotactiques, migrer vers le lieu de des-

truction de sa cible. Cette adhérence hétérotypique polynucléaires neutrophiles-cellules endothéliales se déroule en deux temps [1, 2]. Dans une première phase dite de « roulement lent », la sélectine leucocytaire (CD62L)

interagit avec les sialomucines fucosylées et sialylées (sialyl Lewis<sup>x</sup>) endothéliales. De nombreux stimulus de la réaction inflammatoire (cytokines, chémokines, facteurs de croissance) agissent alors sur les cellules endothéliales et les polynucléaires neutrophiles afin d'induire des changements quantitatifs et qualitatifs de leurs récepteurs. Ces variations vont permettre aux polynucléaires neutrophiles de devenir fermement adhérents aux cellules endothéliales. Cette deuxième étape implique les intégrines leucocytaires CD11a,b,c/CD18, structures hétérodimériques (classe des  $\beta_2$ -intégrines), qui ont pour ligands des membres de la superfamille des immunoglobulines. Ainsi recruté, le polynucléaire neutrophile entame sa diapédèse et est attiré par des facteurs chimiotactiques vers sa cible pour y exercer ses fonctions de phagocytose et de bactéricidie.

La quantification de l'expression de ces différents récepteurs d'adhérence apporte des renseignements directs sur les propriétés adhésives des polynucléaires neutrophiles ainsi que sur leur état d'activation. La cytométrie en flux, de par ses possibilités d'analyse multiparamétrique d'un grand nombre de cellules, est tout à fait adaptée à la mesure de l'expression antigénique [3]. Cependant, jusqu'à présent, ses résultats n'ont été donnés qu'en pourcentages de cellules positives ou en intensités moyennes de fluorescence (IMF) par rapport à un contrôle négatif. Le seuil de positivité sur l'échelle logarithmique de fluorescence, comprenant quatre décades, est arbitrairement fixé à  $10^1$ . La positivité de fluorescence est fixée par rapport à l'auto-fluorescence d'une population cellulaire, qui varie pour chaque type et état cellulaire, et cela conduit à régler en conséquence la valeur du gain du photomultiplicateur pour chaque expérience. Cette méthodologie est donc peu adaptée à des études multicentriques et/ou longitudinales.

Dans ce travail, nous avons utilisé un calibrateur de l'immunomarquage (Qifikit<sup>®</sup>, Dako) pour améliorer la reproductibilité et la standardisation de la quantification de l'expression antigénique. Ce système permet d'éliminer les variations liées à la mesure de la fluorescence et d'exprimer les résultats en capacité de liaison de l'anticorps (CLA) [4]. Nous avons appliqué cette quantification aux principaux récepteurs d'adhérence leucocytaire : la L-sélectine (CD62L) et les  $\beta_2$ -intégrines (CD11a,b,c/CD18). Afin d'étudier la réactivité cellulaire *in vitro*, l'expression membranaire de ces récepteurs a été quantifiée avant et après activation des polynucléaires neutrophiles par des stimulus pro-inflammatoires, le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) et le *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

## Matériels et méthodes

### Sujets

Le sang a été donné par 20 adultes sains (âge moyen de 40 ans, sex-ratio = 1), en début de don transfusionnel. L'interrogatoire a permis d'éliminer un syndrome inflammatoire, une infection ou toute prise médicamenteuse (excepté la prise d'œstroprogestatif par voie orale). Les échantillons veineux sont prélevés au niveau du pli du coude, dans des tubes Vacutainer (Becton-Dickinson) contenant 54  $\mu$ l d'une solution à 0,339 mol/L d'EDTA tripotassique (acide éthylène-diamine-tétraacétique), remplis à 5 ml.

### Stimulation des cellules

Le sang total de chaque donneur est incubé en présence de TNF $\alpha$  (Sigma, 100 UI/ml final) ou de fMLP (Sigma,  $10^{-7}$  M final), à 37 °C, pendant une heure. Une agitation manuelle des tubes est réalisée régulièrement (toutes les 15 min).

### Immunomarquage et quantification par cytométrie en flux

Après un lavage cellulaire par ajout du même volume d'une solution tamponnée saline isotonique (Cell Wash, Becton-Dickinson), suivi d'une centrifugation à 300 g durant 10 min et de l'élimination du surnageant par renversement du tube, les cellules sont suspendues dans du PBS isotonique. Puis elles sont marquées selon une réaction d'immunofluorescence indirecte en concentrations données comme saturantes par le fabricant. Cent microlitres de suspension cellulaire ( $10^6$  cellules/ml) sont incubés 45 min, à l'obscurité et à température ambiante, avec 10  $\mu$ l d'anticorps monoclonal murin primaire : anti-CD62L (FMC46, Dako), anti-CD11a (MHM24, Dako), anti-CD11b (2LPM19c, Dako), anti-CD11c (KB90, Dako) et anti-CD18 (MHM23, Dako). Après une étape de lavage avec la même solution tampon, 100  $\mu$ l d'anticorps de révélation, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'IgG de chèvre anti-souris (F0479, Dako) conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), dilués au 1/20<sup>e</sup>, sont ajoutés dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'anticorps primaire. Après une lyse érythrocytaire, par augmentation de la pression osmotique intracellulaire à base de chlorure d'ammonium (Ortho-mune<sup>™</sup> Lysing Reagent, Ortho Diagnostic System), et après un second lavage avec la solution tampon saline (Cell Wash, Becton-Dickinson), les cellules sont analysées à l'aide d'un cytomètre en flux de type FACScan (Becton-Dickinson). Les polynucléaires neutrophiles sont identifiés selon leurs caractères morpho-

métriques (taille/granularité). L'intensité moyenne de fluorescence (IMF), mesurée pour chaque marqueur, est convertie en CLA (*figure 1*) en utilisant le calibrateur Qifikit® (Dako), c'est-à-dire des billes de latex (simulant les cellules), recouvertes de quantités croissantes et connues d'immunoglobulines de souris (qui seront reconnues par l'anticorps de révélation) [4].

### Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type. Les comparaisons entre les valeurs trouvées pour les polynucléaires neutrophiles stimulés par rapport à celles trouvées pour les polynucléaires neutrophiles non stimulés sont évaluées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis [5] du fait du faible échantillonnage ; les différences sont considérées significatives pour  $p < 0,05$ .

## Résultats

Les polynucléaires neutrophiles sont facilement identifiés sur la représentation morphométrique en raison de leur grande taille et de leur importante granulométrie (région R1 de la *figure 1*). La *figure 2* montre la distribution gaussienne des histogrammes de fluorescence représentant l'expression des différentes molécules d'adhérence explorées, avant et après stimulation des polynucléaires neutrophiles, ce qui permet de mesurer l'IMF de chaque marqueur. L'ensemble des valeurs d'IMF mesurées se situent dans la gamme de fluorescence définie par les billes, ce qui permet d'exprimer les résultats en CLA sans extrapolation. L'expression des récepteurs d'adhérence étudiés à partir de polynucléaires neutrophiles analysés en sang total est indiquée dans le *tableau 1*. Leur niveau d'expression basale est caractérisé par leur hétérogénéité : CD62L, récepteur principal de la phase de roulement et CD11b, récepteur essentiel à la phase d'adhérence ferme, sont les antigènes majoritairement représentés avec respectivement  $33,5 \times 10^3$  CLA/cellule et  $40,8 \times 10^3$  CLA/cellule. Concernant l'expression des  $\beta_2$ -intégrines, il est à noter que la somme de l'expression des chaînes  $\alpha$  (CD11a,b,c) ne correspond pas à l'expression totale de la chaîne  $\beta$  (CD18) ; le ratio  $\alpha/\beta$  est d'environ 2 et non de 1 comme le laisse prévoir leur structure hétérodimérique de stœchiométrie 1:1.

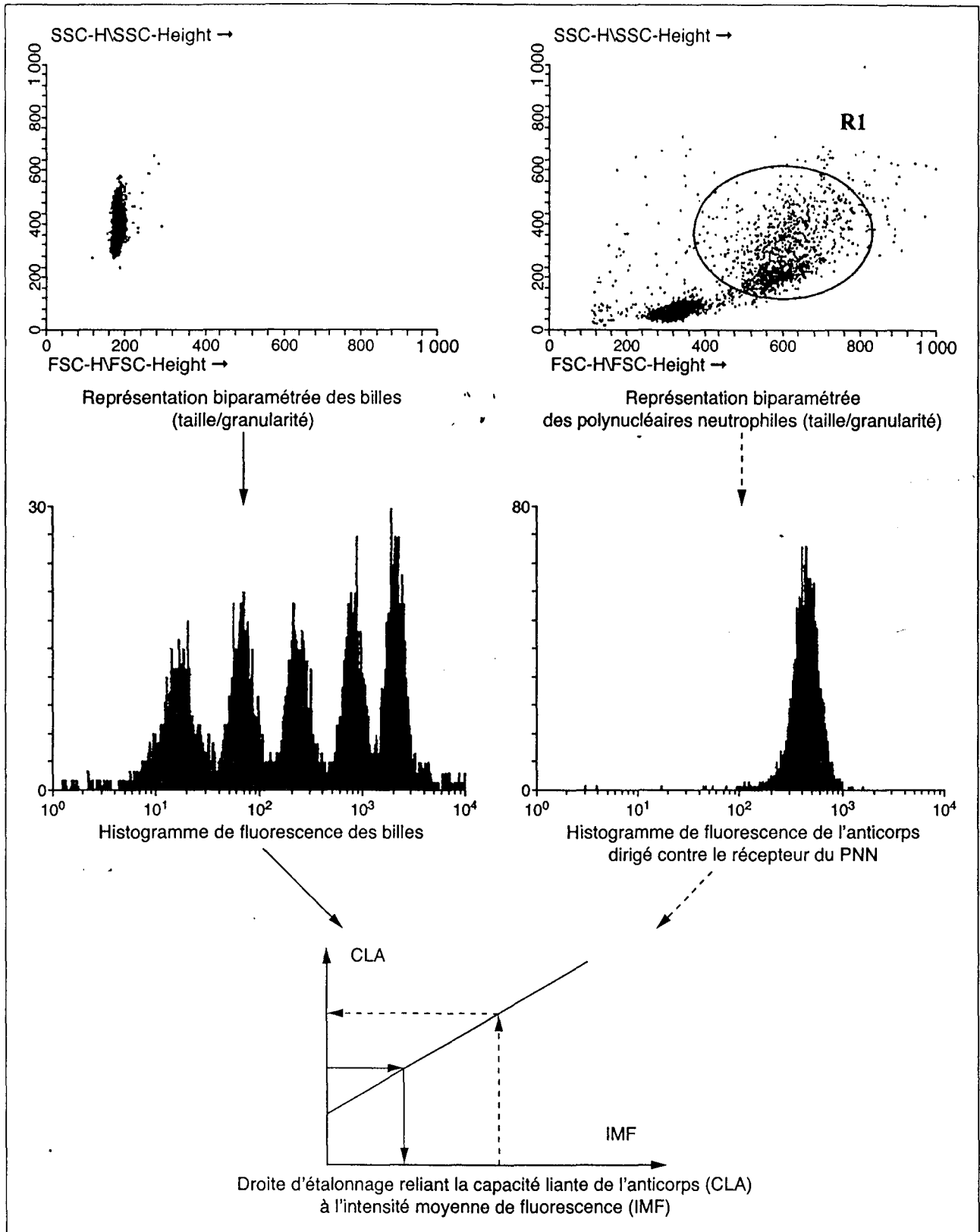
La stimulation des polynucléaires neutrophiles par le TNF $\alpha$  ou par le fMLP (*tableau 1*) entraîne une variation de l'expression des récepteurs à la surface de la totalité des polynucléaires neutrophiles analysés. La

*figure 2* met en évidence, pour chaque marqueur, un déplacement global de tout le pic qui conserve sa distribution gaussienne : il n'existe donc pas d'hétérogénéité de réponse des polynucléaires neutrophiles aux stimulus pro-inflammatoires étudiés, dans ces conditions analytiques. Ces variations sont toutes statistiquement significatives, excepté pour CD11a, après stimulation par le fMLP. Il est noté une décroissance importante de l'expression membranaire de CD62L associée à une augmentation concomitante de celle des  $\beta_2$ -intégrines (CD11a,b,c/CD18). Le récepteur de la phase de roulement, le CD62L, devient quasiment indétectable après incubation des polynucléaires neutrophiles par le fMLP ou le TNF $\alpha$  (aux conditions de concentrations étudiées), ce qui correspond à un phénotype d'activation leucocytaire importante. Pour les  $\beta_2$ -intégrines, il est à noter que, pour les stimulus explorés, le ratio de réactivité, défini par le rapport expression après stimulation/expression avant stimulation, est quasi similaire pour les marqueurs, excepté pour CD11a : pour le fMLP, les rapports sont de 2,7, 2,4 et 2,7 pour respectivement CD11b, CD11c, CD18 et sont de 2,0, 1,4, 1,6 après stimulation par le TNF $\alpha$ . Le rapport des chaînes  $\alpha/\beta$  est conservé après stimulation, puisqu'il est de 1,9 pour le fMLP et de 2,3 pour le TNF $\alpha$ .

## Discussion

Le but de cette étude a été, dans un premier temps, de déterminer l'expression basale des principaux récepteurs d'adhérence, à partir de polynucléaires neutrophiles analysés en sang total. Dans un second temps, ce travail a porté sur la mise en évidence quantitative de la réactivité des polynucléaires neutrophiles, par mesure cytométrique de ces récepteurs d'adhérence après stimulation des polynucléaires neutrophiles par des stimulus pro-inflammatoires comme le fMLP et le TNF $\alpha$ . La particularité de ce travail consiste en l'utilisation d'un calibrateur de l'immunomarquage associée à la cytométrie en flux, permettant d'exprimer les résultats en CLA. La cytométrie en flux est une technique simple, rapide (1 heure 30), réalisable à partir d'un faible volume sanguin (applicable aux prélèvements pédiatriques). L'introduction dans la technique d'immunomarquage des billes de calibration permet d'uniformiser la mesure de la fluorescence des cellules immuno-marquées, offre la possibilité de mesurer et de comparer des CLA indépendamment du réglage des photomultiplicateurs du cytomètre [6], ce qui permet





**Tableau 1.** Expression quantitative des molécules d'adhérence à la surface des polynucléaires neutrophiles « non stimulés » et stimulés par du fMLP et par du TNF $\alpha$ . Les résultats (moyenne, écart-type) sont exprimés en capacité liante de l'anticorps par cellule ( $\times 10^3$  CLA/cellule). Les comparaisons entre les valeurs trouvées pour les polynucléaires neutrophiles stimulés par rapport à celles trouvées pour les polynucléaires neutrophiles non stimulés sont évaluées à l'aide du test de variance de Kruskal-Wallis ; les différences sont considérées significatives pour  $p < 0,05$

| Polynucléaires neutrophiles non stimulés | Stimulation par le fMLP          | Stimulation par le TNF $\alpha$ |
|--|----------------------------------|---------------------------------|
| CD62L                                    | 2,3 $\pm$ 1,2 ( $p < 0,001$ )    | 1,0 $\pm$ 0,6 ( $p < 0,001$ )   |
| CD11a                                    | 15,0 $\pm$ 4,1 ( $p = 0,347$ )   | 8,4 $\pm$ 1,3 ( $p < 0,001$ )   |
| CD11b                                    | 112,1 $\pm$ 27,4 ( $p < 0,001$ ) | 81,5 $\pm$ 22,6 ( $p < 0,001$ ) |
| CD11c                                    | 12,7 $\pm$ 3,8 ( $p < 0,001$ )   | 7,7 $\pm$ 1,8 ( $p = 0,005$ )   |
| CD18                                     | 72,4 $\pm$ 22,5 ( $p < 0,001$ )  | 42,7 $\pm$ 7,0 ( $p = 0,007$ )  |

CLA : capacité liante de l'anticorps ; IMF : intensité moyenne de fluorescence ; fMLP : formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine ; TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$ .

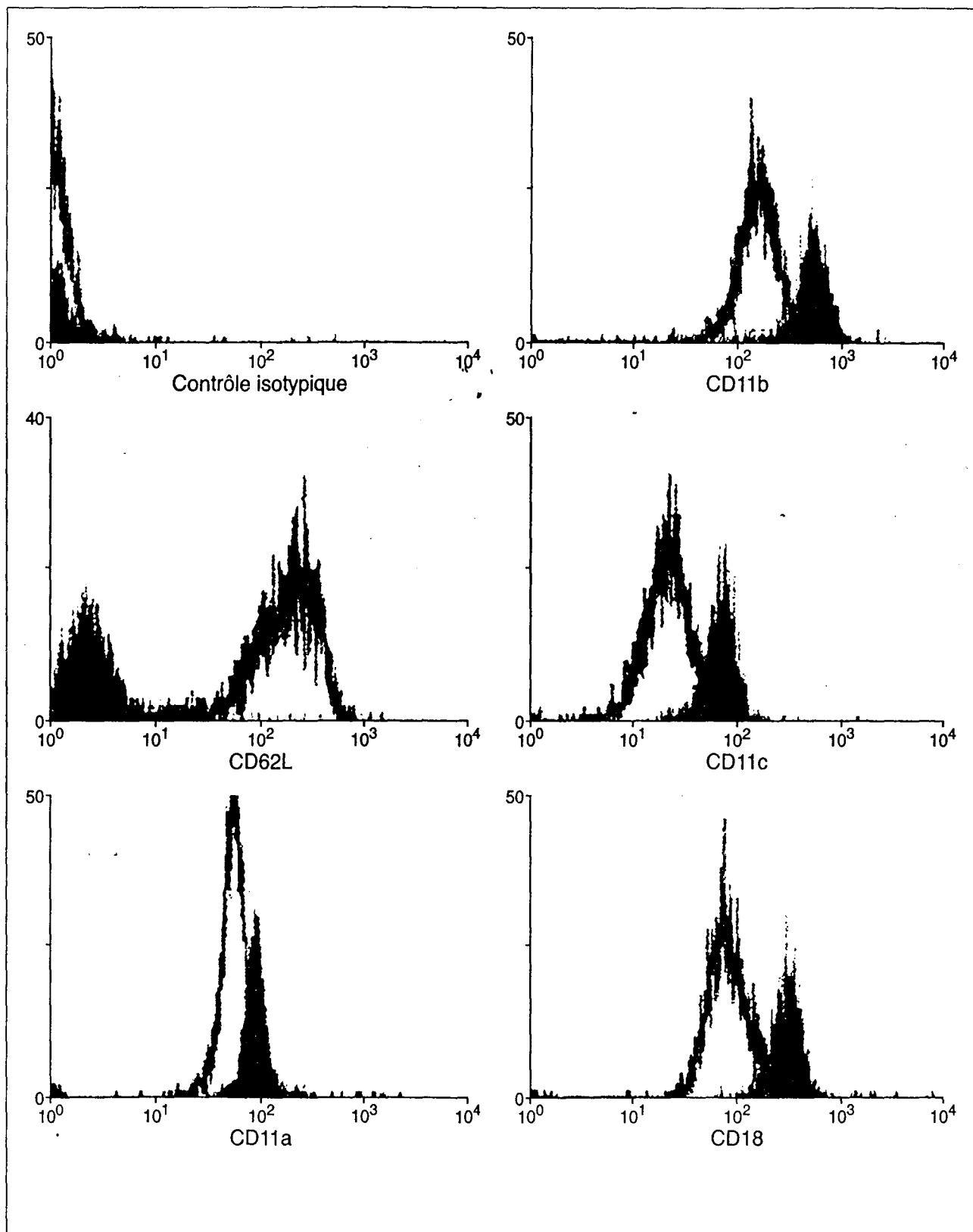
de faire la moyenne des valeurs provenant d'expériences et de laboratoires différents. Par ailleurs, en conditions saturantes, la fixation du fragment F(ab')<sub>2</sub> est théoriquement considérée comme monovalente ; ainsi la mesure de la CLA par cellule reflète la densité antigénique du récepteur étudié [4], à condition que l'anticorps primaire se fixe de façon monovalente à son antigène. Ces systèmes de calibrage ouvrent donc la voie vers la standardisation intra et interlaboratoires. Les valeurs d'expression basale des principaux récepteurs d'adhérence obtenues pour des sujets sains sont établies, dans ce travail, à partir d'un trop faible effectif pour être proposées comme valeurs de référence. Cependant, l'application d'un protocole analytique déterminé et du même système de calibrage dans des laboratoires dotés de cytomètres différents, offre la possibilité d'études multicentriques et/ou longitudinales [6]. La cytométrie quantitative répond à une nécessité d'uniformisation de la mesure antigénique, mais il ne faut pas oublier que les techniques d'immunomarquage résultent de la reconnaissance d'un site épitopique précis, unique ou répété, par un anticorps monoclonal déterminé. D'ailleurs, il n'a pas été observé d'adéquation entre la somme des CLA mesurées pour les chaînes  $\alpha$  des intégrines (CD11a,b,c) et la valeur trouvée pour les chaînes  $\beta$  (CD18) comme le laisse prévoir leur structure hétérodimérique de stœchiométrie 1:1. La présence d'un rapport  $\alpha/\beta$  égal à 2 peut être expliquée en considérant comme étant bivalente la liaison de l'anticorps reconnaissant la chaîne  $\beta$ , et monovalente la liaison de l'anticorps dirigé contre les chaînes  $\alpha$ .

**Figure.** Utilisation des billes de calibration de la fluorescence (Qifikit®, Dako) : l'analyse des billes, repérées selon les paramètres morphométriques (taille/granularité) permet de construire une droite de régression reliant la capacité liante de l'anticorps (CLA) à l'intensité moyenne de fluorescence (IMF). La CLA spécifique des anticorps antirécepteurs d'adhérence est déduite de cette droite, par conversion de l'IMF mesurée à partir des polynucléaires neutrophiles.

L'activation des polynucléaires neutrophiles par des stimulus inflammatoires entraîne des variations quantitatives des récepteurs d'adhérence. La L-sélectine n'est pratiquement plus détectable après activation ; ce phénomène est expliqué dans la littérature par un clivage de la partie extramembranaire par une protéase endogène dont la finalité serait de limiter le recrutement leucocytaire et ainsi d'éviter l'emballement de la réaction inflammatoire [1, 2]. L'expression membranaire des  $\beta_2$ -intégrines augmente, pour un stimulus donné, dans une même proportion (excepté CD11a). Ces données rejoignent tout à fait les données de la littérature puisque Todd *et al.* [7] décrivaient, dès 1984, une augmentation rapide de l'expression de ces molécules à la surface des polynucléaires neutrophiles, pouvant atteindre dix fois la valeur basale et qui serait consécutive à une mobilisation du pool intracellulaire, par translocation vers la membrane, des glycoprotéines contenues dans les granulations spécifiques. Le rapport de CLA de l'ordre de 1 pour CD11a est également en accord avec la littérature. Il est décrit pour ce récepteur une variation d'avidité, sans variation quantitative. La régulation de ce récepteur consisterait en une modulation conformationnelle associée à un regroupement polaire [2].

De nombreux domaines cliniques impliquent ces récepteurs d'adhérence. Une première application concerne la détection des syndromes déficitaires de l'expression de ces récepteurs d'adhérence. Le type 1, de transmission autosomique récessif [8], est lié à une mutation du gène codant pour CD18, ce qui entraîne un déficit variable des trois  $\beta_2$ -intégrines (CD11a-c/CD18). La quantification des récepteurs d'adhérence permet d'établir le diagnostic ainsi que de déterminer le niveau d'expression résiduel.

Un autre domaine d'application clinique est représenté par la pathologie inflammatoire aiguë ou chronique (polyarthrite rhumatoïde, lupus systémique). Il a été



◀ **Figure 2.** Histogrammes de fluorescence des récepteurs d'adhérence avant (pics noirs) et après activation par le stimulus inflammatoire fMLP ( $10^{-7}$  M, 1 heure, 37 °C) (pics gris).

trouvé une corrélation positive entre l'expression membranaire de CD11b/CD18 et l'activité de la maladie lupique [9].

Les recherches concernant la pathogénèse des maladies vasculaires s'orientent actuellement vers l'exploration cellulaire : l'étude du phénotype adhésif par quantification des récepteurs d'adhérence représente une approche dans l'évaluation du risque ischémique [10]. Enfin, cette quantification offre la possibilité de mesurer directement le taux d'occupation des antigènes par des composants immunologiques dirigés contre ces récepteurs d'adhérence, utilisés comme thérapeutique dans des pathologies inflammatoires, vasculaires ou en postgreffe afin de limiter la réaction inflammatoire.

## Conclusion

L'utilisation de la cytométrie en flux en association avec un calibrateur de l'immunomarquage permet de répondre partiellement à des besoins de standardisation intra et interlaboratoire(s) de l'analyse cytométrique et propose une approche fonctionnelle cellulaire par la mesure de la densité antigénique de récepteurs d'adhérence, reflet de l'état d'activation des polynucléaires neutrophiles. Des études sur un collectif plus large permettraient de disposer de valeurs de référence pour de futures études cliniques concernant ces récepteurs d'adhérence dans des domaines aussi vastes que les

syndromes déficitaires, les pathologies inflammatoire, infectieuse ou thrombotique.

**Remerciements.** À M. le Professeur C. Vigneron (Laboratoire d'hématologie, Explorations cellulaires fonctionnelles, CHU Nancy) pour la relecture de ce travail ainsi qu'à tous les techniciens du laboratoire d'hématologie-cytologie. Une pensée à M. J.-J. Robin.

## Références

1. Adams DH, Shaw S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet* 1994 ; 343 : 831-6.
2. Carlos TM, Harlan JM. Leucocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994 ; 84 : 2068-3101.
3. Belloc F, Vincendeau P, Freyburger G, Dumain P, Boisseau MR. Flow cytometric study of the activation of polymorphonuclear cells. *J Leuc Biol* 1990 ; 48 : 353-8.
4. Poncelet P, George F, Papa S, Lanza F. Quantitation of hematopoietic cell antigens in flow cytometry. *Europ J Histochem* 1996 ; 40 : 15-32.
5. Dixon WJ. *BMDP statistical software manual*. In : Berkeley, CA : University of California Press and John Wiley & sons, Inc, 1992.
6. Lenkei R, Gratama JW, Rothe G, et al. Performance of calibration standards for antigen quantification with flow cytometry. *Cytometry* 1999 ; 33 : 188-96.
7. Todd RF, Amaout MA, Rosin RE, Crowley CA, Peters WA, Babior BM. Subcellular location of the large subunit of Mol (Mola ; formerly gp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1984 ; 74 : 1280-90.
8. Etzioni A, Doerschuk C, Harlan JM. Of man and mouse : leukocyte and endothelial adhesion molecules deficiencies. *Blood* 1999 ; 94 : 3281-8.
9. Buyon JP, Shadick N, Berkman R. Surface expression of Gp 165/95, the complement receptor CR3, as a marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Immun Immunopath* 1988 ; 46 : 141-9.
10. Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, et al. Clinical and angiographic correlates of leukocyte activation in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1995 ; 26 : 1146-50.

### Article 3

**LATGER V**, DUMAS D, LECOMPTE T, POTRON G, STOLTZ JF.

Pathologie vasculaire et activation cellulaire : exploration du phénotype cellulaire adhérent par cytométrie quantitative.

Journal des Maladies Vasculaires, 1999, 24 : 11-18.

Après avoir montré, dans le travail précédent, l'intérêt de la cytométrie quantitative dans l'approche du phénotype fonctionnel cellulaire, cet article se propose de présenter les différentes situations de la pathologie vasculaire dont la compréhension de leur pathogénie pourrait bénéficier de cette nouvelle approche méthodologique. Il est rappelé, dans un premier temps, l'implication des différents acteurs cellulaires intervenant dans ce cadre pathologique et en particulier, les leucocytes, les plaquettes et des cellules endothéliales. L'ensemble de ces cellules agissent selon un modèle de régulation similaire en modifiant leur "phénotype adhérent" *via* la régulation de l'expression de leurs récepteurs d'adhérence. Cette régulation, mise en œuvre par un ensemble complexe de médiateurs systémiques, leur permet d'orienter leurs lieu et mode d'action. La dysrégulation de cet équilibre subtil peut être à l'origine d'un état thrombotique.

Dans ce travail, il est ainsi abordé différents aspects de la pathologie vasculaire : les accidents ischémiques coronaires (angor instable et infarctus du myocarde), l'angioplastie coronaire transluminale, les angiopathies diabétiques, la pré-éclampsie gravidique. Ces situations sont toutes associées à une dysrégulation cellulaire et il est montré comment la cytométrie quantitative pouvait présenter une nouvelle approche de la mesure du "profil phénotypique d'activation" cellulaire. De plus, la cytométrie quantitative permet de proposer une méthode de surveillance de nouveaux agents thérapeutiques dirigés contre ces récepteurs d'adhérence.

MISES AU POINT

**PATHOLOGIE VASCULAIRE  
ET ACTIVATION CELLULAIRE**

**Exploration du phénotype cellulaire adhérent  
par cytométrie en flux quantitative**

V. LATGER (1, 2), D. DUMAS (1), T. LECOMPTE (1, 2), G. POTRON (3), J.F. STOLTZ (1, 4)

(1) *Angio-Hémato-Hémorhéologie, LEMTA, UMR CNRS 7563 Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex,*

(2) *Hématologie Biologique, CHU Nancy,*

(3) *Laboratoire Central d'Hématologie, CHU Robert Debré, 51092 Reims,*

(4) *Banque de tissus, CHU Nancy.*

RÉSUMÉ :

**Pathologie vasculaire et activation cellulaire : exploration du phénotype cellulaire adhérent par cytométrie en flux quantitative.**

La pathogénèse des maladies vasculaires athéromateuses et thrombotiques fait intervenir aussi bien des facteurs rhéologiques que des médiateurs solubles ou des éléments cellulaires. Les études cherchant à établir des corrélations entre facteurs plasmatiques, contraintes de cisaillement et risque ischémique laissent encore des points obscurs. Les moyens d'exploration récents soulignent le rôle cellulaire déterminant. Ainsi les cellules modulent l'expression membranaire des molécules d'adhérence, ce qui leur permet de dialoguer de façon homo ou hétérotypique. La quantification des molécules d'adhérence à la surface des plaquettes, leucocytes et cellules endothéliales permet une évaluation de leur « profil phénotypique adhérent ». La cytométrie quantitative, utilisant des calibrants sous forme de billes greffées en quantité connue d'immunoglobulines, est, de par ses possibilités d'analyses multiparamétriques, couplée à la spécificité des anticorps monoclonaux, tout à fait adaptée pour quantifier les antigènes membranaires. L'évaluation du profil adhérent à la surface des cellules impliquées dans les maladies vasculaires permet de corrélérer ce phénotype au risque ischémique dans des pathologies ou circonstances telles que l'angor instable, l'infarctus du myocarde, la réalisation d'angioplasties, le diabète sucré ou la pré-éclampsie. De plus, la quantification permet la surveillance de nouveaux agents thérapeutiques dirigés contre les molécules d'adhérence.

*Mots-clés :* Pathologie vasculaire. Molécules d'adhérence. Cytométrie quantitative.

ABSTRACT :

**Vascular disease and cell activation : exploration of cell adhesion phenotype by quantitative flow cytometry.**

The pathogenesis of atheromatous and/or thrombotic vascular diseases involves rheological parameters, soluble mediators and cellular agents. The many studies that have tried to establish correlations between plasma factors, shear stress and the risk of ischemia have left some questions unanswered. Current exploration methods are now focusing on the determining role of cells. Activated cells express adhesion molecules on their membranes, which allow to communicate in a homo- or heterotypical manner. Quantifying adherence molecules on the surface of platelets, leukocytes and endothelial cells provides an assessment of the "adhesive phenotypical profile". Quantitative cytometry, using beads coated with a known amount of immunoglobulins as calibrators, is perfectly suited, through its multiple parameter analyses and the specificity provided by monoclonal antibodies, for the quantification of membrane antigens. Measuring the adhesive profile on the surface of cells that are implicated in vascular disease makes it possible to correlate that phenotype to the ischemic risk in such diversified pathologies or circumstances as intermittent angor, myocardial infarction, angioplasty, insulin-dependent diabetes or pre-eclampsia. In addition, that quantification permits monitoring the action of new therapeutical agents targeting adherence molecules.

*Key-words :* Vascular disease. Adherence molecule. Quantitative cytometry.

---

Communication présentée à la Session d'Hémorhéologie clinique sur « Les traitements hémorhéologiques en pathologie vasculaire » au XXXII<sup>e</sup> congrès du Collège Français de Pathologie Vasculaire » (Paris, le 18 mars 1998).

---

Reçu le 30 juin 1998.

Acceptation par le Comité de Rédaction le 27 juillet 1998.

*Tirés à part :* V. LATGER, adresse ci-dessus.

## INTRODUCTION

La fluidité sanguine physiologique est assurée par un subtil équilibre entre cellules endothéliales, cellules circulantes (plaquettes, leucocytes, hématies), et facteurs plasmatiques. La pathologie vasculaire résulte d'une perturbation d'un ou de plusieurs éléments de ce tryptique.

Les différentes cellules en présence communiquent entre elles par un réseau complexe de signaux de nature soluble ou par des jeux de reconnaissances cellulaires homotypiques et/ou hétérotypiques assurées par une mosaïque de récepteurs membranaires. Les cellules modulent l'expression de ces molécules d'adhérence selon leur fonctionnalité. La détermination de leur phénotype par quantification des molécules d'adhérence permet d'obtenir une évaluation de leur état d'activation et de leur potentialités réactives, et d'apporter des arguments sur le rôle des cellules vasculaires et circulantes dans la genèse des maladies vasculaires.

Ce travail entend se focaliser sur les molécules d'adhérence exprimées par les cellules endothéliales, les plaquettes et les neutrophiles, lors de leur activation. Après un rappel descriptif sur les molécules d'adhérence, nous décrirons la méthodologie adaptée à leur quantification par cytométrie en flux et rapporterons l'intérêt de l'exploration des phénotypes adhérents dans la pathologie vasculaire.

## ACTIVATION CELLULAIRE ET PHÉNOTYPE ADHÉRENT

## ACTIVATION PLAQUETTAIRE ET PHÉNOTYPE ADHÉRENT

Les tests explorant les fonctions plaquettales étudient principalement leur adhésion à la paroi vasculaire, l'activation plaquettaire, la sécrétion des constituants intragranulaires, l'agrégation plaquettaire, ainsi que les activités procoagulantes par réarrangements phospholipidiques membranaires (59) et génération de microparticules (1, 45). Les moyens d'exploration dont nous disposons actuellement comprennent la numération plaquettaire, l'analyse morphologique sur frottis sanguin, le temps de saignement, les tests d'agrégation, ainsi que l'étude de l'activation plaquettaire *in vivo* représentée par la mesure plasmatique de la  $\beta$ -thromboglobuline, de la P-sélectine soluble (d'origine plaquettaire et endothéliale), du thromboxane A2 et de ses dérivés urinaires (23). Le manque de sensibilité et/ou de spécificité de ces mesures, l'impossibilité à discriminer les sous-populations présentant des états d'activation différents, les problèmes méthodologiques rencontrés (préparation des cellules pouvant entraîner des activations *in vitro* artefactuelles, utilisation de radiomarqueurs) et leur pertinence clinique mal établie ont amené à chercher de nouveaux tests fonctionnels comme la quantification des glycoprotéines membranaires par cytométrie en flux, avant et après stimulation appropriée (2, 7, 22, 37, 54).

Pour exercer leurs fonctions, les plaquettes modulent l'expression de leurs molécules d'adhérence, structures

glycoprotéiques leur permettant d'interagir avec d'autres cellules, des protéines plasmatiques ou des composés de la matrice sous-endothéliale. À la suite de l'adhésion des plaquettes aux structures sous-endothéliales, étape impliquant l'interaction de la GPIb-IX (49) à son ligand (multimères du facteur von Willebrand), les plaquettes sont activées. Cette activation est caractérisée par des changements morphologiques, des phénomènes sécrétoires et des remaniements de l'expression des glycoprotéines. 1. La diminution du complexe GPIb-IX (CD42b/62) consécutive à un phénomène d'internalisation membranaire (34-38), 2. la néo-expression membranaire de la sélectine CD62P (GMP-140 ; « platelet activation-dependent granule-external membrane » : PADGEM) par fusion des granules  $\alpha$  avec le système canaliculaire connecté à la membrane plasmique et 3. l'augmentation de l'expression membranaire des complexes GPIIb/IIIa (CD41/61) associée à un changement conformationnel (27, 34, 42, 43) constituent les principales variations caractérisant le phénotype plaquettaire adhérent (22, 53, 54). La détermination de ce profil membranaire dans le domaine de la pathologie vasculaire par cytométrie quantitative à l'aide d'un panel d'anticorps spécifiques de ces glycoprotéines (anti-GPIb-IX, anti-GPIIb-IIIa conformation au repos, anti-GPIIb-IIIa conformation activée : anticorps PAC1, anti-CD62P) renseignent sur l'état d'activation des plaquettes.

## ACTIVATION LEUCOCYTAIRE ET PHÉNOTYPE ADHÉRENT

Les interactions adhésives hétérotypiques leucocytes-cellules endothéliales sont assurées par des molécules d'adhérence complémentaires intervenant selon un phénomène en cascade parfaitement orchestré (3, 11, 41).

Le polynucléaire circulant (PN) rentre en contact de façon aléatoire avec les cellules endothéliales activées, exprimant alors un phénotype pro-thrombotique ; la résultante des forces de cisaillement appliquées par le flux sanguin et des forces d'adhérences hétérotypiques aboutit à un ralentissement associé à un roulement lent du leucocyte sur la paroi endothéliale. Cette première étape implique l'interaction entre d'une part les sélectines leucocytaires (CD62L) qui ont pour ligand les sialomucines fucosylées et sialylées (sialyl Lewis<sup>x</sup>) endothéliales (GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1 : Mucosal addressin Cell Adhesion molecule-1) et d'autre part les sélectines endothéliales (P-sélectine : CD62P, E-sélectine : CD62E) qui reconnaissent leur récepteur leucocytaire (mucine PSGL-1 : « P-sélectine glycoprotéine ligand »). De nombreux stimuli de la réaction inflammatoire (cytokines, chémokines, facteurs de croissance) peuvent alors exercer leurs actions. Ils induisent des changements quantitatifs et qualitatifs des molécules impliquées dans cette interaction : d'une part, une diminution de l'expression membranaire de la L-sélectine, suite au clivage de la partie extramembranaire par une protéase endogène et d'autre part, une augmentation de celle des intégrines consécutive à la mobilisation du compartiment intra-cellulaire, par translocation, des glycoprotéines contenues dans les granulations spécifiques, vers la membrane. Ces deux variations ont

pour finalité une diminution du recrutement de leucocytes dans le but d'éviter l'emballement de la réaction cellulaire et de permettre l'adhérence ferme et définitive des PN aux cellules endothéliales. Cette interaction implique les  $\beta_2$  intégrines leucocytaires, structures hétérodimériques (CD11a-c/CD18) qui répondent à leurs ligands endothéliaux, les « intercellular cell adhesion molecules-1 et -2 » (ICAM-1 et 2) et les « vascular cell adhesion molecule-1 » (VCAM-1) membres de la superfamille des immunoglobulines. Ainsi recruté, le PN peut entamer sa migration trans-endothéliale (ou diapédèse) et être attiré par des facteurs chimiotactiques vers sa cible.

L'évaluation des molécules d'adhérence à la surface des PN, donne des renseignements sur leur état d'activation et d'adhésivité (26).

#### ACTIVATION ENDOTHÉLIALE ET PHÉNOTYPE ADHÉRENT

Sollicité par un environnement particulier, l'endothélium réagit en acquérant un phénotype prothrombotique. Il devient capable d'exprimer des récepteurs d'adhérence pour les plaquettes au pôle apical des cellules (4) ainsi que les ligands des molécules d'adhérence leucocytaires (58). La perte des propriétés antiplaquettaires, anticoagulantes et profibrinolytiques crée un état favorable à la survenue d'un événement thrombotique. L'activation des cellules endothéliales est multifactorielle (56) : 1. les lipoprotéines LDL oxydées, accumulées dans l'intima, induisent l'expression d'une molécule d'adhérence endothéliale (non encore identifiée) permettant l'adhésion des monocytes ; 2. les cytokines pro-inflammatoires, le « tumor necrosis factor  $\alpha$  » (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 1 (IL-1) ou l'interféron  $\gamma$  sont de puissants activateurs des cellules endothéliales ; 3. des agents infectieux intracellulaires à tropisme vasculaire (virus de la famille Herpès, virus de l'immunodéficience humaine de type 1, Chlamydiae, mycoplasmes) peuvent infecter les cellules endothéliales et participer à l'augmentation de l'adhérence leucocytaire par expression membranaire de néoglycoprotéines provenant des micro-organismes (15) ; 4. les forces hémodynamiques, en particulier les faibles forces de cisaillement ou celles à cisaillement oscillatoire induisent *in vivo* l'adhérence des monocytes à l'endothélium. Ces facteurs vont stimuler l'expression de molécules d'adhérence leucocytaires, ICAM-1, ICAM-2, P- et E-sélectines et VCAM-1. Le processus athéroscléreux semble faire intervenir dans l'adhérence aux cellules endothéliales, les cellules mononucléées exclusivement, via les molécules VCAM-1 et P-sélectine.

#### QUANTIFICATION PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

La cytométrie en flux permet de mesurer sur un grand nombre de cellules en suspension (10 000 et plus) la présence de marqueurs membranaires et/ou cytoplasmiques par l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques couplés à des fluorochromes. Après repérage de la population à analyser selon des paramètres morphométriques (taille, granulométrie), un histogramme monoparamétré

de la fluorescence émise permet de mesurer l'intensité de fluorescence, cette dernière étant proportionnelle à l'expression antigénique, en condition saturante d'anticorps. Les résultats sont exprimés soit en nombre de cellules positives par rapport à un contrôle isotypique, pour un marqueur donné (sans discrimination des populations possédant des expressions antigéniques différentes), soit en moyenne d'intensité de fluorescence (MIF). Ces deux méthodes permettent d'apprécier des variations antigéniques mais comportent un degré de variabilité des résultats introduit par des fluctuations des paramètres de lecture de la fluorescence (hétérogénéité des cytomètres et des réactifs, absence d'attitude consensuelle pour la calibration des appareils et des anticorps, anticorps ne reconnaissant pas les mêmes épitopes d'un antigène donné, comportement mono/bivalent, variations du rapport fluorochrome/protéine). De plus, cette mesure est relative, propre à chaque laboratoire, puisqu'elle est effectuée de façon arbitraire, en considérant négatives les cellules n'ayant pas une fluorescence supérieure à celles marquées à l'aide d'un réactif de contrôle négatif (14).

Ce manque de reproductibilité intra- et inter-analyses a justifié l'utilisation de calibrants de fluorescence (10, 14, 46, 47). Différentes trousse de calibrants sont actuellement commercialisées : certains calibrants possèdent un fluorochrome inclus de façon hermétique dans la masse du latex (Imunobrite, Coultronics ; Sphero Rainbow, Pharmingen) ; d'autres reproduisent l'échafaudage moléculaire du système de détection utilisé (Quantum Simply, Sigma ; Qifkit, Dako). Alors que ces billes de calibration citées mesurent en moyenne 10  $\mu$ m de diamètre, une trousse (CytoQuant Platelet, Stago) (8) comporte des billes de 4  $\mu$ m adaptées à la quantification des glycoprotéines plaquettaires. Les calibrants Qifkit et Cytoquant sont constitués de billes de latex simulant les cellules, recouvertes de quantités déterminées et croissantes d'anticorps monoclonaux (AcMx). Elles sont incluses dans les protocoles d'immunofluorescence indirecte au moment de l'incubation avec le réactif secondaire relevant (fragment F(ab')<sub>2</sub> couplé au fluorochrome). L'analyse de la MIF de chaque population de billes permet de tracer la droite d'étalonnage reliant les MIF au nombre d'AcMx fixés par cellule (fig. 1). En condition saturante, le nombre d'AcMx fixés est considéré proportionnel au nombre d'antigènes (en respectant la stoechiométrie des réactions antigène/anticorps primaire et anticorps primaire/anticorps secondaire égale à un et en utilisant des anticorps au comportement monovalent). Ainsi, pour chaque population cellulaire analysée, la MIF (unité arbitraire et relative) est convertie en nombre de sites antigéniques par cellule (unité absolue). Le nombre d'AcMx fixés peut être considéré comme représentatif du nombre réel de sites antigéniques, dans les conditions stoechiométriques déterminées.

Ces étalons permettent la calibration des cytomètres, la surveillance de leur stabilité au cours du temps, la standardisation de la lecture de la fluorescence et par conséquent améliorent la qualité des mesures. La spécificité de ces tests est conditionnée par celle de l'anticorps monoclonal utilisé. Le seuil de sensibilité de cette quantification est actuellement de 1 000 molécules d'anticorps par cellule et l'intervalle de mesure est de 1 000 à 1 000 000.



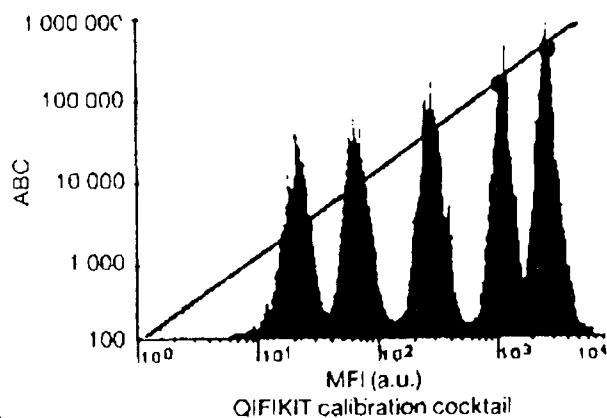


FIG. 1. - Courbe de calibration des billes (Qifikit®). Le nombre de molécules d'immunoglobuline fixées est déduit de l'intensité moyenne de fluorescence de l'échantillon.

*Calibration curve of beads (Qifikit®). The number of bound immunoglobulin molecules is deduced from the mean intensity of fluorescence.*

Un intérêt principal apporté par l'utilisation de cette méthodologie est la possibilité d'analyser une population cellulaire à partir de sang total. Il est bien décrit dans la littérature que les conditions pré-analytiques influencent les résultats d'expression antigénique aussi bien pour les leucocytes (30-32) que pour les plaquettes (38). L'analyse de sang total donne des mesures qui sont un reflet direct de l'état d'activation physiologique et la cytométrie quantitative peut prétendre au rang de test fonctionnel clinique pour les cellules circulantes. Par ailleurs, les cellules analysées peuvent être incubées en présence d'inducteurs physiologiques : les variations d'expression antigénique observées sont alors un reflet du potentiel réactif des cellules. Cette méthodologie permet une nouvelle approche de la réactivité cellulaire *in vitro*. Les applications actuelles concernent essentiellement les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales.

Dans notre étude, des molécules d'adhérence ont été quantifiées à la surface de PN humains, à l'état basal et après activation par un facteur chimiotactique, le formyl-méthionine-leucine-phénylalanine (fMLP) et par un stimuli pro-inflammatoire, le « tumor necrosis factor  $\alpha$  » (TNF $\alpha$ ). Cette quantification a été réalisée à l'aide du calibrant Qifikit (Dako). Les valeurs obtenues, avant et après stimulation sont mentionnées dans le *tableau 1*. L'activation par les stimuli pro-inflammatoires entraîne d'une part une diminution franche de CD62L, conséquence d'un clivage de la partie extra-membranaire, rendant le néoépitope non reconnaissable par l'anticorps et d'autre part une élévation franche des  $\beta_2$  intégrines (consécutives à la mobilisation du pool intracellulaire par translocation des protéines à la surface membranaire). Les multiples études menées sur ces molécules leucocytaires étaient jusqu'à ce jour exprimées en intensité moyenne de fluorescence et ne pouvaient donc être comparées du fait de l'hétérogénéité des procédures d'analyse et des différentes caractéristiques techniques des cytomètres. La quantification permet de se soustraire des variations liées à la lecture de la fluorescence.

TABLEAU 1. - Niveaux d'expressions des molécules d'adhérence à la surface de polymorphonucléaires neutrophiles (PN) isolés, avant et après activation par le formyl-méthionine-leucine-phénylalanine (fMLP) et par le « tumor necrosis factor  $\alpha$  » (TNF $\alpha$ ), obtenues par cytométrie quantitative, pour des témoins normaux, exprimées en nombre d'AcMx fixés  $\times 10^4$  par cellule (moyenne  $\pm$  écart-type).

*Expression level of isolated polymorphonuclear cell-surface adhesion molecules, before and after activation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) or by tumor necrosis factor (TNF), by quantitative flow cytometry, for normal subjects, expressed by number of molecules  $\times 10^4$  per cell (mean  $\pm$  standard deviation).*

|       | PN « non stimulés » | PN stimulés par le fMLP | PN stimulés par le TNF $\alpha$ |
|-------|---------------------|-------------------------|---------------------------------|
| CD62L | 33 $\pm$ 10         | 2 $\pm$ 1               | 1 $\pm$ 0,5                     |
| CD11a | 11 $\pm$ 1          | 15 $\pm$ 4              | 8 $\pm$ 1                       |
| CD11b | 41 $\pm$ 9          | 112 $\pm$ 29            | 81 $\pm$ 23                     |
| CD11c | 5 $\pm$ 1           | 13 $\pm$ 4              | 8 $\pm$ 2                       |
| CD18  | 27 $\pm$ 16         | 72 $\pm$ 23             | 43 $\pm$ 7                      |

L'étude de Bikoue A. *et al.* (10) fait référence dans le domaine de la quantification leucocytaire puisqu'il est mesuré, à l'aide de l'étalon Qifikit (Dako), les principaux antigènes de membranes à la surface des sous-populations leucocytaires (lymphocytes, monocytes, PN). Les valeurs trouvées pour les principales molécules d'adhérence à la surface des PN sont indiquées dans le *tableau II*. Les différences de résultats trouvées entre ces deux études peuvent être attribuées à des facteurs pré-analytiques (échantillonnage, heure de prélèvement, méthodes de préparation des cellules) et/ou analytiques (anticorps d'origines commerciales différentes, protocole d'immunomarquage, conditions d'analyse). Une meilleure connaissance de la cartographie épitopique, de la spécificité et de l'affinité des anticorps permettrait de cibler les anticorps les plus pertinents. La reproductibilité inter-laboratoires ne pourra être obtenue que par la réalisation d'études multicentriques incluant des attitudes consensuelles dans les protocoles de préparation et de lecture des éléments cellulaires. À cette condition, les résultats pourraient constituer des valeurs indicatives « de référence » lors d'études cliniques concernant les molécules d'adhérence à la surface des leucocytes dans des domaines pathologiques comme l'inflammation, l'athérosclérose ou la thrombose.

La trousse adaptée à l'analyse des glycoprotéines plaquettaires (8) se propose par une technique d'immunofluorescence indirecte sans lavage de mesurer les glycoprotéines (GPIIb/IIIa, GPIIIa, GPIb, P-Sélectine) à la surface des plaquettes à l'état basal (recueillies en présence d'anticoagulant citrate) et d'étudier leur réactivité en présence d'inducteur de l'activation (« thrombin receptor agonist peptide » : TRAP). Les valeurs usuelles sont indiquées dans le *tableau III*. Par ailleurs, une trousse récente « Biocytex GPIIb/IIIa Occupancy » (9) est destinée à l'étude pharmacologique des anti-plaquettaires de type anti-GP-IIb/IIIa. Elle permet, par une méthode d'immuno-compétition, d'évaluer le taux d'occupation d'anticorps à visée thérapeutique (42).

Concernant les cellules endothéliales, le problème est tout autre puisque leur nature adhérente implique la néces-

TABLEAU II. - Niveau d'expression des molécules d'adhésion à la surface des différents leucocytes, obtenues par cytométrie quantitative pour une série de témoins normaux, exprimées en nombre de molécules  $\times 10^4$  par (cellule moyenne  $\pm$  écart-type) (d'après Bikoue *et al.*)

*Expression level of leukocytes cell-surface adhesion molecules, by quantitative flow cytometry, for normal subjects, expressed by number of molecules  $\times 10^4$  per cell (mean  $\pm$  standard deviation) (from Bikoue *et al.*).*

|       | Lymphocytes | Monoocytes  | Polynucléaire neutrophile |
|-------|-------------|-------------|---------------------------|
| CD11a | 33 $\pm$ 13 | 58 $\pm$ 16 | 24 $\pm$ 5                |
| CD11b | 12 $\pm$ 6  | 52 $\pm$ 18 | 45 $\pm$ 20               |
| CD11c | < 1         | 21 $\pm$ 7  | 11 $\pm$ 6                |
| CD18  | 36 $\pm$ 11 | 93 $\pm$ 19 | 49 $\pm$ 15               |

TABLEAU III. - Expression des glycoprotéines plaquettaires obtenues par cytométrie quantitative pour une série de témoins normaux, avant et après activation par le TRAP, exprimées en nombre de molécules  $\times 10^3$  par cellule (moyenne  $\pm$  écart-type) (d'après Besson *et al.*)

*Expression of platelets glycoproteins, by quantitative flow cytometry, for normal subjects, before and after activation by TRAP, expressed by number of molecules  $\times 10^3$  per cell (mean  $\pm$  standard deviation) (from Besson *et al.*).*

|                    | État basal  | Profil d'activation par le TRAP |
|--------------------|-------------|---------------------------------|
| GpIIb/IIIa (CD41a) | 42 $\pm$ 12 | 63 $\pm$ 17                     |
| GpIb (CD42)        | 34 $\pm$ 9  | 14 $\pm$ 8                      |
| GpIIIa (CD61)      | 51 $\pm$ 9  | 66 $\pm$ 14                     |
| GMP140 (CD62P)     | < 0,5       | > 1                             |

sité de les détacher par des moyens chimiques et enzymatiques (trypsine-EDTA, héparine), ces derniers pouvant alors altérer certains épitopes (40). Il est envisageable d'étudier les cellules endothéliales circulantes mais les problèmes posés sont d'ordre technique (comptage d'éléments rares) et d'ordre clinique (interprétation de leur phénotype).

En conclusion, la cytométrie quantitative réalisée à partir de sang total apporte de nombreux avantages méthodologiques (38, 47): réalisation d'analyse à partir de sang total minimisant les variations artéfactuelles liées aux étapes de préparation, quantité de sang nécessaire faible (< 1 ml) autorisant de prélever des nouveau-nés, facilité et rapidité de réalisation permettant d'apporter un élément du diagnostic en temps réel, détermination de l'état d'activation *in vivo* et des potentialités de réactivité cellulaire *in vitro*, analyse simultanée de plusieurs récepteurs par utilisation de fluorochromes différents, possibilité de discriminer des sous-populations cellulaires exprimant des niveaux d'activation différents, analyse en parallèle des caractères morphométriques des cellules, grande sensibilité liée à la capacité du cytomètre d'analyser un grand nombre de cellules et importante spécificité liée au choix des anticorps monoclonaux. L'inconvénient majeur réside dans le fait que le sang total ne contient que les cellules activées circulantes mais n'est pas représentatif des cellu-

les restant adhérentes à la paroi vasculaire ou aux circuits de circulation extracorporelle.

Par ailleurs, la cytométrie en flux n'apporte que des renseignements quantitatifs, sur les niveaux d'expressions antigéniques. La cytométrie par analyse d'images (microscopie confocale, microscope à sectionnement optique) offre la possibilité d'obtenir des renseignements topographiques et cartographiques sur la distribution des différentes molécules d'adhésion à la surface et/ou dans les cellules. Elle permet aussi d'apporter une solution à l'étude de cellules adhérentes comme les cellules endothéliales en culture ou prélevées *in vivo*. L'étude conjointe des molécules d'adhérence par cytométrie en flux et par analyse d'images apportera certainement des données plus proches de la physiologie cellulaire, avec pour limites incontournables les variations pré-analytiques entraînant des activations cellulaires artéfactuelles liées à la nature des préparations et conservations cellulaires.

## PATHOLOGIES VASCULAIRES ET PHÉNOTYPE ADHÉRENT

### ACCIDENTS ISCHÉMIQUES CORONAIRES : ANGOR INSTABLE ET INFARCTUS DU MYOCARDE

La pathogénèse des accidents ischémiques coronaires implique aussi bien les plaquettes (19), les PN (17), que les cellules endothéliales (20).

Des angioscopies réalisées lors de ces pathologies coronaires ischémiques révèlent la présence de thrombi artériels riches en plaquettes. De nombreux auteurs ont décrit, durant des accidents cardio-vasculaires ischémiques, une activation plaquettaire, à l'aide des marqueurs plasmatiques (18) ou de la détermination du phénotype adhésif (6). De plus, des traitements anti-plaquettaires ont montré leur efficacité dans la prévention de cette pathologie.

Concernant les leucocytes, depuis la corrélation entre le taux élevé de leucocytes et le risque de survenue de pathologies ischémiques cardiovasculaires établie par Ernst *et al.* en 1987 (17), les hypothèses avancées sur le rôle des leucocytes consistent en une activation leucocytaire avec libération de substances toxiques induisant des altérations endothéliales et une accumulation intravasculaire d'agrégats de leucocytes activés, oblitérant les capillaires.

Dès 1993, Servi et son équipe mettent en évidence une augmentation des molécules d'adhérence à la surface des PN et monocytes dans l'angor instable (33); en 1994 la pathogénèse de la thrombose des artères coronaires est assimilée à l'inflammation (5). Sur ces constatations, Servi *et al.* mènent une étude sur les corrélations cliniques, angiographiques et l'activation leucocytaire dans l'angor instable; il note une augmentation de l'expression de CD11b/CD18 à la surface des PN prélevés à partir du sinus coronaire et non sur ceux prélevés à partir du sang périphérique (52). Cette élévation est d'autant plus marquée que l'analyse est proche d'un épisode angineux, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle l'état d'activation leucocytaire reflète la récurrence des phénomènes isch-

miques et non l'état inflammatoire rencontré dans la maladie coronaire ischémique.

L'ischémie myocardique, observée dans l'infarctus du myocarde, évolue vers la nécrose, réduite par l'apport d'un traitement thrombolytique appliqué le plus précocement possible ; ce dernier permet une repermeabilisation du vaisseau oblitéré et ainsi une reperfusion du tissu sous-jacent. L'effet spectaculaire de ce traitement administré depuis 1980 s'est vu grevé d'une majoration des lésions myocardiques par la réaction inflammatoire présente lors de la phase de reperfusion (24, 44, 48). En effet, lors de cette phase, on observe une accumulation de PN, le taux maximal ayant été observé lors de la première heure de reperfusion. Il se forme des agrégats de PN, réduisant la pression de perfusion des capillaires myocardiques, ainsi qu'une augmentation de l'adhésion des PN aux cellules endothéliales ; le tout aboutissant à la formation de bouchons dans la microcirculation et contribuant au mauvais rétablissement d'un flux physiologique. À ce phénomène rhéologique, s'ajoute un état d'activation des PN engendré par les nombreuses substances libérées par les tissus endommagés, en état de souffrance : C5a, leucotriènes, « platelet activating factor » (39) et cytokines (IL-1, TNF, IL-6). Cette activation se traduit par la sécrétion de leur puissante batterie d'enzymes tueuses et dégradatives (radicaux libres oxygénés, protéases), nuisibles pour les performances du tissu myocardique.

La compréhension de ce phénomène a permis d'élaborer toute une série d'agents atténuant la réaction leucocytaire trouvée lors de la reperfusion. Parmi eux, l'inhibition de l'adhésion inter-cellulaire par des anticorps bloquants anti-molécules d'adhérence, utilisée avec succès chez des modèles animaux (55).

L'exploration du phénotype adhérent endothélial en tant que marqueur d'activation a permis de suggérer que les cellules endothéliales de la plaque athéromateuse sont dans un état activé, sans aucune effraction, et de développer la notion de « dysfonctionnement endothélial » comme fondement du développement de l'athérosclérose (20). Ainsi l'endothélium activé ou dysfonctionnel, intervient dans la genèse de l'athérosclérose par l'accumulation des LDL dans l'intima à l'origine des dépôts lipidiques, par sa capacité à enclencher le recrutement et provoquer l'adhérence des monocytes circulants, dans l'accumulation des macrophages dans l'intima et par ses propriétés vasomotrices, dans le vasospasme.

En conclusion, la réalisation d'études prenant en considération la détermination des phénotypes adhésifs plaquettaires et leucocytaires en association avec les caractéristiques cliniques permettront de suivre l'évolutivité de la pathologie vasculaire, de mieux évaluer les états préthrombotiques (38) et d'identifier les patients qui pourraient bénéficier des thérapeutiques bloquant l'agrégation plaquettaire (12) et/ou l'accumulation de leucocytes.

#### ANGIOPLASTIES CORONAIRES TRANSLUMINALES ET MISE EN PLACE DE STENTS

Les gestes d'angioplasties et les poses de stent intracoronaire sont parfois compliqués d'accidents thromboti-

ques. Gawaz *et al.* ont analysé le phénotype adhérent plaquettaire (GPIIb-IIIa, P-sélectine) et la génération de microparticules chez des patients présentant un infarctus du myocarde bénéficiant d'une angioplastie coronaire percutanée transluminale : après une diminution de l'expression de ces marqueurs membranaires concomitante à une diminution du nombre de plaquettes et à une augmentation de la génération de microparticules observée 8 heures après l'angioplastie, les variations s'inversent dans les 24-48 heures (21). Plusieurs explications sont apportées à cette apparition différée des plaquettes activées trouvée par d'autres auteurs (43) : recirculation de plaquettes activées lors de la formation du thrombus, persistance de plaquettes faiblement activées alors que celles fortement activées seraient détruites, saturation du système phagocytaire mononucléé. Des études récentes (16, 50) ont mis en évidence une corrélation entre le pourcentage de plaquettes activées avant et après angioplastie et la survenue d'accidents ischémiques coronaires.

La pose de stent est aussi connue pour entraîner une activation plaquettaire ; son étude par les marqueurs membranaires permettra de mieux évaluer le risque thrombotique et ainsi de mieux déterminer l'association efficace de traitements anti-plaquetitaires lors de la réalisation de ce geste (51).

#### ANGIOPATHIES DIABÉTIQUES

Les complications vasculaires présentes chez les patients diabétiques sont probablement multifactorielles dont une activation plaquettaire (57) ainsi que celle des PN comme l'a montré Delamaire *et al.* qui met en évidence une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence CD11b et CD11c à la surface des PN chez 61 patients diabétiques exempts d'infection (13).

#### GROSSESSE ET PRÉ-ÉCLAMPSIE

La pré-éclampsie est une complication potentielle de la grossesse, qui associe une hypertension artérielle, des oedèmes et une protéinurie. L'ischémie placentaire se traduit par une augmentation locale de la concentration en peroxydes lipidiques, déséquilibrant la balance prostacycline/thromboxane. L'hyperproduction de peroxydes lipidiques, de thromboxane ou de cytokines pourrait participer aux atteintes vasculaires observées au cours de ce syndrome. Les perturbations du métabolisme des lipoprotéines, notamment l'augmentation des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) par les radicaux libres, pourraient participer aux dysfonctions endothéliales (29). En effet les LDL et les LDL oxydées activeraient les PN qui pourraient participer par leurs radicaux libres et leurs protéases à l'oxydation et aux modifications des lipoprotéines circulantes. Les LDL oxydées favorisent, au niveau endothélial, l'expression des molécules d'adhérence, comme le

VECAM-1, qui est augmentée au cours de la pré-éclampsie. Les LDL oxydées favorisent également l'expression des récepteurs CD11b/CD18 des neutrophiles, responsables de leur adhésion aux cellules endothéliales.

Par ailleurs, Janes *et al.* ont montré que la présence de plaquettes activées est un facteur de risque de survenue de cette complication chez la femme enceinte (25).

## CONCLUSION

La détermination du phénotype adhésif à la surface des cellules impliquées dans le domaine vasculaire permet de disposer d'une nouvelle approche *in vivo* et *in vitro* pour explorer la pathogénèse de la pathologie thrombotique. La cytométrie quantitative, de part son caractère multiparamétrique et sa facilité d'utilisation semble tout à fait adaptée à l'exploration du profil adhésif des cellules circulantes. L'étude des cellules endothéliales pourrait bénéficier de la cytométrie par analyse d'image qui apporte des données de répartitions spatiales sur des cellules en culture. Pour l'avenir, il est nécessaire de multiplier les études dans différentes directions (pathologie coronaire et maladie veineuse périphérique) afin d'établir des corrélations entre la présence de cellules exprimant un phénotype adhésif et le risque thrombotique du patient, d'affiner la détection de patients à fort risque prothrombotique et de mieux surveiller l'évolutivité de leur maladie. Par ailleurs, l'utilisation de la cytométrie en flux quantitative permet d'évaluer l'efficacité des nouvelles thérapeutiques dirigées contre les molécules d'adhésion.

Rudolph Virchow décrivait en 1856 les trois piliers de la pathologie vasculaire : stase, hypercoagulabilité sanguine, lésion vasculaire. De nos jours ne pourrait-on pas compléter par une conception plus cellulaire de l'hémostase et de la thrombose en évoquant la triade plaquette, leucocyte et cellule endothéliale ?

## RÉFÉRENCES

1. ABRAMS C, ELLISON N, BUDZYNSKI AZ, SHATTIL SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*, 1990; 75: 128-38.
2. ABRAMS C, SHATTIL SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Hemost*, 1991; 65: 467-73.
3. ADAMS DH, SHAW S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet*, 1994; 343: 831-6.
4. ALESSI MC, JUHAN-VAGUE I. Endothelium, thrombose et fibrinolyse. *La Revue du Praticien*, 1997; 47: 2227-31.
5. ALEXANDER RW. Inflammation and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 1994; 331: 468-75.
6. BECKER RC, TRACY RP, BOVILL EG, MANN KG, AULT K. The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. TIMI-III Thrombosis and anticoagulation Group. *Coronary Artery Dis*, 1994; 5: 339-46.
7. BELLOC F, VINCENDEAU P, FREYBURGER G, DUMAIN P, BOISSEAU MR. Flow cytometric study of the activation of polymorphonuclear cells. *J Leucocyte Biol*, 1990; 48: 353-8.
8. BESSON I, CAMOIN-JAC L, MIETS S, THURION C, GEORGE F, SAMPOL J. Cytoquant<sup>TM</sup> Gp: a new concept in platelet functional exploration. Abstract 14<sup>th</sup> international congress on thrombosis. Montpellier, 1996.
9. BESSON I, HEZARD N, METZ D, DALPIHARD S, SIMON G, POIRON G. Monitoring of a new therapeutic anti-GPIIb/IIIa using a quantitative flow cytometry method. *Thromb Haemost*, Suppl. 9, Abst. N° OC-27, pp. 8, Isth Florence, June 1997.
10. BIKOUE A, GEORGE F, PONCELET P, MUTIN M, JANOSSY G, SAMPOL J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry*, 1996; 26: 137-47.
11. CARLOS TM, HARLAN JM. Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules - Review article. *Blood*, 1994; 84: 2068-101.
12. COLLER BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation*, 1995; 92: 2373-80.
13. DELAMAIRE M, MAUGENDRE D, MORENO M, LE GOFF MC, ALLANIC H, GENETET B. Exploration des différentes étapes du fonctionnement des polynucléaires neutrophiles chez les patients diabétiques. *J Mal Vasc*, 1995; 20: 107-12.
14. DIGNAT-GEORGE F, SAMPOL J. Quantification d'antigènes de surface par cytométrie en flux. *Revue Française des Laboratoires*, 1996; 287: 83-110.
15. DIGNAT-GEORGE F, SAMPOL J. Endothélium et infections. *La Revue du Praticien*, 1997; 47: 2257-61.
16. DURRIEU-JAIS C, MACCHI L, BIHOUR C, COSTE P, BESSE P, NURDEN P, NURDEN AT. Étude de l'activation plaquettaire après angioplastie coronaire. Influence sur l'occlusion aiguë et la resténose. *Arch Mal Cœur* 1996; 89: 1259-65.
17. ERNST E, HAMMERSCHMIDT DE, BAGGE U, MATRAI A, DORMANDY JA. Leukocyte and the risk of ischemic diseases. *JAMA*, 1987; 257: 2318-24.
18. FITZGERALD DJ, ROY L, CAPELLA F, FITZGERALD GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med*, 1986; 315: 983-9.
19. FLORES NA, SHERIDAN DJ. The pathophysiological role of platelets during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*, 1994; 28: 295-303.
20. FUSTER V, BADIMON L, BADIMON JJ, CHESEBRO JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 1992; 326: 242-50.
21. GAWAZ M, NEUMANN FJ, OTT I, SCHIESSLER A, SCHÖMIG A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation*, 1996; 93: 229-37.
22. GINSBERG MH, FRELINGER AL, LAM SC, FORSYTH J, McMILLIAN R, PLOW EF, SHATTIL SJ. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. *Blood*, 1990; 10: 2017-23.
23. GRESELE P, CATALANO M, GIAMMARRESI C, VOLPATO R, TERMINI R, CIABOTTANI G, NENCI GG, DAVI G. Platelet activation markers in patients with peripheral arterial disease: a prospective comparison of different platelet function tests. *Thromb Haemost*, 1997; 78: 1434-7.
24. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 1995; 91: 1872-85.
25. JANES SL, GOODALL AH. Flow cytometric detection of circulating activated platelets and platelet hyper-responsiveness in pre-eclampsia and pregnancy. *Clin Sci*, 1994; 86: 731-9.
26. KUIPERS TW, TOOL ATJ, VAN DER SCHOOT CE, GINSEL LA, ONDERWATER JJM, ROOS D, VERHOEVEN AJ. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood*, 1991; 78: 1105-11.
27. KUNICKI TJ, NEWMAN PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood*, 1992; 6: 1386-404.
28. LECOMTE T, MAMAS S. Prostanoids and hemostasis. *Thérapie*, 1991; 46: 227-30.
29. LEFÈVRE G, BERKANE N, UZAN S, ETIENNE J. Prééclampsie et radicaux libres oxygénés. *Annales de Biologie Clinique*, 1997; 55: 443-50.
30. LINK A, HUMMEL B, SCHWERDT H, SCHWAMBORN J, JUNG F, SCHIEFFER H. Influence of neutrophil separation on the expres-

- sion of adhesion molecules. *Clin Hemorheol*, 1997; 17: 175-180.
31. MACEY MG, JIANG XP, VEYS P, MCCARTHY D, Newland AC. Expression of functional antigens on neutrophils: effects of preparation. *J Immunol Methods*, 1992; 149: 37-42.
  32. MACEY MG, MCCARTHY DA. Quantitation of adhesion molecules and other function-associated antigens on human peripheral blood leukocytes. *Cytometry*, 1993; 14: 898-908.
  33. MAZZONE A, DE SERVI S, RICEVUTI G. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation*, 1993; 88: 358-63.
  34. MICHELSON AD, BARNARD MR. Thrombin-induced changes in platelet membrane glycoprotein Ib, IX, and IIb-IIIa complex. *Blood* 1987; 70: 1673-8.
  35. MICHELSON AD, ELLIS PA, BARNARD MR, MATIC GB, VILES AF, KESTIN AS. Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, ADP or an in vivo wound. *Blood*, 1991; 77: 770-9.
  36. MICHELSON AD. Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Semin Thromb Hemost*, 1992; 18: 18-25.
  37. MICHELSON AD, SHATTIL SJ. The use of flow cytometry to study platelet activation. In: WATSON SP, AUTHI K. Eds. Platelet function and signal transduction. Oxford: Oxford University Press, 1995.
  38. MICHELSON AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*, 1996; 87: 4925-36.
  39. MONTRUCCHIO G, LUPIA E, DE MARTINO A, SILVESTRO L, RIZEA SAVU S, CACACE G, DE FILIPPI PG, EMANUELLI G, CAMUSSI G. Plasmin promotes an endothelium-dependent adhesion of neutrophils; involvement of platelet activating factor and P-selectin. *Circulation*, 1996; 93: 2152-60.
  40. MUTIN M, GEORGE F, LESAULE G, SAMPOL J. Reevaluation of Trypsin-EDTA for endothelial cell detachment before flow cytometry analysis. *Endothelium*, 1996; 4: 289-95.
  41. NOURSHARGH S. Interactions between granulocytes and endothelium. In Immunological Aspects of the Vascular Endothelium. Ed. by COS Savage, JD Rearson. Cambridge Reviews in Clinical Immunology, 1995.
  42. NURDEN AT, RUAN J, NURDEN P. L'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ : de la biologie cellulaire aux médicaments anti-thrombotiques. *Hématologie*, 1997; 3: 407-15.
  43. NURDEN P, DURRIEU-JAIS C, NURDEN A. Applications cliniques actuelles d'une activation plaquettaire par cytométrie en flux. *Sang, Thrombose, Vaisseaux*, 1997; 9: 441-8.
  44. OSTROVSKY L, WOODMAN RC, PAYNE D, TEOH D, KUBES P. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. *Circulation*, 1997; 96: 2302-10.
  45. PASQUET JM, TOFFI F, NURDEN AT, DACHARY-PRIGENT J. Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles. *Thromb Res*, 1996; 6: 509-22.
  46. PONCELET P, CARAYON P. Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, 1985; 85: 65-74.
  47. PONCELET P, GEORGE F, PAPA S, LANZA F. Quantitation of hematopoietic cell antigens in flow cytometry. *Eur J Histochem*, 1996; 40 (suppl. 1): 15-32.
  48. REIMER KA, MURRY CE, RICHARD VJ. The role of neutrophils and free radicals in the ischemic-reperfused heart: why the confusion and controversy? *J Mol Cell Cardiol*, 1989; 21: 1225-39.
  49. RUGGERI ZM. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Prog Hemost Thromb*, 1991; 10: 35-41.
  50. SCHARF RE, TOMER A, MARZEC UM, TEIRSTEIN PS, RUGGERI ZM, HARKER LA. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscl Thromb*, 1992; 12: 1475-1482.
  51. SCHÖMIG A, NEUMANN FJ, KASTRATI A. A randomized comparison of antipatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Eng J Med* 1996; 334: 1084-9.
  52. SERVI S, MAZZONE A, RICEVUTI G, MAZZUCHELLI I, FOSSATI G, GRITTI D, ANGOLI L, SPECCHIA G. Clinical and angiographic correlates of leukocyte activation in unstable angina. *J Am Coll Cardiol*, 1995; 26: 1146-50.
  53. SHATTIL SJ, HOXIE JA, CUNNINGHAM M, BRASS LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*, 1985; 260: 11107-15.
  54. SHATTIL SJ, CUNNINGHAM M, HOXIE JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, 1987; 70: 307-12.
  55. SIMPSON PJ, TODD RF, MICKELSON JK, FANTONE JC, GALLAGHER KP, LEE KA, TAMURA Y, CRONIN M, LUCCHESI BR. Sustained limitation of myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody that alters leukocyte function. *Circulation*, 1990; 81: 226-37.
  56. TEDGUI A. Rôle de l'endothélium dans l'athérosclérose. *La Revue du Praticien*, 1997; 47: 2262-67.
  57. TSCHOEPE D, ROESEN P, ESSER J, SCHWIPPERT B, NIEUWENHUIS HK, KEHREL B, GRIES FA. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost*, 1991; 17: 433-9.
  58. WATIER H, LEBRANCHU Y. Rôle de l'endothélium dans le trafic leucocytaire. *La Revue du Praticien*, 1997; 47: 2245-50.
  59. ZWAAL R, SCHROIT AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 1997; 89: 1121-32.

### III- DISTRIBUTION SPATIALE DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN A L'ETAT BASAL ET APRES STIMULATION

#### Article 4

**LATGER-CANNARD V, DUMAS D, BENSOUSSAN D, STOLTZ JF.**

Spatial distribution of the  $\beta_2$  integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) adherence receptors on human neutrophils by Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM).

Biorheology, 2002, 1-6.

L'activation des PNN implique un ensemble complexe de réactions morphologiques et biochimiques aboutissant, entre autres, à l'acquisition d'un phénotype adhérent aux cellules endothéliales afin d'être recruté pour réaliser la diapédèse et migrer vers le site inflammatoire. Ce phénotype adhérent correspond à un réarrangement des récepteurs d'adhérence qui implique des variations quantitative et spatiale. En effet, il est décrit pour les  $\beta_2$  intégrines, d'une part, une augmentation rapide de leur expression membranaire consécutive à la mobilisation du compartiment intracellulaire par translocation vers la membrane et, d'autre part, leur redistribution au sein de la bicouche lipidique avec regroupement ou "cluster" conduisant à une augmentation de l'avidité et affinité pour leur ligand. Si la cytométrie quantitative est parfaitement sensible aux variations quantitatives, une autre approche est nécessaire pour explorer ces redistributions spatiales. La volonté de connaître l'ensemble des phénomènes impliqués lors de l'activation de ces récepteurs nous a conduits à les explorer par microscopie à fluorescence 3D à sectionnement optique. Il a été ainsi montré, sur des PNN analysés après prélèvement, trois types de distribution : une répartition homogène sous forme de spots repartis sur toute la surface pour 80% d'entre eux, une distribution en couronne autour du plus grand diamètre pour 10-15% d'entre eux et une répartition polaire pour moins de 10% d'entre eux. Ces trois états correspondent probablement à une activation artéfactuelle débutante *in vitro*. L'activation des PNN par le  $\text{TNF}\alpha$  est associée à un regroupement polaire aléatoire pour l'ensemble des PNN. Ainsi, ce travail montre que si la cytométrie quantitative permet déjà d'avoir une approche fonctionnelle de l'état d'activation leucocytaire en mesurant les changements quantitatifs, l'exploration complète du phénotype adhérent devrait également prendre en compte les redistributions spatiales.

# Spatial distribution of the $\beta_2$ integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) adherence receptors on human neutrophils by Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM)

Véronique Latger-Cannard, Dominique Dumas, Danièle Bensoussan and Jean-François Stoltz \*

*Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Equipe LEMTA UMR CNRS 7563 et IFR 111  
Bioingénierie CNRS – UHP-INPL-CHU, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France*

**Abstract.** Receptors such as CD62L and CD11b/CD18, are transmembrane glycoproteins which regulate leukocyte adhesive phenotype. Flow cytometry (FCM) makes it possible to assess a characterization of the cell activation level by receptor quantifying, but that technique does not integrate other factors of adherence regulation, such as spatial distribution and molecular conformation. Our study consisted in exploring the main adherence receptors on Polymorphonuclear Neutrophils (PMN) that were simultaneously analyzed by FCM and Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM). FCM analysis showed that TNF $\alpha$  induce a decrease in CD62L expression and an increase in  $\beta_2$  integrins. COSM analysis distinguished three stages of cellular distribution of CD11b/CD18 within resting PMN: most of them (about 80%) had homogeneous distribution (heterogeneous spots distributed over the entire cell surface), for 10–15% of the cells, there was a crown distribution around the widest cell diameter and in less that 10% of them receptor distribution was polarized. CD62L was in the form of heterogeneous spots distributed in a circle on the surface on non-stimulated PMN. PMN stimulation by TNF $\alpha$  was associated to a randomized clustering involving both selectin and  $\beta_2$  integrin. Three-dimensional analysis elicited data not shown by quantitative cytometry. For a single averaged value of the density determined by FMC, various spatial distributions of adherence receptors are found on the surface of non-stimulated PMN. The characterization of the leukocyte adhesive phenotype has to integrate adherence receptors density as well as their spatial distribution.

Keywords: 3D microscopy, polymorphonuclear neutrophil, adherence receptors

## 1. Introduction

The process by which polymorphonuclear neutrophils (PMN) move from the vasculature into the inflammation site can be synthesized into three basic steps involving specific adhesion receptors [7,10,13,19]. The studies of the leukocyte adhesion to endothelial cells must consider quantitative as well topographic changes in adhesion receptors [14].

---

\* Address for correspondence: Jean-François Stoltz, Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. Tel.: +33 03 83 59 26 41; Fax: +33 03 83 59 26 43; E-mail: stoltz@hemato.u-nancy.fr.

Actually, the exploration of leukocyte activation state (adhesive phenotype) is usually realized by flow cytometry (FCM) [3]. This technique provides useful information about the cells that express the adherence receptor and can also determine the extent to which changes in ligand/receptor expression occur after exposure of cells to activating stimuli. The analysis done in this respect do not consider the effect of PMN activation on topological receptor distribution involved in clustering. Literature data shows that microscopic analysis of adherence receptors has already been considered at various stages of cellular activation. So, the distribution of leukocyte receptors as selectins and integrins was first explored by intravital video microscopy [20]. At the ultrastructural level, L-selectin and  $\beta_2$  integrins have been located on the surface of unactivated and activated human neutrophils by electron microscopy [4,6] and by high resolution field emission scanning electron microscopy [9]. A membrane redistribution of L-selectin after PMN activation was also explored by confocal microscopy [12], but in this technique the laser illumination of the specimen has deleterious effects on living cells (phototoxicity, bleaching of the probe, cell activation . . .). To obviate these problems, other 3D fluorescence technique have been developed, such as 3D Optical Scanning Microscopy/Deconvolution (OSM/D), a method of removing the out-of-focus light to increase the contrast and the fine image detail. By this method on living cells, it appeared to be of some interest to correlate the biological relevance of the level of PMN activation determined quantitatively by FCM (number of receptors) and qualitatively by OSM/D (clustering of receptors).

In the present study, we studied the expression and distribution of main adherence receptors CD62L and CD11b/CD18 expressed by PMN stimulated or not by tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Blood samples collection and stimulation

Whole blood PMN (from healthy volunteers,  $n = 10$ , collected into K<sub>3</sub> EDTA anticoagulated tubes, Vacutainer, Becton Dickinson, USA), were incubated with TNF $\alpha$  (Sigma, 100 UI/ml) at 37°C, during one hour. The cell suspension was washed and resuspended into isotonic medium (Cell Wash, Becton Dickinson). Resting and stimulated cells were fixed (paraformaldehyde, PFA 1%) before analysis.

### 2.2. Fluorescence labelling

Quantification of cell surface molecules was assessed according to the quantitative method using QIFIKIT<sup>®</sup> (Dako, France). All monoclonal antibodies (MoAb) obtained from Dako (France), CD62L MoAb (FMC46), CD11b MoAb (2LPM19c) and CD18 MoAb (MHM23), were applied under previously determined saturating conditions in indirect immunofluorescence assay. The second layer was a goat anti-mouse immunoglobulins, F(ab')<sub>2</sub> fraction, conjugated to FITC. This assay was performed in 100  $\mu$ l samples of whole blood with 10  $\mu$ l of MoAb solution for 45 minutes, in the dark, at room temperature (20–22°C) and then washed in PBS. One hundred microliters of second layer was then added into the pellet at 1/50 dilution for 45 minutes in the dark, at room temperature.

### 2.3. FCM analysis

FCM analysis was performed on 5000 events for each analysis, using a FACScan (Becton Dickinson, USA) using the PCLysis software. Under saturating conditions, F(ab')<sub>2</sub> fragments are likely to bind to



surface antigens through monovalent interaction; the number of antigenic sites per bead is proportional to the mean fluorescence intensity (MFI) measured [17]. Thus for each samples tested, corrected MFI (i.e., specific MFI minus that of the negative control measured under the same conditions) could therefore be converted into antibody binding capacity per cell (ABC).

#### 2.4. Optical scanning microscopy/deconvolution analysis

For each experiment, 100  $\mu\text{l}$  of the PMN suspension were deposited on a glass plate (code 79726, Polylabo, France) and were immediately analyzed. Optical section were obtained with an Olympus IX-70 epifluorescence inverted microscope equipped with the CellScan<sup>TM</sup> optical sectioning acquisition system (EPR<sup>TM</sup> System Cellscan, Bionis, France) and using a 60 $\times$ PSF/1.2-NA water immersion apochromatic objective (Olympus, France). The scanning along the optical axis was performed by a piezo z-axis focus device (at a z spacing of 0.25  $\mu\text{m}$ ). Images of biological samples were collected on a cooled 12 bit Charge-Coupled Device (CCD) camera (Princeton Instruments Inc, USA). A filter set selected the fluorescence excitation and the integral part of the emission spectrum. An image intensity calibration kit (Inspeck, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was used for the calibration. For the deconvolution, the blurring function of the optical system (the point-spread function) was characterized by imaging a through-focus series of optical sections of a 0.17  $\mu\text{m}$ -diameter green fluorescent bead (Microscope Point Source Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Both a blank image of the detector dark current and the background were subtracted pixel-by-pixel from each acquired.

#### 2.5. Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test was used to compare the adherence receptor expression on PMN stimulated or not. A two-tailed  $p$  value less than 0.5 was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Quantitative expression by FCM of adherence receptors after $\text{TNF}\alpha$ stimulation

As describe in the literature, the number of receptors determined by FCM revealed that PMN stimulation by  $\text{TNF}\alpha$  induced a decrease in CD62L expression ( $(33.5 \pm 9.6) \times 10^3 \times \text{ABC}$  on resting PMN versus  $(1.0 \pm 0.6) \times 10^3 \times \text{ABC}$  on stimulated PMN,  $p < 0.0001$ ) associated with an increase in  $\beta_2$  integrin (CD11b/CD18) expression (for CD11b:  $(41.8 \pm 9.1) \times 10^3 \times \text{ABC}$  on resting PMN versus  $(81.5 \pm 22.6) \times 10^3 \times \text{ABC}$  on stimulated PMN,  $p = 0.0015$ ; for CD18:  $(27.1 \pm 16.4) \times 10^3 \times \text{ABC}$  on resting PMN versus  $(43.7 \pm 7.0) \times 10^3 \times \text{ABC}$  on stimulated PMN,  $p = 0.005$ ). These data are consistent with the well known effect of  $\text{TNF}\alpha$  on PMN cells.

#### 3.2. 3D-distribution of adherence receptors

Non-stimulated PMN cells exhibit a round and after stimulation PMN cells exhibit morphological heterogeneity with coexisting rounded shapes, with uneven periphery bearing multi-directional pseudopods and spread shapes no longer retaining any of their initially roundness.

CD62L is in the form of heterogeneous spots distributed in a circle on the surface on non-stimulated PMN (Fig. 1(a)). After stimulation by  $\text{TNF}\alpha$ , fluorescence spot polarization was observed, with a few residual spots persisting (Fig. 1(b)).

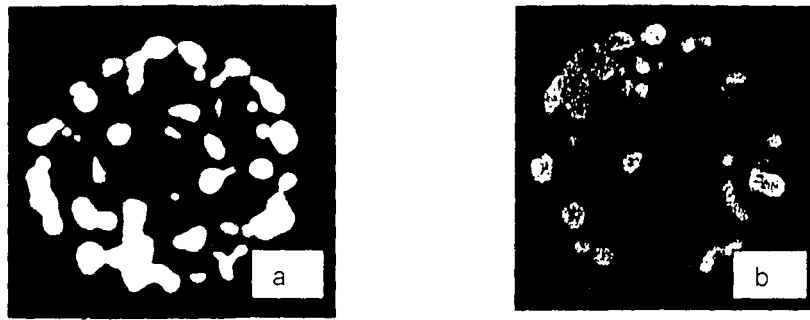


Fig. 1. Original magnification:  $\times 60$ . Indirect immunofluorescence microscopy. The polymorphonuclear neutrophils were labelled with anti-CD62L MoAb followed by sheep anti-mouse IgG conjugated to FITC. Three-dimensional image were obtained by a EPR<sup>TM</sup> System Cellscan Optical Sectioning Microscopy. (a) CD62L is in the form of heterogeneous punctual spots distributed in a circle on the surface on non-stimulated PMN. (b) After stimulation by TNF $\alpha$  (100 UI/ml, 37°C, 1 hour), fluorescence spot polarization was observed, with a few residual spots persisting.

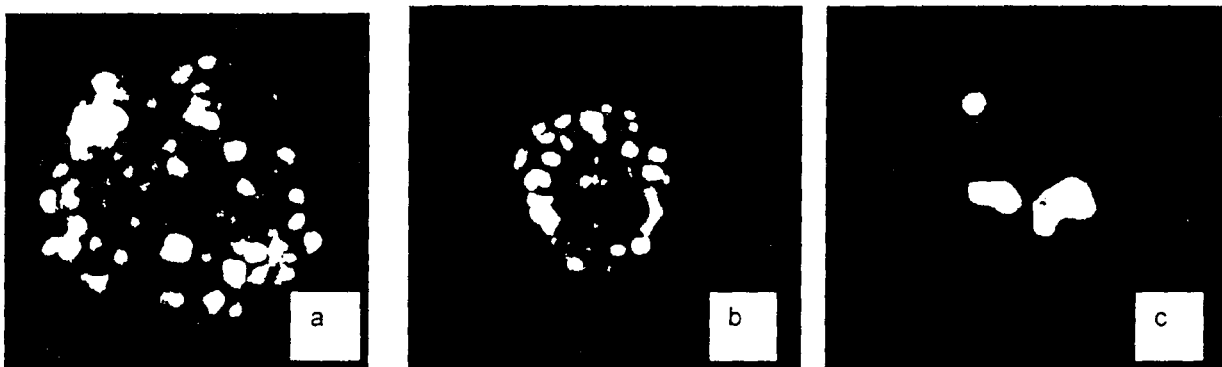


Fig. 2. Original magnification:  $\times 60$ . Indirect immunofluorescence microscopy. Three-dimensional image obtained by a EPR<sup>TM</sup> System Cellscan Optical Sectioning Microscopy. Exploring the topography of  $\alpha$  subunit of  $\beta_2$  integrins (CD11b) revealed three stages of cellular distribution within non stimulated polymorphonuclear neutrophils: (a) for most of them (about 80%), fluorescence was distributed evenly over the entire cell surface, in the form of heterogeneous spots; (b) for 10–15% of the cells, there was a crown arrangement of fluorescence spots around the widest cell diameter; (c) in less that 10% of cells, fluorescence distribution was polarized. Analysis of  $\alpha$ -subunit of  $\beta_2$  integrins (CD11b) shows same three distribution patterns.

Three distribution patterns of the (subunit of  $\beta_2$  integrin (CD11b) were evidenced in non-stimulated PMN: (a) for most of them (about 80%), fluorescence was distributed evenly over the entire cell surface, in the form of heterogeneous spots (Fig. 2(a)); (b) for 10–15% of the cells, there was a crown arrangement of fluorescence spots around the widest cell diameter without corresponding to the contact points on the slide (Fig. 2(b)); (c) in less that 10% of cells, receptor distribution was polarized (Fig. 2(c)), alike that observed following stimulation. Cell activation by TNF $\alpha$  results in an asymmetrical bipolar an asymmetrical bipolar redistribution of the CD11b receptor (Fig. 3) in the form of clusters with two diametrically opposed poles. The orientation of these clusters is randomized with no relation with the areas of contact between the cell and the slide.

Analyzing the  $\beta$  chain (CD18) revealed a distribution that could be superimposed on that of the  $\alpha$  chain with there different states and after stimulation PMN are all defined by an asymmetrical bipolar distribution of receptor CD18.



Fig. 3. Original magnification:  $\times 60$ . Indirect immunofluorescence microscopy. Cell activation by  $\text{TNF}\alpha$  results in an asymmetrical bipolar redistribution of the CD11b receptor in the form of clusters with two diametrically opposed poles.

#### 4. Discussion

Our study consisted in exploring distributions of adherence receptors on the surface of leukocytes after activation by  $\text{TNF}\alpha$ .

Quantitative variations of the adherence molecules before and after activation were consistent with the literature [5,7,10,13,19]. L-selectin and  $\beta_2$  integrin were conversely regulated. L-selectin, expressed constitutionally on the leukocyte surface, is reduced during activation following the cleavage of the extramembrane part by protease [7,11]. Our results show a two-fold increase in CD11b/CD18 expression after activation by  $\text{TNF}\alpha$ . A ten-fold increase in basal value has been reported who used other stimuli, like interleukin-8, neutrophil activating protein 1. That variation of CD11b/CD18 expression following PMN stimulation would be related to a fast kinetic phenomenon [8] induced by membrane translocation of the proteins contained in secondary and tertiary grains [2].

Literature data shows that microscopic analysis of adhesion receptors has already been considered at various stages of cellular activation. The distribution of leukocyte receptors as selectins and integrins was first approached by intravital video microscopy [20]. At the ultrastructural level, L-selectin and  $\beta_2$  integrins have been located by electron microscopy on the surface of unactivated and activated human neutrophils [6,20] and by high resolution field emission scanning electron microscopy [9]. Membrane redistribution of L-selectin after PMN activation was also explored by confocal microscopy [12]. However, even if that technique is still the one most used to visualize cells in three-dimensional, it has some now well established limitations, for live cell studies in particular. To overcome these technical limitations, conventional optical scanning microscopy (COSM) is an alternative method recently developed [15,18].

Our study involves spatial distribution by OSM/D of PMN adherence molecules before and after activation by  $\text{TNF}\alpha$ . Analyzing of non stimulated PMN on the one hand evidences a distribution of the CD62L in the form of heterogeneously sized clusters as a cap on the cell surface and on the other hand differentiates three stages for  $\beta_2$  integrins without any apparent change in CD62L distribution. Receptors CD11b/CD18 are either distributed over the whole cell surface or in a crown-like distribution or bipolarized. PMN stimulation by  $\text{TNF}\alpha$  induces receptor redistribution into an asymmetrical bipolar clustering. Integrin receptor clustering leads to the formation of focal adhesion where integrins link to intracellular actin cytoskeleton and to multivalent interactions with their ligands [1,16]. Exploring the topography of receptor CD11b/CD18 provides data not revealed by quantitative flow cytometry. For an averaged value of the number receptors/cell determined by FCM, various spatial distributions of adherence molecules can be found on the surface of non-stimulated PMN. This dual method of investigation challenges the

biological relevance of FCM to define basal and activated states. The characterization of the cellular activation level by receptor analysis has to integrate antigen density, spatial distribution and molecular conformation, all at the same time. This is true for other type of cells.

To conclude, our study shows the presence of these clustering of adherence receptors on the surface of unstimulated PMN without any quantitative variation measured by flow cytometry. Three-dimensional analysis elicits data shown by quantitative FCM, which raises the question of the biological relevance of cytometric analysis to characterize the level of cellular activation. The characterization of the leukocyte adhesive phenotype has to integrate adherence receptors density as well as their spatial distribution. Quantitative abnormalities lead to define the "Leukocyte Adhesion Deficiency" (LAD) syndrome. Investigation of their spatial distribution with COSM could constitute an easeful test to detect abnormalities in topographic regulation.

## References

- [1] A.E. Aplin, A. Howe, S.K. Alahari and R.L. Juliano, Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins, *Pharmacol. Rev.* **50** (1998), 197–263.
- [2] A. Arnaout, Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18, *Blood* **75** (1990), 1037–1090.
- [3] F. Belloc, P. Vincendeau, G. Freyburger, P. Dumain and M. Boisseau, Flow cytometry study of the activation of polymorphonuclear cells, *J. Leukoc. Biol.* **48** (1990), 353–358.
- [4] N. Borregaard, L. Kjeldsen, H. Sengelov, M.S. Diamond, T.A. Springer, H.C. Anderson, T.K. Kishimoto and D.F. Bainton, Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators, *J. Leukoc. Biol.* **156** (1994), 80–87.
- [5] E.J. Brown, Adhesive interactions in the immune system, *Cell Biology* **7** (1997), 289–295.
- [6] R.E. Bruehl, T.A. Springer and D.F. Bainton, Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.* **44** (1996), 835–844.
- [7] T.M. Carlos and J.M. Harlan, Leukocyte-endothelial adhesion molecules, *Blood* **84** (1994), 2068–2101.
- [8] M.S. Diamond and T.A. Springer, The dynamic regulation of integrin adhesiveness, *Curr. Biol.* **4** (1994), 506–517.
- [9] S.L. Erlandsen, S.R. Hasslena and R.D. Nelson, Detection and spatial distribution of the beta 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission, *J. Histochem. Cytochem.* **41** (1993), 327–333.
- [10] J.M. Harlan, R.K. Winn, N.B. Vedder, C.M. Doershuk and C.L. Rice, *In vivo* models of leukocyte adherence to endothelium, in: *Adhesion: Its Role in Inflammatory Disease*, J.M. Harlan and D.Y. Limes, eds, WH Freeman and Company, New York 1992, pp. 117–115.
- [11] K. Ley, The selectins as rolling receptors, in: *The Selectins: Initiators of Leukocyte Endothelial Adhesion*, D. Vestweber, ed., Harwood Academic Publishers; Amsterdam, Holland, 1997, pp. 63–104.
- [12] Q. Liu, T.K. Kishimoto, E. Mainolfi, R.P. Deleon, C. Myers and R.C. Moretz, Dynamic expression of L-selectin in cell-to-cell interactions between neutrophils and endothelial cells in vitro, *Exp. Cell. Res.* **243** (1998), 87–93.
- [13] S. Nourshargh, Interactions between granulocytes and endothelium, in: *Immunological Aspects of the Vascular Endothelium*, C.O.S. Savage and J.D. Reardon eds, Reviews in Clinical Immunology, Cambridge, 1995, pp. 43–63.
- [14] P. Riha, D. Dumas, V. Latger-Cannard, S. Muller, V. Labrador and J.F. Stoltz, Molecular mechanisms of leukocyte rolling and tight adhesion to endothelium, *Int. J. Cardio. Med. Sci.* **2** (1999), 241–250.
- [15] B.A. Scalettar, J.R. Swedlow, J.W. Sedat and D.A. Agard, Dispersion, aberration and deconvolution in multi-wavelength fluorescence images, *J. Microsc.* **182** (1996), 50–59.
- [16] S.M. Schoenwaelder and K. Burridge, Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins, *Curr. Opin. Cell Biol.* **11** (1999), 274–286.
- [17] A. Schwartz, F. Repollet, R. Vogt and J. Gratama, Standardizing flow cytometry: Construction of a standardized fluorescence calibration plot using matching spectral calibrators, *Cytometry* **26** (1996), 22–31.
- [18] P.J. Shaw, Comparison between confocal and wide-field imaging in 3-D microscopy, in: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, ed., 2nd edn., pp. 373–387. Plenum Press, New York, London, 1995.
- [19] T.A. Springer, Adhesion receptors of the immune system, *Nature* **346** (1990), 425–433.
- [20] U.H. Von Andrian, S.R. Hasslen, R.D. Nelson, S.L. Erlandsen and E.C. Butcher, A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* **82** (1995), 989–999.

**Chapitre III-2**

**DEFICIT DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS  
D'ADHERENCE DU PNN CHEZ UN PATIENT  
PRESENTANT UNE GLYCOGENOSE IB**

## Chapitre III-2

### DEFICIT DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE CHEZ UN PATIENT PRESENTANT UNE GLYCOGENOSE IB

#### I- INTRODUCTION

La pathologie déficitaire en récepteurs d'adhérence leucocytaires est représentée par un groupe hétérogène et de survenue rare. Le rôle biologique de ces récepteurs implique que leur déficit entraîne un tableau clinique essentiellement représenté par des infections survenant à des âges variés en fonction de la possibilité de mise en place de voies accessoires de défense contre l'hôte étranger. La méconnaissance de cette pathologie est essentiellement liée à un manque d'investigation et leur diagnostic nécessite la recherche systématique d'un déficit d'expression de ces récepteurs devant tout patient présentant en particulier des épisodes infectieux itératifs. La cytométrie quantitative permet d'évaluer le nombre de récepteurs révélés par l'immunomarquage et représente donc une méthodologie tout à fait adaptée à la quantification de l'expression de ces récepteurs à la surface des leucocytes.

Nous avons donc appliqué la cytométrie quantitative pour mesurer l'expression des principaux récepteurs d'adhérence leucocytaires impliqués dans cette pathologie, à savoir la sélectine CD62L et les  $\beta_2$  intégrines CD11a,b,c/CD18. La recherche de ce déficit par cette technique a été appliquée, en collaboration avec le Professeur P. Bordigoni, à l'ensemble des patients présentant un tableau infectieux chronique, de nature non expliquée par un déficit immunitaire du système lymphoïde.

C'est dans ce cadre de travail que nous avons pu mettre en évidence un déficit en récepteurs d'adhérence chez un patient présentant une glycogénose Ib. Ce déficit est le premier cas rapporté dans la littérature.

Après un rappel bibliographique sur la pathologie des déficits en récepteurs d'adhérence connus à ce jour et sur la glycogénose Ib, nous présenterons notre observation.

## I-1- LES DEFICITS EN RECEPTEURS D'ADHERENCE LEUCOCYTAIRES

(Tableau récapitulatif n°III-2-1 à la fin de la partie I-1)

De rares cas de déficit en molécules d'adhérence leucocytaires congénitaux ou "LAD syndrome" pour "Leucocyte Adherence Deficiency syndrome" ont été rapportés chez l'homme (Etzioni A, 1999a ; Bunting M, 2002). Ils impliquent une anomalie de la  $\beta_2$  intégrine CD18 pour le LAD type I, le ligand sLe<sup>x</sup> pour le LAD type II et la E-sélectine pour le LAD type III. La compréhension du rôle des récepteurs d'adhérence dans la réponse immunitaire a été facilitée par des modèles animaux ; des modèles murins déficitaires en molécule d'adhérence ont été générés pour pratiquement tous les types de récepteurs (Etzioni A, 1999a).

### I-1-A- DEFICIT DES $\beta_2$ INTEGRINES ET DE LEURS LIGANDS (IgSF)

#### I-1-A-①- Le "LAD" syndrome type I (forme initialement décrite)

Il s'agit d'une maladie héréditaire rare, puisque environ 200 cas de patients atteints ont été rapportés et de transmission autosomique récessive (Arnaout A, 1984 ; Anderson DC, 1987 ; Harlan JM, 1993 ; Etzioni A, 1999a).

#### **Caractéristiques clinico-biologiques.**

Ce syndrome est caractérisé cliniquement par un retard de la chute du cordon ombilical associé à des infections graves et récurrentes, le plus souvent bactériennes plutôt que virales ou fongiques, intéressant la peau (en particulier l'ombilic), les muqueuses, le tissu sous-cutané et le système respiratoire. Les infections surviennent généralement peu avant la naissance et une infection du cordon ombilical avec un retard de sa chute est une présentation habituelle à la naissance. Les patients qui survivent présentent des gingivites et des parodontites récurrentes. Il existe une hyperleucocytose à PNN, persistante en dehors des épisodes infectieux et contrastant avec l'absence de pus au niveau des foyers infectieux. La gravité des infections bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*) ou fongiques (*Candida albicans*) détermine le pronostic vital. La réponse virale ne semble, par contre, pas altérée.

## **Base biochimique.**

L'anomalie princeps consiste en une mutation hétérogène du gène situé sur le bras long du chromosome 21q22.3 et codant pour la sous-unité CD18 des  $\beta_2$  intégrines (Anderson DC, 1987 ; Fischer A, 1988), ce qui entraîne l'absence d'expression de cette chaîne ou son impossibilité à s'apparier avec la chaîne  $\alpha$ . L'expression des  $\beta_2$  intégrines (CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1) et CD11c/CD18 (p150,95) est nulle ou fortement diminuée à la surface des leucocytes. Ces PNN, déficitaires en CD18, peuvent entreprendre la phase de roulement lent (sélectine dépendante) mais ne pourront ni adhérer fermement à la paroi endothéliale (phase intégrine dépendante), ni entreprendre de migration trans-endothéliale (phase intégrine dépendante). Il en résulte l'incapacité des PNN à adhérer à l'endothélium. Ce qui explique l'absence complète de ces cellules au niveau du site inflammatoire.

D'autres leucocytes comme les cellules mononucléées ou les polynucléaires éosinophiles présentent également des altérations fonctionnelles mais à un moindre degré. Elles ont en fait la capacité de migrer à l'aide d'autres voies de l'adhérence (via probablement la  $\beta_1$  intégrine VLA-4) et peuvent ainsi se rendre au niveau du site inflammatoire. Les complications infectieuses sont à prédominance bactérienne, suggérant une relative conservation fonctionnelle du système lymphocytaire, via également l'expression des  $\beta_1$  intégrines.

## **Plusieurs phénotypes ont été décrits :**

① La forme grave correspond à la quasi absence d'expression des hétérodimères CD11/CD18 (inférieure à 1%) associée à des infections graves entraînant le décès dans les premières années de la vie. La greffe de moelle osseuse allogénique est indiquée le plus tôt possible (Thomas C, 1995).

② La forme de gravité modérée correspond à une expression de CD11/CD18 entre 2,5 et 30% du niveau normal et est associée à une évolution plus favorable.

③ Les formes hétérozygotes ont une expression des  $\beta_2$  intégrines entre 40 à 60% du taux normal et ne présentent aucune manifestation clinique.



## Bases moléculaires

Plusieurs points de mutation ont été décrits, certains ayant pour conséquence la formation d'une protéine anormale avec des acides aminés substitués, d'autres entraînant la formation de protéines tronquées et/ou instables (*figure n°III-2-1*) (Hogg N, 2000, Shaw JM, 2001; Roos D, 2002). La plupart des mutations sont localisées au niveau d'un domaine hautement conservé dans l'évolution, de 241 acides aminés et situé dans la portion extra-cellulaire de CD18. Ce domaine est probablement impliqué dans l'association des chaînes  $\alpha$  à la chaîne  $\beta$ .

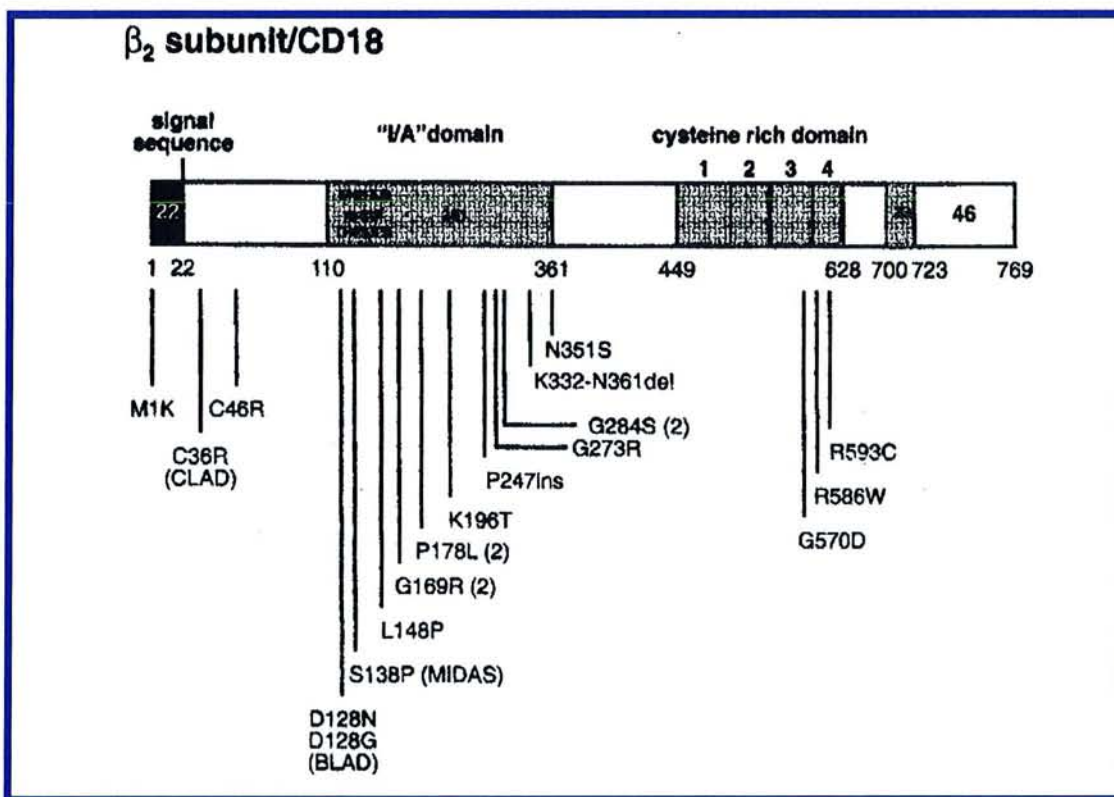


Figure n°III-2-1: Localisation des mutations de la chaîne  $\beta_2$  intégrine sur le chromosome 21q22.3, identifiées chez les patients atteints de LAD syndrome type I (d'après Hogg N, 2000).

## I-1-A-②- Le "LAD" syndrome type I, variant 1

Le propositus rapporté par Kuijpers TW et al. (1997) est un enfant âgé de 5 ans au diagnostic, de parents non consanguins, n'ayant présenté aucun problème à la naissance. Dans les semaines suivantes, il est observé la persistance d'une polynucléose ainsi que des poussées inflammatoires non documentées. A l'âge de 1 an, il est noté une immaturité de son système immunitaire, conduisant à prescrire une prophylaxie anti-infectieuse (cotrimoxazole et gammaglobulines intraveineuses mensuellement). Son enfance est marquée par la survenue d'infections bactériennes non compliquées et régressives sous antibiothérapie intraveineuse.

L'étude *in vitro* du chimiotactisme, de la migration transendothéliale et de l'agrégation leucocytaire met en évidence une altération importante de ses fonctions leucocytaires. Les autres fonctions comme l'activité NADPH, le flux calcique, la polymérisation des fibres d'actine, la sécrétion des granules, ne sont pas perturbées.

L'expression membranaire des  $\beta_2$  intégrines CD11a,b,c/CD18, des sélectines et de leurs ligands fucosylés (sLe<sup>x</sup> et Le<sup>x</sup>) est quantitativement normale. L'utilisation d'un anticorps sensible à l'activation du récepteur CD11b/CD18 (clone CBRM1/5) permet de mettre en évidence l'absence d'augmentation de cette antigène après stimulation leucocytaire. Ce récepteur est donc incapable d'exprimer les néo-épitopes impliqués dans le changement conformationnel, permettant de transiter d'un état de faible affinité à celui de forte affinité, afin d'acquérir le phénotype adhérent aux cellules endothéliales. L'étude moléculaire de la chaîne  $\beta_2$  intégrine n'a pas mis en évidence de mutation, ce qui exclut un LAD syndrome type 1 dans sa forme initialement décrite. L'exploration quantitative et fonctionnelle des  $\beta_1$  et  $\beta_3$  intégrines est normale.

L'évolution clinique de ce patient est marquée, à l'âge de 3 ans, par une diathèse hémorragique (saignements muqueux). Une exploration antérieure, à l'âge de 2 ans, n'avait montré aucune anomalie de l'hémostase primaire et de la coagulation. Lors de la survenue des épisodes hémorragiques, le temps de saignement est allongé avec une numération plaquettaire normale et une diminution de réponse de l'agrégation plaquettaire à l'ensemble des agonistes usuels (ristocétine, collagène, adénosine diphosphate (ADP)). L'expression membranaire du complexe GPIIb/IIIa ( $\beta_3$  intégrine) est quantitativement normale à la surface de plaquettes à l'état basal ou après stimulation. Par contre, il est noté l'absence d'expression des néo-épitopes liés au

changement conformationnel de ce récepteur activé (mis en évidence par l'anticorps PAC-1). Une anomalie fonctionnelle de ce récepteur, de mécanisme similaire à celui touchant la  $\beta_2$  intégrine (CD11b/CD18), est donc impliqué dans la genèse de cette tendance hémorragique.

Cette observation est l'unique cas d'anomalie fonctionnelle touchant à la fois une  $\beta_2$  et une  $\beta_3$  intégrine impliquant une anomalie de transmission du signal "inside-out" ne pouvant aboutir à une liaison de haute affinité. Des anomalies impliquant les domaines cytoplasmiques, du cytosquelette ou bien des activités des kinases ont été suggérées.

### **I-1-A-③- Le "LAD" syndrome type I, variant 2**

L'unique cas rapporté (Hogg N, 1999) correspond à un garçon, âgé de 15 ans au diagnostic, qui a présenté durant son enfance de nombreuses infections cutanées ayant nécessité un traitement par antibiothérapie intraveineuse et des parages chirurgicaux pour évacuer les tissus nécrotiques. Le patient souffre également de parodontites et de gingivites malgré une hygiène buccale rigoureuse. Il a présenté, par ailleurs, d'autres complications infectieuses comme des otites moyennes et des infections pulmonaires.

Une polynucléose est notée, atteignant  $50 \times 10^9/L$  durant les épisodes infectieux. La phagocytose est inférieure à 25% du témoin et la réponse oxydative est soit normale, soit augmentée. Les lymphocytes T ne présentent pas d'anomalies quantitative ou fonctionnelle.

A l'âge de 10 ans, l'état du patient se dégrade avec des infections cutanées plus fréquentes et plus graves, conduisant à poser l'indication d'une greffe de moelle osseuse.

La mesure de l'expression des  $\beta_2$  intégrines a montré :

- une expression diminuée de CD18 (recherchée à l'aide de l'anticorps antiCD18 clone MAB L130) à 58% pour les PNN et à 65% pour les lymphocytes, ce qui correspond à un phénotype hétérozygote et ne peut expliquer la symptomatologie du patient.

- Une expression normale des complexes CD11a/CD18 et CD11b/CD18, suggérant une anomalie fonctionnelle de ces récepteurs.
- Une absence d'adhésion des PNN au fibrinogène après stimulation leucocytaire par le fMLP et l'absence d'un épitope impliqué dans l'activation des  $\beta_2$  intégrines en présence des cations extracellulaires  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  (révélé par l'anticorps anti-CD18 clone MAB24). Ces tests montrent que la  $\beta_2$  intégrine CD11a/CD18 (LFA-1) est quantitativement bien exprimée mais n'est pas fonctionnelle.
- Les lymphocytes T ne peuvent également se fixer à ICAM-1, ce qui est en faveur d'une anomalie fonctionnelle de CD11b/CD18 (Mac-1).
- Cependant, les lymphocytes T sont capables d'adhérer à ICAM-2 et ICAM-3 en présence de cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ ). Cette adhésion est respectivement bloquée par les anticorps anti-VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) et anti-VLA-5 ( $\alpha_5\beta_1$ ). Il est ainsi vérifié que ces  $\beta_1$  intégrines (VLA-4 et VLA-5) ne présentent aucune anomalie fonctionnelle.
- Le séquençage de l'ADN des deux allèles de CD18 a permis de mettre en évidence la présence de deux mutations S138P et G273R, toutes deux situées dans le domaine hautement conservé de la chaîne  $\beta_2$ . La mutation S138P implique le domaine du site d'adhésion ions métalliques dépendant (MIDAS pour "Metal ion-dependent adhesion site"), impliqué dans la reconnaissance des ligands.

En conclusion, ce cas représente une anomalie fonctionnelle des  $\beta_2$  intégrines avec un phénotype quantitatif similaire à un LAD syndrome type I "classique" modéré.

### I-1-A-④- Le "LAD" syndrome type I variant 3

Plus récemment, il a été décrit un nouveau cas d'anomalie fonctionnelle des intégrines, impliquant pour la première fois aussi bien les  $\beta_1$  que les  $\beta_2$  intégrines (Harris ES, 2001).

Le garçon né à terme, sans retard staturo-pondéral, de parents sains non consanguins, a présenté à l'âge de 3 semaines, un rash cutané associé biologiquement à une anémie, une thrombopénie et une hyperleucocytose ( $35-45 \times 10^9/L$ ). Les recherches virales sont restées négatives chez l'enfant et chez la mère. Du 4<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> mois, l'enfant a présenté de nombreuses infections bactériennes et fongiques avec une anémie, une thrombopénie et une hyperleucocytose (jusqu'à  $96 \times 10^9/L$ ) persistantes. L'immunité humorale et cellulaire explorées à l'âge de 6 mois sont sans anomalie.

Vers le 7<sup>ème</sup> mois, un épisode de saignement muqueux, coïncidant avec la survenue d'une omphalite, a motivé une exploration de l'hémostase. Les résultats ont montré un temps de saignement supérieur à 15 min, une absence d'agrégation plaquettaire en réponse au collagène, à l'ADP, à l'acide arachidonique et l'absence d'agglutination à la ristocétine.

Les biopsies médullaires ont montré à l'âge de 1 mois, une hypoplasie marquée et à l'âge de 7 mois une dysplasie de l'ensemble des trois lignées, plus prononcée au niveau de la lignée granuleuse.

L'analyse génétique ne met pas en évidence d'anomalies, en particulier de monosomie 7 ou de délétion 5q, 8q ou 17q, décrites dans les syndromes myélodysplasiques.

Le patient a bénéficié à l'âge de 8 mois d'une greffe de moelle osseuse, phéno-identique. Le suivi actuel est de 3 ans sans aucune complication infectieuse et avec une numération leucocytaire normale.

L'association des infections récurrentes et de l'hyperleucocytose a initialement évoqué un « LAD » syndrome type I, de phénotype grave. Cependant, l'exploration complémentaire montre :

- Une expression des  $\beta_2$  intégrines normale à l'état basal avec une augmentation de leur expression ( $\times 1,5$ ), après stimulation des PNN par la PMA.

- Une diminution de l'adhésion des PNN stimulés (par le fMLP) à la gélatine, au fibrinogène (ligand de CD11b/CD18 et de CD11c/CD18) et aux cellules HUVEC ("human umbilical vein endothelial cell").
- Une expression quantitative et une fonctionnalité d'adhésion normales de PSGL-1 (ligand fucosylé de la P-sélectine et de la E-sélectine endothéliales) à la surface des PNN du patient, ce qui élimine un LAD de type II (cf. plus loin).
- Une absence d'agrégation des PNN du patient après stimulation par la PMA.
- Une diminution du chimiotactisme vis-à-vis du fMLP (en chambre de Boyden).
- Ces anomalies ne sont pas ou peu améliorées par adjonction de cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ ) ce qui n'est pas en faveur d'un "LAD" syndrome type I, variant 2.
- L'analyse de la réponse calcique, de la polymérisation des filaments d'actine, de la réponse oxydative (génération d'ions superoxydes), et du comportement de CD62L (clivage après stimulation des PNN) ne montre aucune anomalie.

Ces anomalies sont en faveur d'une anomalie fonctionnelle de la chaîne  $\beta_2$  intégrine.

Afin de mieux caractériser l'anomalie moléculaire, les auteurs fabriquent une lignée lymphoblastique EBV-transformée à partir des lymphoblastes B de l'enfant; cette lignée nommée LADV montre :

- une expression normale des  $\beta_1$  et  $\beta_2$  intégrines.
- Une absence d'agrégation après stimulation par la PMA.
- Une diminution de l'adhésion à ICAM1 (ligand des  $\beta_2$  intégrines), à l'état basal et après stimulation par la PMA. Cette adhésion est modérément améliorée par adjonction de cations divalents, mais reste basse par rapport aux valeurs trouvées pour la lignée contrôle.
- Une diminution de l'adhésion des PNN, à l'état basal comme après stimulation par la PMA, à la fibronectine, cette adhésion étant médiée par la  $\beta_1$  intégrine  $\alpha_4\beta_1$ . Ce défaut d'adhésion n'est pas amélioré en présence de cytochalasine D qui a pour propriété de réorganiser le cytosquelette, ce qui élimine une anomalie de régulation du cytosquelette.

- L'analyse par immunoprécipitation et immunoblot ne montre aucune altération structurale des  $\beta_1$  et  $\beta_2$  intégrines.

Au total, le patient présente une expression normale des  $\beta_1$  et  $\beta_2$  intégrines, mais qui ne sont pas fonctionnelles dans leur rôle de signalisation "inside-out" ne pouvant aboutir à la formation de "clusters". La présence de  $Mg^{2+}$  améliore modérément la capacité adhésive de ces récepteurs, impliquant la possibilité, par ce moyen, de changer la conformation des hétérodimères. L'ensemble des autres fonctionnalités du PNN (chimiotactisme, métabolisme oxydatif, flux calcique intracellulaire, polymérisation, variation de forme) est sans particularité, ce qui élimine une anomalie généralisée du phénomène de transduction. Une anomalie des protéines kinase C a été suggérée.

## I-1-B-DEFICIT DES SELECTINES ET DE LEURS LIGANDS

### I-1-B-①- Le "LAD" syndrome type II

Les "LAD" syndromes de type II sont des anomalies congénitales résultant d'une anomalie du métabolisme du fucose, aboutissant à l'absence de sLe<sup>x</sup> ou d'autres dérivés fucosylés, qui sont des ligands des sélectines. A ce jour, 5 patients ont été rapportés, tous d'origine arabe mais sans notion de consanguinité (Etzioni A, 1992; Phillips ML, 1995 ; Becker DJ, 1999 ; Marquardt T, 1999 ; Lübke T, 1999; Etzioni A, 2000).

#### Caractéristiques clinico-biologiques

Le tableau clinique est moins grave que celui rencontré dans le "LAD" syndrome de type I. A la naissance, il n'est pas observé de retard de chute du cordon ombilical. Durant les premières années de l'enfance, les sujets atteints présentent une incidence augmentée des infections (pulmonaires en particulier mais aussi parodontites, otites, cellulites et infections cutanées). Ces épisodes infectieux sont moins graves et ne nécessitent généralement pas d'hospitalisation ou d'antibiothérapie intra-veineuse. Après l'âge de 3 ans, la fréquence de ces infections diminue, ce qui rend inutile l'antibiothérapie prophylactique. Les manifestations survenant vers l'âge de 8-9 ans et persistantes à l'âge adulte sont des parodontites chroniques et marquées.

Contrairement au "LAD" syndrome de type I, où les anomalies sont restreintes aux dysfonctions des PNN, le "LAD" syndrome de type II entraîne des atteintes d'autres organes avec des dysmorphies faciales. Les enfants souffrent d'un profond retard mental et d'un important retard de croissance.

Les anomalies biologiques consistent, comme le "LAD" type I, en une hyperleucocytose à PNN ( $20-30 \times 10^9/L$ ) même en l'absence d'infection, avec polynucléose augmentant lors des épisodes infectieux (jusqu'à  $150 \times 10^9/L$ ). Les sites infectieux sont caractérisés par l'absence de pus, soit l'absence d'infiltration par des PNN et des lymphocytes.

Les anomalies fonctionnelles des PNN sont une diminution, *in vitro*, de la mobilité spontanée et vis-à-vis des facteurs chimiotactiques, de l'adhésion, et l'impossibilité de



réaliser l'étape de roulement *in vivo* (Price TH, 1995). Les PNN sont également incapables de se lier à des ligands comme la P-sélectine ou la E-sélectine.

### **Bases biochimiques**

Les patients atteints de "LAD" type II présentent un groupe sanguin rare de type Bombay (absence de substance H) et leurs hématies n'ont aucun antigène du groupe Lewis (Le(a-b-)). Ils présentent, de plus, un phénotype non sécréteur au niveau de la salive. Or, les antigènes H, Lewis et Secretor blood group sont tous des oligosaccharides fucosylés, ce qui évoque une anomalie du métabolisme du fucose.

Contrairement au "LAD" syndrome type I, l'expression des  $\beta_2$  intégrines (CD11/CD18) est normale. Les manifestations clinico-biologiques résultent d'une **anomalie du métabolisme du fucose**. Il ne persiste sur les PNN que 2 à 3% de glycoprotéines normalement fucosylées.

Le fucose est essentiel à la biosynthèse des ligands des sélectines (E-, P- et L-sélectine) comme les épitopes sLe<sup>x</sup> (CD15s) ou Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>). Ainsi, les leucocytes (PNN et cellules mononucléées) de "LAD" type II ne peuvent adhérer aux sélectines (E et P) endothéliales. De même, l'endothélium déficitaire en protéines fucosylées ne peut interagir avec la L-sélectine leucocytaire.

Il est surprenant que ce trouble du métabolisme du fucose qui est impliqué dans l'interaction hétérotypique leucocyte-cellule endothéliale ne soit associé qu'à un phénotype clinique similaire à un "LAD" syndrome type I de phénotype modéré. Certains auteurs émettent l'hypothèse que les PNN peuvent adhérer et migrer à travers l'endothélium *via* les  $\beta_2$  intégrines dans des zones vasculaires à faibles contraintes de cisaillement (von Andrian UH, 1993). Ainsi, quelques PNN peuvent émigrer vers le site inflammatoire dans les zones de vasodilatation où le flux vasculaire est diminué.

Ce déficit du métabolisme du fucose serait également impliqué dans la genèse du retard de croissance et du déficit mental, bien que le rôle précis du fucose dans le développement statural et neurologique ne soit pas élucidé. Une anomalie de régulation de la prolifération cellulaire du système nerveux central durant

l'embryogenèse pourrait contribuer à la survenue des anomalies neurologiques du syndrome "LAD" syndrome type II.

Il a été observé, chez un patient atteint de "LAD" syndrome type II, une augmentation de 8 fois de la production médullaire en PNN. Ce fait a été également trouvé pour un modèle murin déficitaire pour la voie sélectine-dépendante avec un ratio compartiment granuleux / compartiment érythroïde déséquilibré (5 fois plus de précurseurs granuleux). Ces données illustrent le rôle essentiel de la voie des sélectines pour la régulation de l'hématopoïèse (Gigant C, 2001).

Il a été récemment démontré l'existence **d'un déficit enzymatique en GDP-D-mannose-4, 6 déhydratase**, c'est-à-dire l'enzyme qui convertit le mannose en fucose (Karsan A, 1998 ; Sturla L, 1998). Le métabolisme du fucose implique deux voies de synthèse : une "de novo" et une "voie de secours" (*figure n°III-2-2*). La voie "de novo" (pour 90% du fucose) convertit le GDP-mannose en GDP- $\beta$ -fucose à l'aide de trois enzymes cytosoliques : la GDP-mannose 4,6 déhydratase, une 3,5 épimérase et une 4-réductase. La "voie de secours" (pour 10% du fucose) convertit le fucose extra-cellulaire ou intra-cellulaire (lysosomal) en GDP- $\beta$ -fucose grâce à une fucose kinase et une GDP-L-fucose-pyrophosphorylase. Le GDP-fucose est ensuite transporté dans la lumière du Golgi où il est métabolisé par des fucosyl-transférases en glucoconjugués fucosylés (sLe<sup>x</sup>  $\alpha$ 1,3-fucosylé leucocytaires et endothéliaux, antigène H  $\alpha$ 1,2-fucosylé à la surface des hématies ce qui explique le phénotype Bombay, protéines N-glycanes  $\alpha$ 1,6-fucosylées pour d'autres cellules comme les fibroblastes,...) (*figure n°III-2-3*). Cependant le dosage quantitatif de la GDP-mannose 4,6 déhydratase ne montre pas de déficit et le clonage de ce gène n'a pas mis en évidence d'anomalie de séquence, ce qui suggère la présence de mutations au niveau de protéines régulatrices de cette enzyme.

Il est observé, pour le "LAD" type II, une amélioration du statut infectieux avec l'âge, contrairement au "LAD" syndrome type I. Il est envisageable que la "voie de secours pour la formation de GDP-fucose" *via* le fucose se développe et explique cette amélioration clinique.

La présence d'hématies déficientes en substance H rend possible la réalisation d'un diagnostic anténatal.

En 1995, certains auteurs (Phillips ML, 1995) émettent l'hypothèse que la supplémentation en fucose permettrait la correction des épitopes sLe<sup>x</sup> (CD15s) ou Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>). Cependant, cette solution thérapeutique séduisante serait hélas compliquée par la survenue d'une grave anémie hémolytique. En effet, ces sujets "LAD" II de phénotype Bombay possèdent des titres élevés d'anticorps de classe IgM dirigés contre les antigènes A, B, et H. Ce traitement serait associé à la disparition du phénotype Bombay ce qui théoriquement laisserait la possibilité aux anticorps anti-H d'agir. En 1999, après avoir montré *in vitro* que la supplémentation en fucose corrigeait le déficit en protéines N-glycanes  $\alpha$ 1,6-fucosylées sur des fibroblastes en culture provenant de patient atteint de "LAD" type II, l'expérimentation substitutive a été appliquée chez le patient (Marquardt T, 1999). Des études cinétiques chez des sujets volontaires sains ont préalablement montré que l'administration de fucose à la posologie de 50 à 100 mg/kg augmentait la concentration sérique du fucose avec un maximum à 110 à 210  $\mu$ M à 60 minutes post-ingestion et des concentrations basales 24 heures après, augmentées. L'administration orale progressive de fucose (de 55 à 492 mg/kg sur une période de 277 jours) a été associée à :

- une restauration de l'expression des ligands des E- et P-sélectines (sLe<sup>x</sup>  $\alpha$ 1,3-fucosylé) à la surface des PNN. Cependant la posologie nécessaire à la re-expression des ligands aux sélectines est plus importante pour la E-sélectine par rapport à la P-sélectine. L'existence dans les cellules myéloïdes de deux  $\alpha$ 1,3-fucosyltransférases (Fuc-TIV et Fuc-TVII) pourrait expliquer cette différence observée.
- L'absence de restauration de l'expression globulaire des antigènes H (antigène H  $\alpha$ 1,2-fucosylé) concordant avec la disparition de signe d'anémie hémolytique. La biosynthèse des dérivés glucoconjugués fucosylés nécessite donc des concentrations différentes en fucose.
- Une régression de l'hyperleucocytose survenant 10 jours après le début de la thérapie substitutive (PNN à  $1,5 \times 10^9/L$ ), associée à la disparition des infections permettant l'arrêt de l'antibioprophylaxie.
- L'amélioration du développement psychomoteur et du retard mental avec un passage du fucose à travers la barrière hémato-méningée démontré.

En conclusion, l'apport substitutif en fucose représente une solution thérapeutique efficace et de mise en œuvre facile dans le "LAD" type II. Cette thérapie pourrait éviter

la greffe de moelle ou la thérapie génique pour le moment irréalisable puisque le gène impliqué n'a pas encore été trouvé.

Plus récemment, la même équipe a montré que ce patient "LAD" syndrome type II répondant à cette supplémentation orale en fucose **ne présentait pas de déficit en GDP-D-mannose-4,6 déshydratase** (Körner C, 1999). Par contre, **ce patient présenterait une anomalie du transport du GDP-fucose dans le Golgi** (Lübke T, 1999). Cette anomalie de transport entraîne une augmentation de la concentration cytosolique du GDP-fucose ainsi qu'une diminution du GDP-fucose dans le Golgi aboutissant à une hypofucosylation des glycoprotéines. Cette augmentation de la concentration cytosolique du GDP-fucose explique également la diminution de formation de GDP-fucose à partir de GDP-mannose du fait du rétrocontrôle inhibiteur de la GDP-D-mannose-4,6 déshydratase exercé par le GDP-fucose.

Ce déficit de transport est spécifique au GDP-fucose et n'altère pas le transport d'autres nucléotides (vérifié pour le UDP-galactose) suggérant une anomalie ciblée du transporteur spécifique du GDP-fucose.

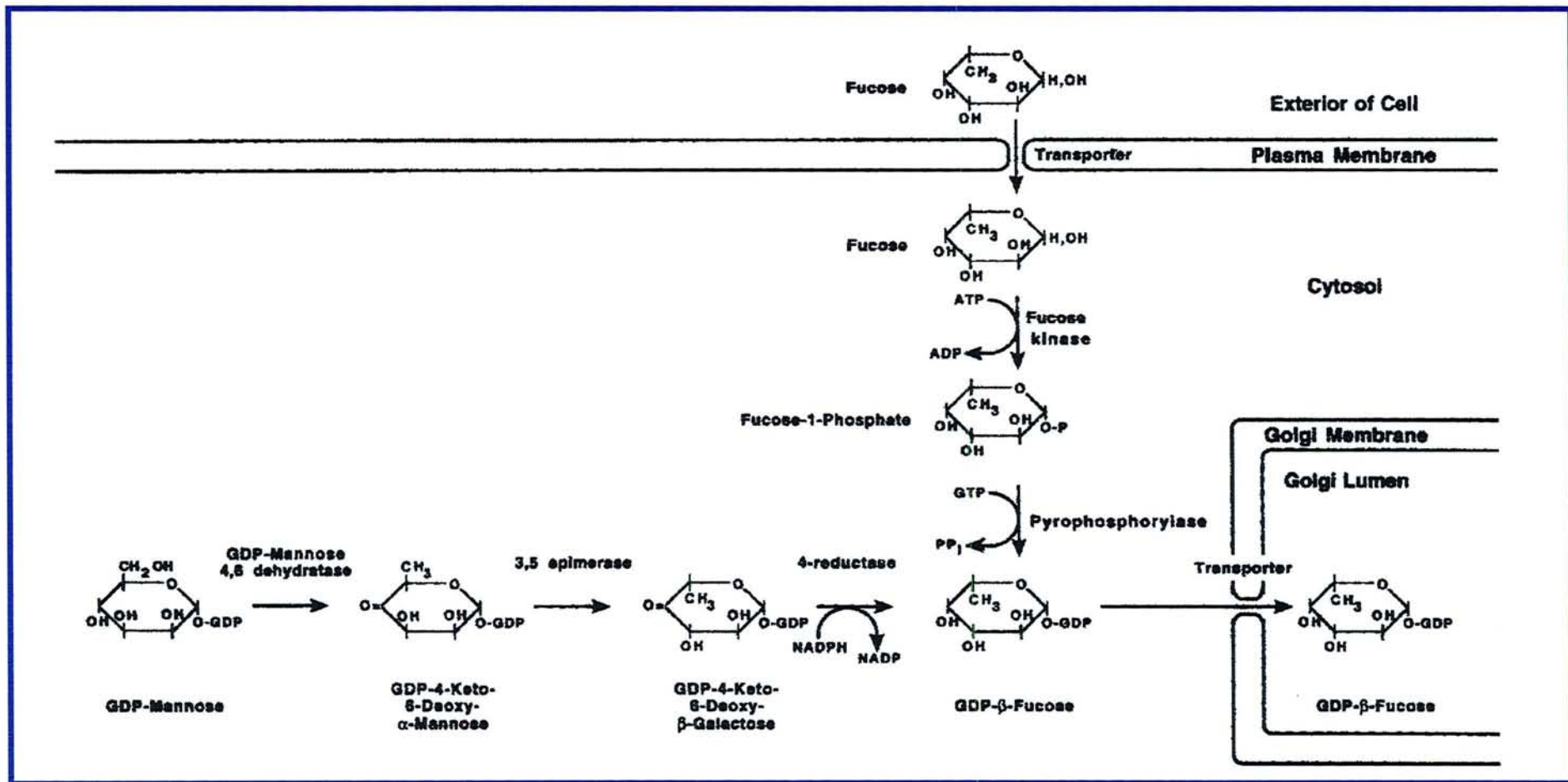


Figure n°III-2-2: Métabolisme du fucose (d'après Becker DJ, 1999).

**Pour la thèse de Véronique LATGER-CANNARD,**

**Il n'y a pas de Page 98.**

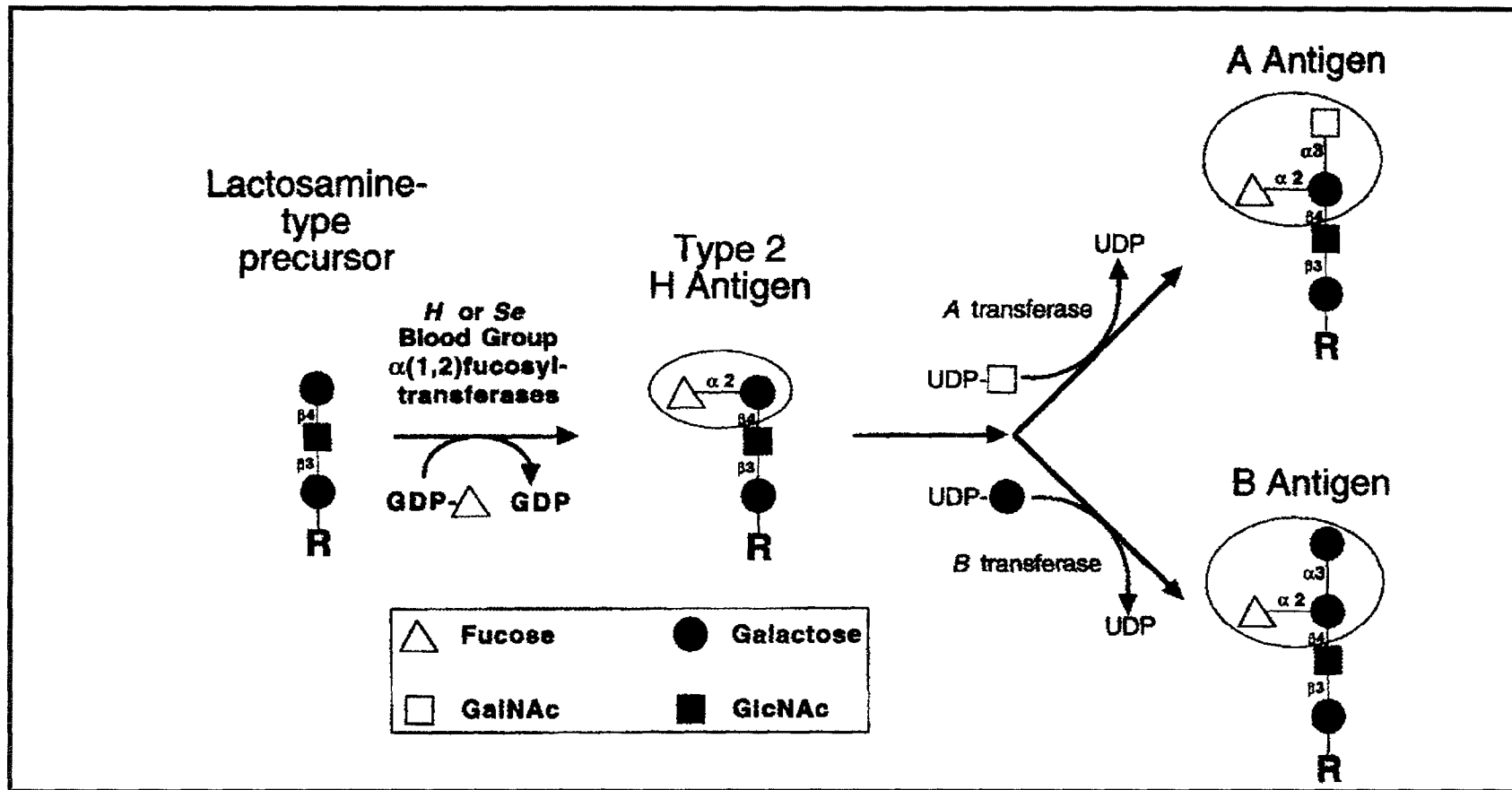


Figure n°III-2-3: Synthèse des antigènes de groupes sanguins H, A, B (d'après Becker DJ, 1999).

## I-1-B-②- Le "LAD" syndrome type III ?

### Caractéristiques clinico-biologiques

L'unique patiente, rapportée à ce jour, a présenté dès la naissance une histoire clinique lourde en épisodes infectieux souvent sévères (De Lisser HM, 1999) : à cinq semaines de vie, une omphalite à *Pseudomonas*; durant la première année, une mastoïdite et une adénite ayant nécessité un drainage chirurgical, et jusqu'à l'âge de 10 ans, date à laquelle la patiente consulte l'équipe qui fera le diagnostic de son déficit, des adénites cervicales, deux épisodes d'arthrite septique, une cellulite periorbitaire et deux septicémies, tout cela malgré une antibiothérapie prophylactique. A l'âge de 10 ans, elle présente une gangrène à *Clostridium septicum* de l'extrémité inférieure de sa jambe droite rapidement évolutive nécessitant une amputation.

Bien que du pus et un infiltrat cellulaire inflammatoire soient présents au niveau des sites infectés, ces derniers sont en quantité moindre et parfois de survenue retardée.

Biologiquement, une neutropénie est présente (PNN à  $0,4 \times 10^9/L$ ), régressive avec un traitement par facteur de croissance (PNN à  $7 \times 10^9/L$ ). Les fonctions du PNN (chimiotactisme, phagocytose, respiration oxydative) sont normales. L'exploration immunologique quantitative et fonctionnelle ne révèle aucune anomalie.

L'administration de facteur de croissance est suivie d'une augmentation des PNN sans amélioration clinique.

### Bases biochimiques

L'expression membranaire des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN ne montre aucun déficit pour la L-sélectine, CD18 ou sLe<sup>x</sup>. La stimulation des PNN par le TNF $\alpha$  et le fMLP entraîne une diminution de l'expression de la L-sélectine associée à une augmentation de celle de CD18, attestant une bonne réactivité du PNN.

Cette étude quantitative des récepteurs d'adhérence est complétée par une étude de leur fonctionnalité. L'adhésion *in vitro* des PNN à des cellules endothéliales en culture (HUVEC) et leur migration transendothéliale sont similaires à celles des témoins.



La réalisation de l'amputation de la jambe gauche a permis de disposer de tissu vasculaire afin de réaliser des études immuno-histochimiques. Alors que PECAM-1, ICAM-1 et la P-sélectine sont exprimés sur l'endothélium, aucune expression de la E-sélectine n'est détectée.

Des cultures de peau ont montré une faible expression de E-sélectine et modérée de ICAM-1 comme pour le témoin. L'incubation en présence de  $\text{TNF}\alpha$  entraîne une augmentation de ICAM-1 sans variation associée de la E-sélectine, contrairement au témoin. Ces données suggèrent **une absence d'expression de la E-sélectine à la surface de l'endothélium.**

L'étude de l'ARN par RT-PCR montre que l'ARNm correspondant à la E-sélectine est bien présent. Ceci suggère que la E-sélectine est rapidement sécrétée ou "coupée" de la surface de l'endothélium. Une étude par ELISA montre une quantité importante de la E-sélectine soluble circulante ( $186 \pm 38$  ng/mL pour la patiente et  $90 \pm 13$  ng/mL pour quatre sujets témoins), sous forme d'un fragment résultant d'un clivage protéolytique.

Le séquençage du gène de la E-sélectine a permis de mettre en évidence deux mutations hétérozygotes : l'une dans l'exon du domaine CR5 et l'autre dans l'exon cytoplasmique 2.

En conclusion, ce nouveau "LAD" syndrome est caractérisé par une anomalie fonctionnelle d'une sélectine endothéliale, la E-sélectine. La E-sélectine pourrait subir un excès de clivage protéolytique expliquant à la fois la diminution de son expression membranaire et une nette augmentation de la forme sécrétante.

Comment alors expliquer la relation entre ce déficit d'expression endothélial de la E-sélectine associée à une augmentation de la forme sécrétante circulante (sE-sélectine) et la tendance à développer des infections ?

- La première explication se trouve dans le rôle essentiel des sélectines lors de la phase de roulement des leucocytes à la surface endothéliale. Une anomalie de cette étape peut aboutir à l'absence d'extravasation des leucocytes au niveau du site inflammatoire. Cependant des modèles murins sélectivement déficitaires en E-sélectine n'ont pas montré d'incidence augmentée d'infections, suggérant un rôle compensateur de la P-sélectine

qui aurait un rôle redondant avec la E-sélectine. Le rôle de la P-sélectine serait différent chez l'homme.

- La deuxième hypothèse repose sur le rôle de la E-sélectine dans d'autres fonctions de la réaction inflammatoire. Il a été en effet démontré que l'interaction de cette sélectine avec des PNN améliore leur phénotype adhésive en régulant l'expression de CD11b/CD18. Ainsi la diminution de l'expression endothéliale de E-sélectine entraîne une diminution de l'activation des PNN et par conséquent de leur capacité phagocytaire.
- La présence de la forme sécrétante de la E-sélectine en quantité importante pourrait apporter une troisième explication à la survenue d'infections. Bien que son rôle *in vivo* soit peu connu, la sE-sélectine est capable de favoriser l'adhésion et l'activation leucocytaire. Il est donc supposé que cette sE-sélectine en grande quantité circulante aboutisse à une activation leucocytaire intravasculaire inappropriée ou bien altère les interactions avec les cellules endothéliales activées.

Le mécanisme de la neutropénie reste non élucidé : les auteurs suggèrent que le phénomène qui altère l'expression endothéliale de la E-sélectine pourrait impliquer l'expression d'autres récepteurs d'adhérence leucocytaires et endothéliaux impliqués dans la phase de mobilisation des leucocytes à partir de la moelle osseuse. Une autre hypothèse est émise par Etzioni A (1999b). La présence de E-sélectine à forte concentration pourrait entraîner une activation des PNN conduisant à une majoration de leur apoptose, expliquant la survenue de la neutropénie.

|   | "LAD" type I                                       | "LAD" type I variant 1                                  | "LAD" type I variant 2   |
|---|--|---|--|
| <b>Manifestations cliniques</b>         |  |   |  |
| Age de révélation                       | premiers jours de vie                              | premières années de vie                                 | premières années de vie  |
| Infections récurrentes                  | fréquentes   | Fréquentes mais non graves                              | fréquentes   |
| Parodontites                            | présentes  | absentes  | présentes  |
| Infections cutanées                     | fréquentes   | fréquentes  | fréquentes   |
| Retard à la chute du cordon ombilical   | fréquent   | non rapporté  | non rapporté   |
| Anomalies du développement              | absentes   | absentes  | absentes   |
| <b>Bases biochimiques</b>               |  |   |  |
| Expression de CD18                      | <b>fortement diminuée ou absente</b>               | normale   | Modérément diminuée (40-60%)   |
|   |  | <b>anomalie fonctionnelle du récepteur "inside-out"</b> | <b>anomalie structurale du récepteur (site de liaison avec ligand)</b> |
| Expression de sLeX                      | normale  | normale   | normale  |
| <b>Anomalies fonctionnelles des PNN</b> |  |   |  |
| Roulement des PNN                       | normale  | normale   | normale  |
| Adhérence ferme des PNN                 | fortement diminuée                                 | fortement diminuée                                      | fortement diminuée   |
| <b>Références</b>                       | <i>Anderson DC, 1987</i><br><i>Fischer A, 1988</i> | <i>Kuijpers TW, 1997</i>                                | <i>Hogg N, 1999</i>  |

Tableau n°III-2-1 : Manifestations clinico-biologiques des "LAD" syndromes.

|   | "LAD" type I variant 3                                  | "LAD" type II   | "LAD" type III                          |
|---|---|---|---|
| <b>Manifestations cliniques</b>         |   |   |   |
| Age de révélation                       | premières semaines de vie                               | les premiers jours de vie                                       | les premiers jours de vie               |
| Infections graves récurrentes           | fréquentes  | présentes mais moins graves, fréquence diminue durant l'enfance | fréquentes                              |
| Parodontites                            | non rapportées  | persistent à l'âge adulte                                       | non rapportées                          |
| Infections cutanées                     | fréquentes  | présentes   | fréquentes                              |
| Retard à la chute du cordon ombilical   | non rapporté  | non rapporté  | non rapporté                            |
| Anomalies du développement              | absentes  | retard mental et staturo-pondéral                               | non rapportés                           |
| <b>Bases biochimiques</b>               |   |   |   |
| Expression de CD18                      | normale ou augmentée                                    | normale   | normale                                 |
|   | <b>anomalie fonctionnelle du récepteur "inside-out"</b> |   |   |
| Expression de sLe <sup>x</sup>          | normale   | <b>nulle</b>  | normale                                 |
| Expression de la E-sélectine            | normale   | normale   | <b>diminuée (endothélium)</b>           |
| <b>Anomalies fonctionnelles des PNN</b> |   |   |   |
| Roulement des PNN                       | normal  | absent  | normale à des HUVEC                     |
| Adhérence ferme des PNN                 | fortement diminuée                                      | normale   | mais absents à l'endothélium du patient |
| <b>Références</b>                       | <i>Harris ES, 2001</i>                                  | <i>Becker DJ, 1999</i>  | <i>De Lisser HM, 1999</i>               |

Tableau n°III-2-1 (suite) : Manifestations clinico-biologiques des "LAD" syndromes.

## I-2- LA GLYCOGENOSE Ib

La glycogénose Ib résulte d'un déficit en glucose-6-phosphate (G6P)-translocase qui assure le transport du G6P à travers la membrane du réticulum endoplasmique (Narisawa K, 1978, Lange AJ, 1980, Bashan N, 1988, Verhoeven AJ, 1999). Ces patients présentent des signes cliniques caractéristiques comme une hépatomégalie, des épisodes d'hypoglycémies brutales, une hyperuricémie, des retards de croissance ou des hypertrophies rénales (Ambruso DR, 1985). La plupart de ces patients souffrent de complications infectieuses (Visser G, 2000), excepté dans de rares cas décrits plus récemment, suggérant une variation allélique (Bonioli E, 1990; Kure S, 2000). Cette susceptibilité à présenter des infections bactériennes est expliquée par la présence d'une neutropénie associée à une altération des fonctions leucocytaires impliquant PNN et monocytes. Les fonctions lymphocytaires ne sont, par contre, pas perturbées (Gitzelmann R, 1993, Visser G, 2000). Ces altérations fonctionnelles incluent une diminution de la mobilité *in vivo* et du chimiotactisme *in vitro*, de la capacité de phagocytose et de leur potentialité oxydative (explosion respiratoire).

Il a été montré récemment que la glycogénose Ib était une maladie de transmission autosomale récessive, dont les gènes impliqués étaient situés sur le chromosome 11q23 (Annabi B, 1998, Veiga-da-Cunha M, 1998). Cependant les relations entre les déficits fonctionnels leucocytaires et l'anomalie métabolique restent méconnus.

Nous décrivons, dans ce mémoire, un patient atteint de glycogénose Ib, présentant des infections récurrentes, une altération des fonctions du PNN et un déficit de l'expression des récepteurs d'adhérence CD62L et CD11/CD18 qui régressent sous traitement par facteur de croissance.

## II- PATIENT- MATERIELS ET METHODES

### II-1- PATIENT

Le patient est né à terme, après une grossesse normale, de parents non-consanguins. Le nouveau-né présente, six heures après la naissance, des convulsions liées à une hypoglycémie brutale (glycémie: 1,4 mmol/L, valeurs de référence : 3,9-5,5 mmol/L) associée à une acidose lactique (pH sanguin : 7,2, acide lactique : 3,77 mmol/L ; valeurs de référence : 0,34-0,78 mmol/L), une hyperuricémie (acide urique : 416  $\mu$ mol/L ; valeurs de référence : 238-420  $\mu$ mol/L), une hypercholestérolémie (cholestérol : 8,9 mmol/L ; valeurs de référence : < 5,16 mmol/L) et à une hypertriglycéridémie (triglycérides : 7,5 mmol/L ; valeurs de référence : 0,46-1,48 mmol/L). Les fonctions hépatiques (transaminases) sont normales. Une hépatomégalie est notée à l'examen clinique. L'administration, soit de galactose, soit de glucagon, n'améliore pas la glycémie sanguine mais augmente significativement la concentration d'acide lactique. La biopsie hépatique montre la présence d'hépatocytes distendus renfermant des vacuoles de grande taille de glycogène et de graisse. L'ensemble de ces critères clinico-biologiques oriente fortement vers le diagnostic de glycogénose de type I. Une supplémentation appropriée en glucose est alors administrée afin d'obtenir une normalisation des concentrations sanguines en glucose et acide lactique, ce qui a été suivi d'une croissance staturo-pondérale normale (*figure n°III-2-4*).

La neutropénie a été observée pour la première fois à l'âge de 7 ans (PNN :  $0,8 \times 10^9/L$  en 1987) et a persisté ensuite (*figure n°III-2-5-A*). A partir de cet âge, sont survenues des complications infectieuses récurrentes, à la fréquence de 2 à 6 épisodes par an et représentées par des infections cutanées, en particulier des furoncles au niveau du visage, des fesses et des jambes, des abcès périanaux, des otites récidivantes et un épisode d'infection pulmonaire. Ces épisodes infectieux ont été traités par une antibiothérapie systémique, complétée parfois par des nettoyages chirurgicaux. Le patient présentait également des aphtes buccaux, une à deux fois par mois.

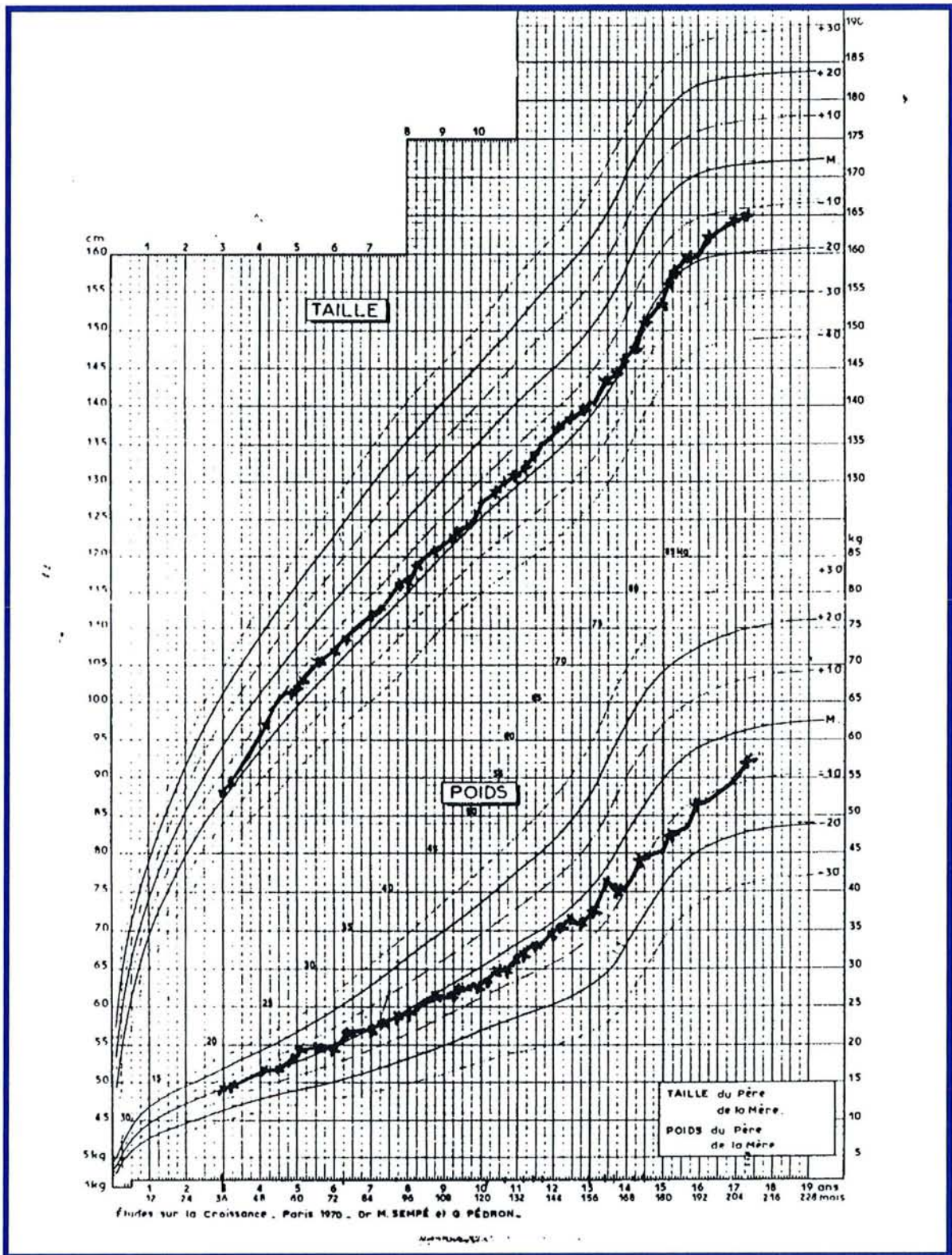


Figure n°III-2-4 : Courbe statur-pondérale de l'enfant atteint de glycogénose Ib après supplémentation appropriée en glucose.

L'examen des frottis médullaires a montré une moelle hyperplasique sans anomalie de maturation. La présence de ce contexte infectieux, associé à la neutropénie, a orienté le diagnostic vers une glycogénose de type Ib. Un déficit de l'activité de la G6P translocase n'a pas été mis en évidence chez ce patient mais une mutation dans la région 11q23 a été trouvée pour le propositus et ses parents (Veiga-da-Cunha M, 1998). Cette analyse a montré la présence de la mutation 1211delCT/1211delCT pour le propositus et la délétion 1211delCT/N pour le père et la mère. Ces données moléculaires ont confirmé le diagnostic de glycogénose Ib.

A l'âge de 18 ans, la recrudescence de la fréquence des infections (1 à 3 épisodes par mois), a motivé le recours à un traitement par facteur de croissance de type G-CSF (*figure n°III-2-5-B*). Dans un premier temps, l'administration de filgrastime (Neupogen<sup>®</sup>, 5 µg/kg/jour, voie sous-cutanée) a dû être interrompue du fait de la survenue d'une myosite des deux mollets. Puis, deux mois plus tard, l'injection unique de molgramostime (Leucomax<sup>®</sup>) a été suivie d'un malaise, ce qui a réfuté la poursuite de ce traitement. Finalement, l'administration de lenograstime (Granocyte<sup>®</sup>, 5 µg/kg/jour, 3 fois par semaine, voie sous-cutanée) a été cliniquement bien tolérée et a entraîné une augmentation de la concentration en PNN au dessus du seuil de  $1,5 \times 10^9/L$ . Le statut infectieux du patient s'est nettement amélioré puisque les aphtes buccaux ont disparu et la fréquence des infections a diminuée à 1 fois par an.



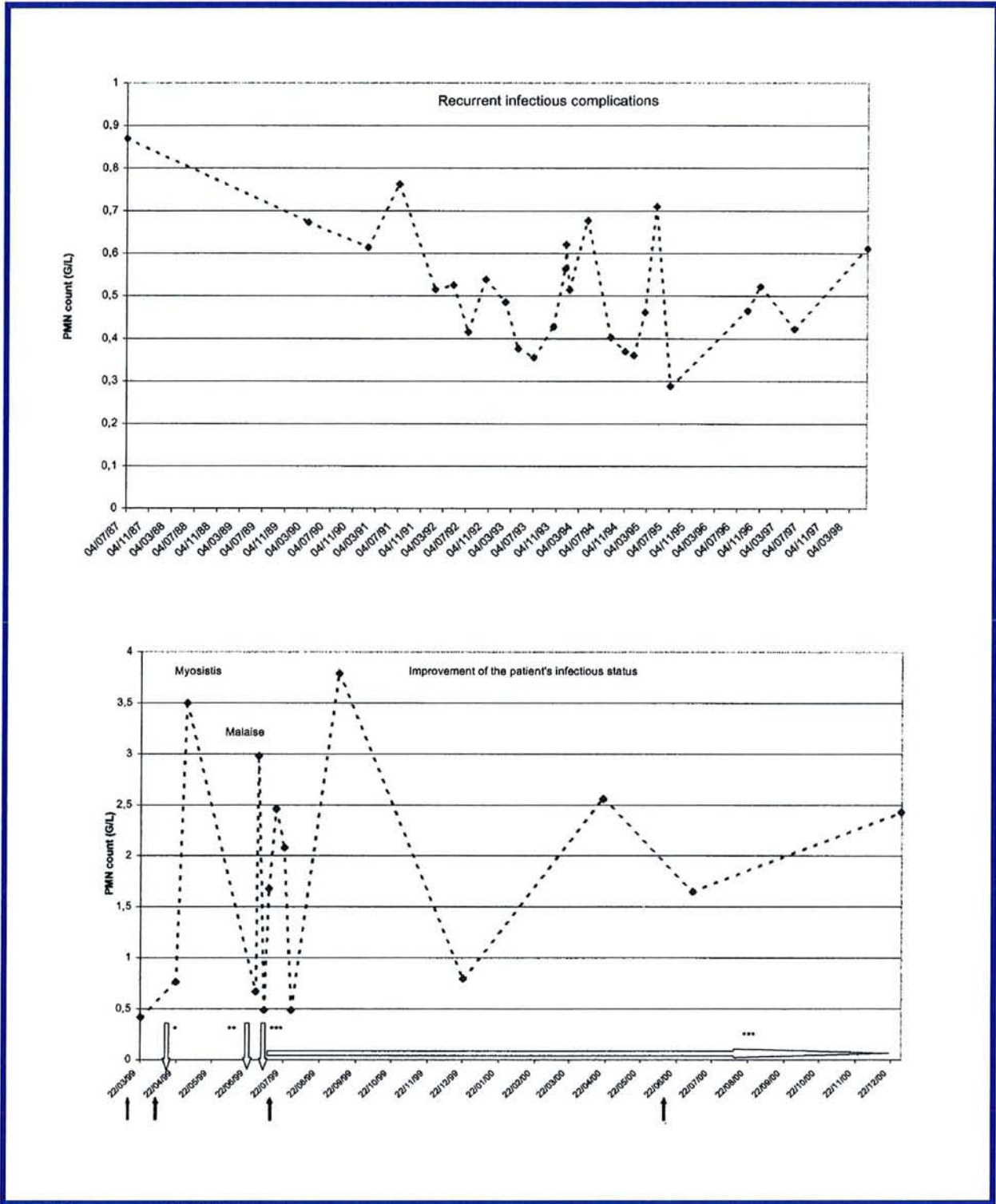


Figure n°III-2-5 :

- A. Courbe d'évolution de la concentration en PNN avant tout traitement par facteurs de croissance.
- B. Effet des facteurs de croissance sur la numération des PNN. (figrastime, Neupogen® : flèche avec une astérisque; molgramostime, Leucomax®: flèche avec deux astérisques; lenograstime, Granocyte®: flèche avec trois astérisques). La chronologie des explorations des fonctions des PNN est représentée par des flèches pleines.

## **II-2- MATERIELS ET METHODES**

L'exploration des fonctions des PNN du patient a été réalisée, en double, avant et après traitement par facteurs de croissance (chronologie montrée sur la *figure n°III-2-5*). Durant ce traitement, les échantillons sanguins ont été prélevés avant l'administration de facteur de croissance, afin de respecter un délai de 24 heures entre l'administration de facteur de croissance et l'analyse des PNN.

### **II-2-A- PRELEVEMENT**

Pour l'étude du chimiotactisme, du métabolisme oxydatif et de la phagocytose, les PNN ont été isolés à partir de sang total recueilli en présence d'héparine. Pour l'étude des récepteurs d'adhérence, l'analyse est réalisée sur des PNN provenant de sang total, recueillis en présence d'EDTA.

### **II-2-B- ISOLEMENT DES PNN**

Les PNN sont isolés à l'aide d'une centrifugation sur gradient de densité Polymorphprep<sup>®</sup> (Nycomed Pharma) (cf. technique détaillée dans chapitre II Méthodologie générale).

### **II-2-C- ETUDE DU CHIMIOTACTISME DES PNN**

(technique selon Nelson RD, 1975).

#### **Principe**

L'étude du chimiotactisme des PNN est l'analyse du procédé par lequel un facteur chimiotactique, disposé selon un gradient de concentration, induit un mouvement de migration orientée de cette cellule vers ce facteur. Les PNN expriment des récepteurs pour des agents chimiotactiques provenant de la paroi bactérienne comme les peptides N-formylés, des facteurs provenant de l'activation complémentaire (C5a), ou dérivant du métabolisme cellulaire, de l'acide arachidonique (leukotriène B4) ou de la phosphatidylcholine (facteur activateur plaquettaire, PAF).

Les récepteurs aux facteurs chimiotactiques appartiennent à la famille des « serpentes » nommées ainsi du fait de leur structure moléculaire qui « serpente » à travers la membrane cellulaire grâce à 7 domaines transmembranaires, et qui sont

couplés à des protéines G liant le GDP. La liaison d'un agent chimiotactique à son récepteur entraîne l'échange de ce GDP en GTP et la protéine G ainsi activée, active à son tour des mécanismes de transduction, conduisant à la mobilisation des granules intracellulaires et au chimiotactisme.

Le principe de ce test est de reproduire la migration des monocytes sur un gel d'agarose en présence de substances attractantes réparties selon un gradient de concentration. Les facteurs chimiotactiques utilisés dans notre étude sont le formyl méthionyl leucyl phénylalanine (fMLP), peptide synthétique reproduisant une structure de base des parois bactériennes et le ZAS (sérum activé par le zymosan).

### **Matériels et réactifs**

- Boîtes de Pétri stériles en plastique pour culture cellulaire (Falcon 3002, 60 x 15 mm).
- Réchaud.
- Incubateur à 37°C à atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.
- Tubes jaugés de 10 mL, en verre.
- Emporte-pièce pour gélose de 3 mm de diamètre intérieur.
- Eau distillée stérile.
- Milieu MEM 10x (Minimum Essential Medium) concentré 10 fois (Gibco, réf 21430-020).
- Bicarbonate de sodium à 7,5% (Prolabo, réf 27 778.293).
- Pool de sérum humain inactivé par la chaleur (chauffer le sérum à 56°C pendant 30 min) et conservé à -80°C.
- Agarose = indubiose A37 (Industrie Biologique Française, réf 230 231).
- Zymosan (Sigma, réf Z 4250).
- fMLP (Sigma, réf F 6004).
- Méthanol (Merck, MC 310655).
- Formaldéhyde (Prolabo, 20 909.290).
- Fuschine (RAL).

## Mode opératoire

### Préparation des facteurs chimiotactiques

#### + ZAS :

- Suspension de zymosan à 10 mg/mL dans du tampon PBS.
- Ajouter à 100 µL de cette suspension 1 mL de sérum frais.
- Incubation 60 min à 37°C sous agitation.
- Centrifugation 5 min à 3500 tours/min et récupérer le surnageant en fractions de 100-200 µL, conservées à -20°C.

#### + fMLP :

- Préparer une solution à  $10^{-3}$  M, soit dissoudre 2,2 mg de fMLP dans 5 mL de milieu MEM.
- Faire 2 dilutions au 1/100 pour obtenir une concentration de  $10^{-7}$  M.
- Congeler à -20°C et attendre au moins 15 jours avant toute utilisation.

### Préparation des boîtes de Pétri

#### + Préparation de la gélose (pour 4 boîtes de gélose) :

- Ajouter 0,24 g d'indubiose A 37 à 10 mL d'eau distillée dans un tube jaugé en verre de 10 mL.
- Placer le tube au bain-marie bouillant 5 à 10 min jusqu'à dissolution complète, en le remuant de temps en temps.
- Dans un bécher, déposer de façon stérile :
  - . 5,8 mL d'eau distillée stérile.
  - . 2,0 mL MEM 10X.
  - . 2,0 mL de sérum inactivé.
  - . 0,2 mL de Na HCO<sub>3</sub> à 7,5%.
- Ajouter la gélose dans le bêcher et mélanger.

- Distribuer rapidement 4,7 mL de ce milieu dans chaque boîte de Pétri en évitant l'introduction de bulles d'air. Homogénéiser les boîtes et laisser refroidir en les laissant d'abord sur la paillasse puis en les mettant à 4°C (30 min minimum et une ½ journée au maximum).

+ Découpe des puits : découper 4 séries de 2 puits de 3 mm de diamètre, séparés entre eux de 3 mm (*figure n°III-2-6*).

### **Dépôt de la suspension cellulaire et des facteurs chimiotactiques**

- Déposer dans trois puits externes 10  $\mu$ L de facteur chimiotactique, le quatrième restant vide, représentera le contrôle. Le ZAS sera déposé 1 heure à l'avance afin d'établir le gradient de concentration ; ce temps de diffusion préalable n'est pas nécessaire au fMLP.
- Déposer dans les quatre puits externes 10  $\mu$ L de suspension de PNN.
- Incubation des boîtes dans l'incubateur à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>, durant 24 heures.

### **Fixation et coloration**

- Fixation : recouvrir les boîtes de 5 mL de méthanol pendant 30 min ; puis remplacer le méthanol par 5 mL de formaldéhyde pendant 30 min et vider.
- Décoller soigneusement les géloses et retourner sur un papier absorbant.
- Coloration : mettre 2 à 3 gouttes de fuschine avec de l'eau distillée durant quelques secondes. Rincer doucement à l'eau distillée et laisser sécher.

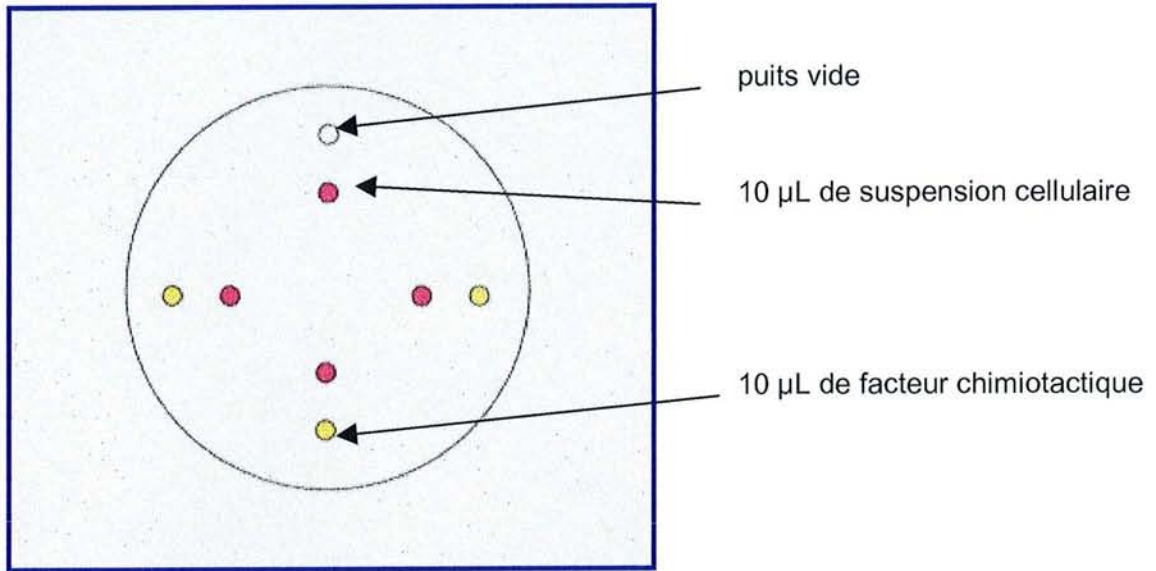
### **Lecture (figure n°III-2-6)**

- Au microscope, objectif x 10, avec un quadrillage de 10 carreaux sur 10 de 0,12 mm de côté.
- Repérer les plages de migration autour des puits des monocytes. En positionnant la grille en bordure des puits, mesurer les distances A et B de façon radiaire, en repérant la bande de la grille qui renferme encore au moins 2 monocytes ayant migré.
- Faire la moyenne des 3 puits et convertir la distance mesurée en mm, en sachant que 1 carreau (= 1 bande) = 0,12 mm.

### **Expression des résultats**

- A : migration par chimiotactisme
- B : migration spontanée
- A-B : différentielle chimiotactique
- A/B : index chimiotactique

**Découpe des puits - Dépôt de la suspension cellulaire et des facteurs chimiotactiques**



**Migration des cellules vers le facteur chimiotactique**

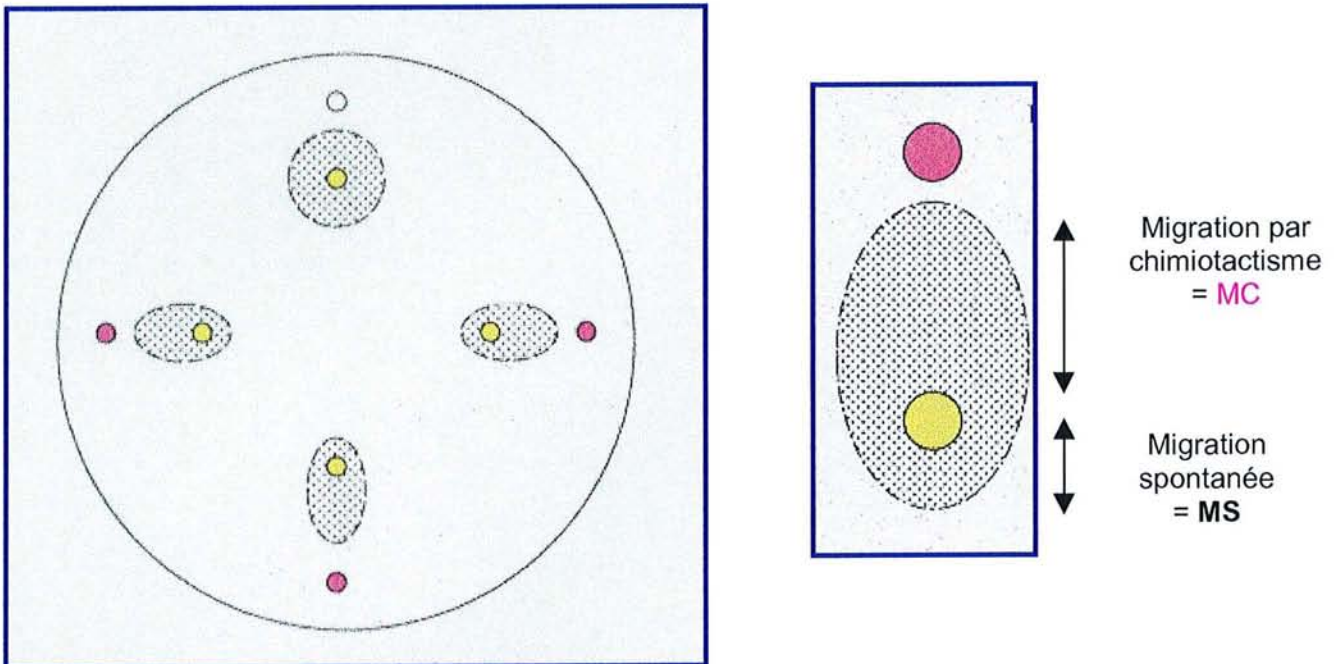
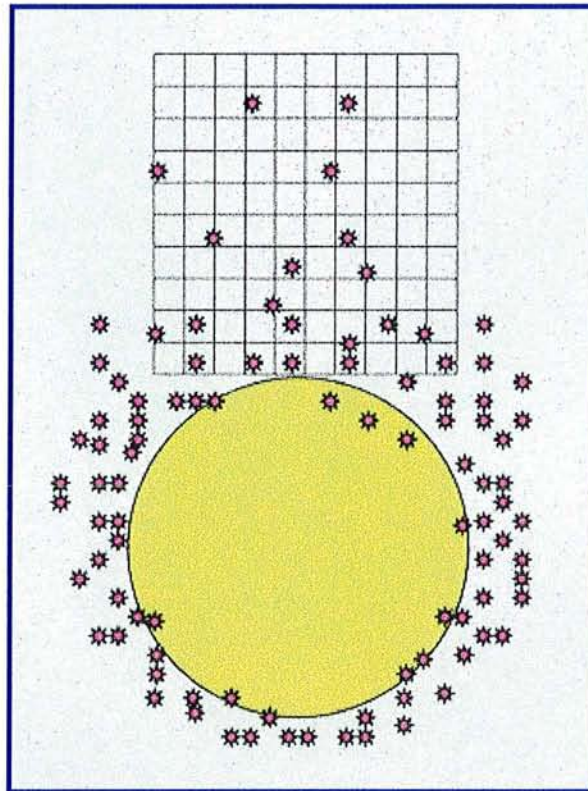


Figure n°III-2-6 : Analyse du chimiotactisme des PNN.



**Lecture au microscope.** Objectif x 10 avec un quadrillage de 10 carreaux x 10 carreaux de 0,12 mm de coté, en plaçant le bord du quadrillage au bord du puits de cellules. Prendre en compte la rangée qui ne renferme plus que 2 cellules.



### Expression des résultats

**A** : migration par chimiotactisme = moyenne des MC x 0,12 mm  
**B** : migration spontanée = moyenne des MS x 0,12 mm  
**A-B** : différentielle chimiotactique  
**A/B** : index chimiotactique

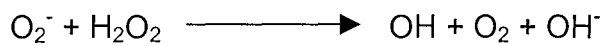
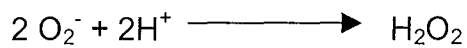
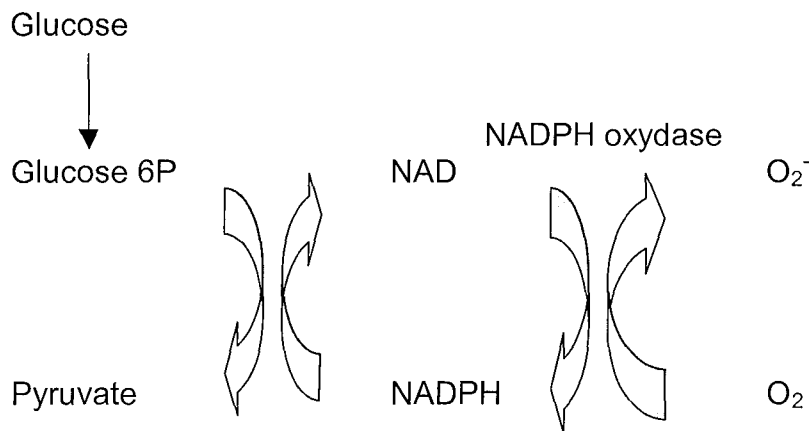
Figure n°III-2-6 (suite) : Analyse du chimiotactisme des PNN.

## II-2-D- ETUDE DU METABOLISME OXYDATIF

### II-2-D- ①-Technique par chimiluminescence

#### Principe

En stimulant un PNN, son métabolisme est augmenté, ce qui conduit à une consommation d'oxygène accrue ainsi qu'à la génération de différents métabolites de l'oxygène, hautement réactifs, de la façon suivante :



Les peroxydes et superoxydes libérés activent le luminol qui génère des émissions lumineuses, mesurées à l'aide d'un luminomètre.

#### Matériel

- Luminomètre 1251 LKB (Wallac).
- Centrifugeuse réfrigérée GR422 (Jouan).

#### Réactifs

- Tampon PBS glucosé pH à 7,4.
- Suspension de PNN à  $4-5 \times 10^6$ /mL.



- Zymosan A (Sigma) opsonisé. Effectuer une suspension de zymosan à 15 g/L dans du sérum AB. Le zymosan est opsonisé pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Le surnageant (après centrifugation de 10 min à 3000 tours/min) est éliminé et remplacé par un même volume de tampon PBS glucosé. Cette préparation peut être conservée à -18°C.

- Luminol 10<sup>-4</sup> M. Solution stock à 10<sup>-2</sup> M. Dissoudre 3,54 mg de luminol dans 2 mL de DMSO (diméthylsulfoxyde, Merck). Conservation à -4°C pendant une semaine. Cette solution sera diluée au 1/100 avec du PBS glucosé au moment de l'emploi.

- Tous les réactifs sont filtrés à 0,22 µm.

### Mode opératoire

Les mesures s'effectuent à 37°C. On utilise un échantillon et un blanc.

|                            | Essai  | Blanc  |
|----------------------------|--------|--------|
| Luminol 10 <sup>-4</sup> M | 700 µL | 700 µL |
| Zymosan opsonisé           | 200µL  | /      |
| PBS glucosé                | /      | 200 µL |
| Suspension cellulaire      | 100 µL | 100 µL |

Noter l'intensité maximale du signal (pic) et l'intégration du signal pendant 25 min, exprimées en volts (V).

### Expression des résultats

Emission maximale de lumière en volt/seconde pour 10<sup>6</sup> PNN =

$$\frac{(\text{Pic de l'échantillon en mV} - \text{pic du blanc en mV}) \times 10^6}{\text{Concentration cellulaire en PNN (10}^6 \text{ /}\mu\text{L}) \times 100}$$

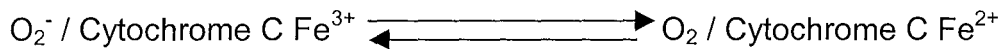
Emission moyenne de lumière en volt/seconde pour 10<sup>6</sup> PNN =

$$\frac{(\text{Intégration de l'échantillon en mV} - \text{intégration du blanc en mV}) \times 10^6}{\text{Concentration cellulaire en PNN (10}^6 \text{ /}\mu\text{L}) \times 1500 \times 100}$$

## II-2-D-②- Mesure de la génération de l'anion superoxyde par réduction du cytochrome C

### Principe

On mesure indirectement l'apparition de l'anion superoxyde  $O_2^-$  libéré par le PNN activé en mesurant la réduction du cytochrome C par cet anion.



En parallèle, on effectue une inhibition de cette réduction en ajoutant de la superoxyde dismutase (SOD) au milieu réactionnel, afin de s'assurer de la spécificité de la mesure. L'anion superoxyde est considéré comme un donneur d'électrons.

### Réactifs

- Cytochrome C (Sigma) : 2 mg/mL.
- Zymosan A (Sigma) : 15 mg/mL de sérum AB sont opsonisés pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et remplacé par le même volume de tampon PBS glucosé.
- SOD (Boehringer) : la solution à 1 mg/mL est préparée par avance et fractionnée pour une conservation à -18°C.
- Tampon PBS glucosé.
- Suspension de PNN isolés, ajustée à 500 PNN/ $\mu$ L.

### Matériel

- Lecteur/incubateur de microplaques Labosystems iEMS.
- Logiciel Delta Soft (Biometallis).

### Conditions de lecture

- Incubation à 37°C.
- Agitation 300/min.
- Longueur d'onde : 500 nm.
- Lecture d'absorbance sur 30 min.

## Mode opératoire

|                            | Tube 1 | Tube 2 |
|----------------------------|--------|--------|
| Cytochrome C (µL)          | 400    | 400    |
| Zymosan opsonisé (µL)      | 250    | 250    |
| SOD (µL)                   | 50     | /      |
| Tampon PBS (µL)            | /      | 50     |
| Suspension cellulaire (µL) | 500    | 500    |

Les tubes sont bouchés puis incubés 30 min à 37°C, sous agitation. Après ce temps, les tubes sont centrifugés à +4°C, à 3500 tours/min, pendant 10 min. La lecture des surnageants se fait en microcuve contre du PBS.

## Résultats

Les résultats sont exprimés en différence de Densité Optique (DO) pour 10<sup>6</sup> cellules

$$= \frac{\text{Delta DO}}{500 \times A}$$

A = nombre de cellules par µL

500 = volume de la suspension cellulaire en µL, introduit dans le milieu réactionnel.

## II-2-E- ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE

### Principe

La phagocytose des PNN est mesurée à l'aide de la trousse Phagotest Orpegen (Becton Dickinson). Ce test comprend des bactéries (*E. Coli*) opsonisées (anticorps et complément) marquées au FITC. Ces bactéries sont mises en contact avec les cellules durant 10 min afin d'être phagocytées. La fluorescence des bactéries non internalisées est supprimée à l'aide d'une solution d'inhibiteur. Après une lyse des globules rouges accompagnée d'une fixation des cellules et d'un marquage de leur ADN, les échantillons sont analysés par CMF. Les résultats sont exprimés en pourcentage de PNN devenus fluorescents.

## **Matériel et réactifs**

- Trousse Phagotest (Orpegen, Pharma).
- Cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson).

## **Mode opératoire**

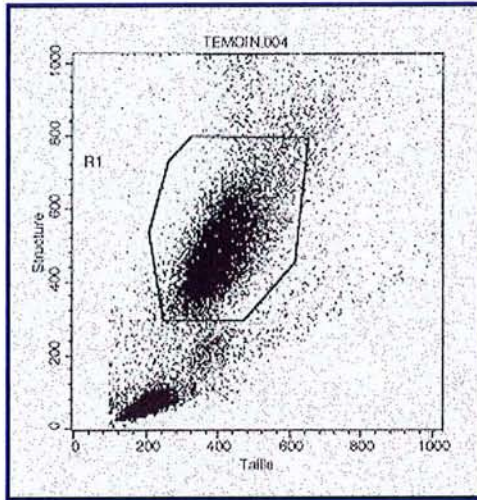
- Ajouter dans un tube maintenu à 0°C (dans de la glace), 100 µL de sang total et 20 µL d'*E. Coli* et incuber 10 min à 37°C sous agitation.
- Mettre le tube dans la glace pour arrêter la phagocytose.
- Rajouter 100 µL de solution d'inhibition et 3 mL de solution de lavage.
- Centrifuger à 1200 tours/min (250 g) pendant 5 min à 4°C, deux fois et éliminer le surnageant à la pompe à vide.
- Ajouter 2 mL de solution de lyse et incuber 5 min à température ambiante.
- Centrifuger à 1200 tours/min (250 g) pendant 5 min à 4°C et éliminer le surnageant à la pompe à vide.
- Rajouter 3 mL de solution de lavage à 0°C.
- Centrifuger à 1200 tours/min (250 g) pendant 5 min à 4°C et éliminer le surnageant à la pompe à vide.
- Rajouter 100 µL de solution de marquage de l'ADN à 0°C puis 400 µL de solution de lavage. Incuber 10 min à 0°C, dans l'obscurité.

## **Analyse au CMF (figure n°III-2-7)**

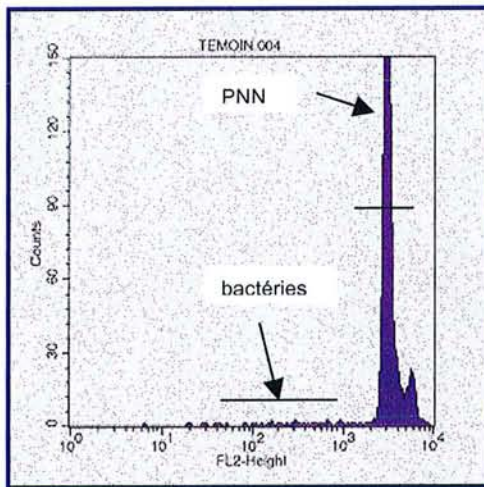
- L'analyse doit être réalisée au maximum une demi-heure après avoir ajouté la solution de marquage de l'ADN.
- Sur l'histogramme de fluorescence liée au marquage de l'ADN, réaliser une fenêtre électronique sur le pic de fluorescence des PNN pour les différencier des bactéries.
- Repérer sur le cytogramme taille/structure la population des PNN et faire une fenêtre électronique.
- Sur l'histogramme de fluorescence liée aux bactéries, analyser le pourcentage de PNN ayant incorporé cette fluorescence, ce qui correspond au pourcentage de PNN ayant phagocyté des bactéries.

## **Expression des résultats**

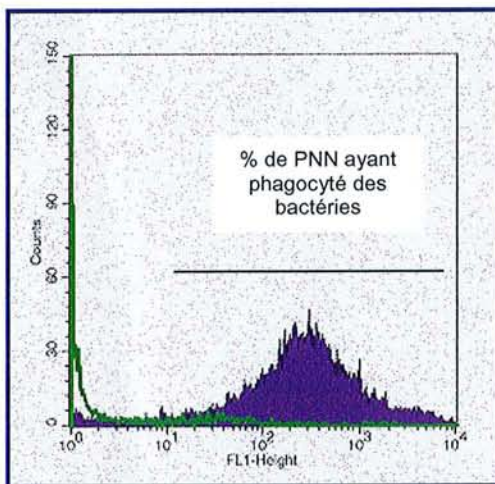
Les résultats sont exprimés en pourcentage de PNN ayant phagocyté des bactéries.



**Cytogramme taille/structure :**  
une fenêtre électronique délimite  
la population des PNN



**Histogramme de fluorescence  
liée au marquage de l'ADN :**  
permet de distinguer le pic de  
fluorescence des PNN  
de celui des bactéries



**Histogramme de fluorescence  
liée aux bactéries :**  
analyser le pourcentage de PNN  
ayant incorporé cette fluorescence,  
ce qui correspond au pourcentage  
de PNN ayant phagocyté des  
bactéries

Figure n°III-2-7 : Analyse de la phagocytose des PNN par CMF à l'aide de la trousse Phagotest (Orpegen Pharma, Becton Dickinson).

## **II-2-F- QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES PNN**

La quantification de l'expression de CD62L et de CD11b/CD18 à la surface des PNN a été réalisée à l'aide de la trousse Qifiki (Dako), selon la technique d'immunomarquage indirect (cf. Deuxième partie : Matériel et Méthodes). Les résultats sont exprimés en nombre de sites occupés par l'anticorps ou capacité liante de l'anticorps (CLA).

### **III- RESULTATS**

(tableau n° III-2-2)

#### ***Chimiotactisme des PNN***

Avant tout traitement par facteurs de croissance, la mobilité spontanée et chimiotactique vis-à-vis du ZAS ( $10^{-3}$  M) et du fMLP ( $10^{-7}$  M) des PNN du patient étaient diminuées, et sans changement après facteur de croissance.

#### ***Métabolisme oxydatif des PN***

Le métabolisme oxydatif des PNN était aussi altéré. La chimiluminescence des PNN vis-à-vis du zymosan et surtout de la PMA était diminuée tout comme la production d'ions superoxydes. Ces anomalies n'ont pas régressé après traitement par facteur de croissance.

#### ***Phagocytose des PNN***

La capacité de phagocytose était initialement diminuée puisque le pourcentage de bactéries phagocytées était seulement de 43% par rapport au témoin (> 80%). L'administration de facteur de croissance a abouti, au bout d'un an, chez notre patient, à une nette amélioration de cette capacité de phagocytose avec une ingestion de 95,7% des bactéries.

#### ***Expression quantitative des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN***

La quantification par CMF a montré une expression bimodale de ces récepteurs avec présence de deux pics correspondant à deux populations de PNN : l'une, évaluée à 30% des PNN analysés, présentant un déficit de l'expression de la L-sélectine CD62L et des  $\beta_2$  intégrines CD11b/CD18 ; l'autre, évaluée à 70% des PNN analysés, présentant une expression de ces récepteurs soit normale soit modérément augmentée par rapport aux valeurs des témoins (figure n°III-2-8 et tableau n°III-2-2). Ce déficit d'expression a complètement disparu après un an de traitement par facteur de croissance.

| Facteur chimiotactique    | Mobilité                         | Avant traitement par G-CSF |               |                  |               | Après 1 an de traitement par G-CSF |               |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------|------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
|                           |                                  | Patient (15 ans)           | <i>Témoin</i> | Patient (18 ans) | <i>Témoin</i> | Patient (19 ans)                   | <i>Témoin</i> |
| ZAS (10 <sup>-3</sup> M)  | Mobilité par chimiotactisme (mm) | 1,48                       | 2,60          | 1,20             | 2,76          | 1,20                               | 2,72          |
|                           | Mobilité spontanée (mm)          | 0,72                       | 1,42          | 0,50             | 1,51          | 0,58                               | 1,37          |
| fMLP (10 <sup>-7</sup> M) | Mobilité par chimiotactisme (mm) | 1,24                       | 2,12          | 0,96             | 2,60          | 1,36                               | 3,52          |
|                           | Mobilité spontanée (mm)          | 0,67                       | 1,27          | 0,55             | 1,58          | 0,72                               | 1,10          |

|   |                  | Avant traitement par G-CSF |               |                  |               | Après 1 an de traitement par G-CSF |               |
|---|------------------|----------------------------|---------------|------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
|   |                  | Patient (15 ans)           | <i>Témoin</i> | Patient (18 ans) | <i>Témoin</i> | Patient (19 ans)                   | <i>Témoin</i> |
| Chimiluminescence (émission maximale en mVolt/s/10 <sup>6</sup> PNN)                    | zymosan opsonisé | 1,92                       | 7,11          | 2,74             | 5,18          | 1,68                               | 5,72          |
|   | PMA              | 0,06                       | 1,50          | 0,65             | 1,38          | 0,49                               | 0,71          |
| Génération d'ions superoxydes (nMol O <sub>2</sub> /10 <sup>6</sup> PNN pendant 30 min) |                  |                            |               | 30,4             | 54,00         | 14,20                              | 40,80         |

|                                | Avant traitement par G-CSF |               | Après 1 an de traitement par G-CSF |               |
|--------------------------------|----------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
|                                | Patient (18 ans)           | <i>Témoin</i> | Patient (19 ans)                   | <i>Témoin</i> |
| Taux de phagocytose (% de PNN) | 42,9                       | 84,5          | 95,7                               | 97,1          |

Tableau n°III-2-2 : Résultats de l'analyse des fonctions des PNN, chimiotactisme, phagocytose, métabolisme oxydatif, avant et après traitement par facteur de croissance, chez le patient atteint de glyco-génose Ib.



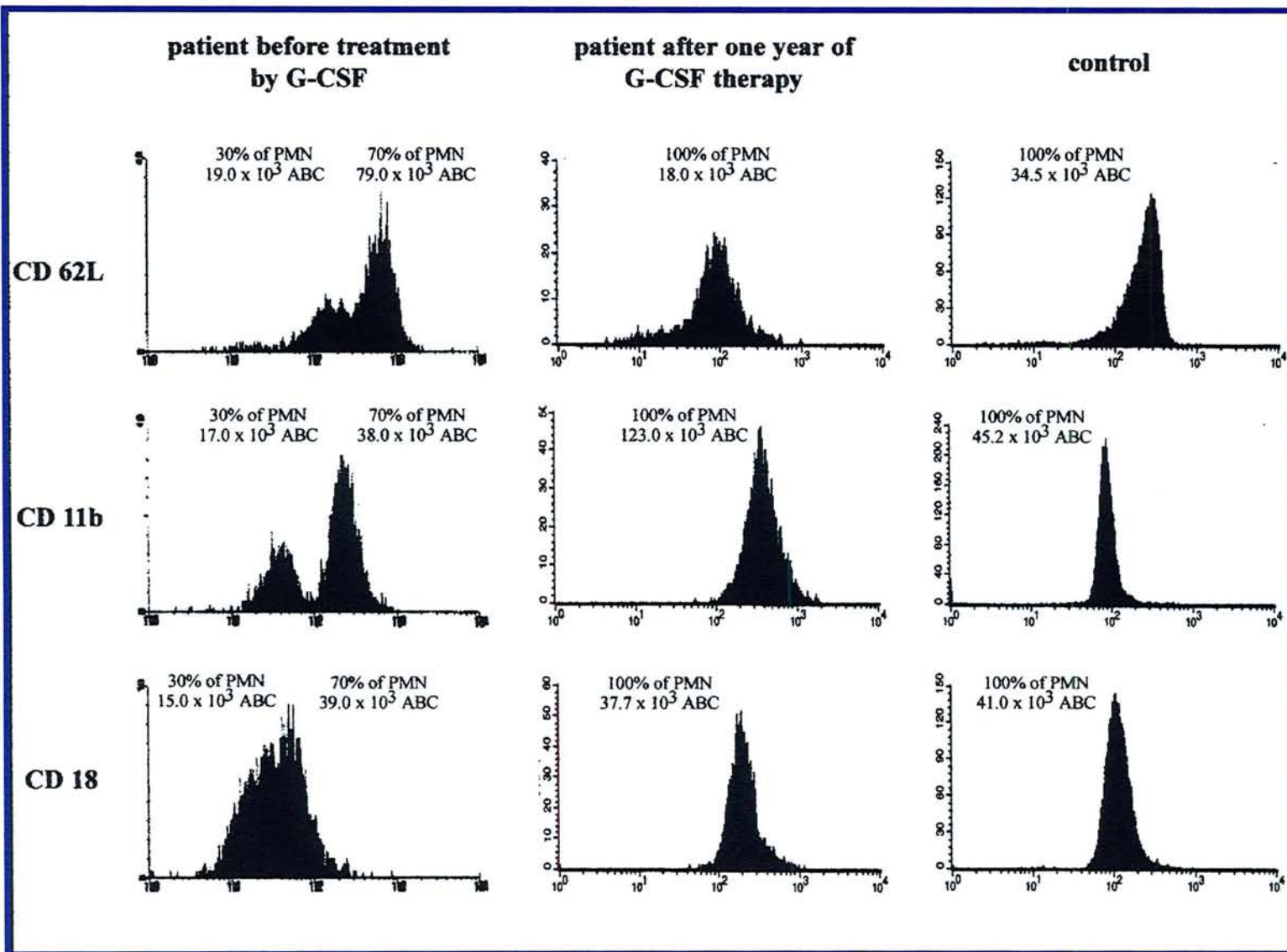


Figure n°III-2-8 : Histogrammes de fluorescence de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des PMN, chez le patient atteint de glycogénose Ib, avant et après un an de traitement par facteur de croissance, par rapport à un témoin sain.

|       | Patient                       |                       |                                       |                       | Témoins (n = 10) |                       |
|-------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
|       | Avant traitement<br>par G-CSF |                       | Après 1 an de traitement<br>par G-CSF |                       | % cellules       | x 10 <sup>3</sup> CLA |
|       | % cellules                    | x 10 <sup>3</sup> CLA | % cellules                            | x 10 <sup>3</sup> CLA |                  |                       |
| CD62L | 30%<br>70%                    | 19,0<br>79,0          | 100%                                  | 18,0                  | 100%             | 24-43                 |
| CD11b | 30%<br>70%                    | 17,0<br>38,0          | 100%                                  | 123,0                 | 100%             | 32-53                 |
| CD18  | 30%<br>70%                    | 15,0<br>39,0          | 100%                                  | 37,7                  | 100%             | 11-43                 |

Tableau n°III-2-3 : Valeurs quantitatives (en CLA : capacité de liaison de l'anticorps) de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN, chez le patient atteint de glycogénose Ib, avant et après un an de traitement par facteurs de croissance, par rapport à des témoins sains.

## IV- DISCUSSION

Notre observation a décrit le cas d'un patient atteint de glycogénose Ib, présentant une neutropénie associée à une altération des fonctions des PNN, anomalies du chimiotactisme, de la capacité oxydative et du pouvoir de phagocytose. Ces données sont en accord avec celles rapportées dans la littérature (Beaudet AL, 1980; Anderson D, 1981; Di Rocco M, 1984; Kowen N, 1986; Gitzelmann R, 1993; Piva E, 1996; Visser G, 2000) et expliquent la susceptibilité de ces patients à présenter des complications infectieuses.

Pour expliquer cette particularité du type Ib de la glycogénose, une anomalie du transport du G6P à travers la membrane microsomale a été suggérée au niveau du PNN, puisqu'elle a été trouvée au niveau des hépatocytes (Lange AJ, 1980; Bashan N, 1993; Verhoeven AJ, 1999). Une autre explication a été proposée par Anderson et al., qui ont montré par microscopie électronique, que les PNN de ces patients n'ont pas une morphologie bipolarisée normale puisqu'ils sont incapables, après stimulation par des facteurs chimiotactiques, de répondre en redistribuant leurs sites d'adhérence du pôle antérieur (lamélipode) au pôle postérieur (uropode).

Il a été montré, chez les patients atteints de glycogénose Ib, l'effet thérapeutique favorable de la greffe de foie qui permet de corriger l'anomalie métabolique (Matern D, 1999). Cependant, la greffe hépatique ne corrige pas la neutropénie ainsi que les complications infectieuses, excepté dans un cas récemment rapporté (Martinez-Olmos MA, 2001). De plus, les anomalies fonctionnelles des PNN ne sont également pas corrigées (Lachaux A, 1993) ce qui nécessite la poursuite de l'administration de facteurs de croissance (Donadiou J, 1994; Matern D, 1999; Schrotten H, 1991; Calderwood S, 2001).

En plus des anomalies des PNN habituellement rapportées dans la glycogénose Ib, notre patient présente une anomalie du phénotype d'expression des récepteurs d'adhérence avec un déficit partiel de l'expression à la fois de CD62L et de CD11b/CD18 (*figure n°III-2-8 et tableau n°III-2-3*). Ce résultat a été contrôlé à partir d'un deuxième prélèvement sanguin et ne résulte pas de problème technique puisqu'un témoin est analysé en parallèle. Ce profil phénotypique n'a jamais été observé pour des témoins sains. Une hétérogénéité fonctionnelle des PNN

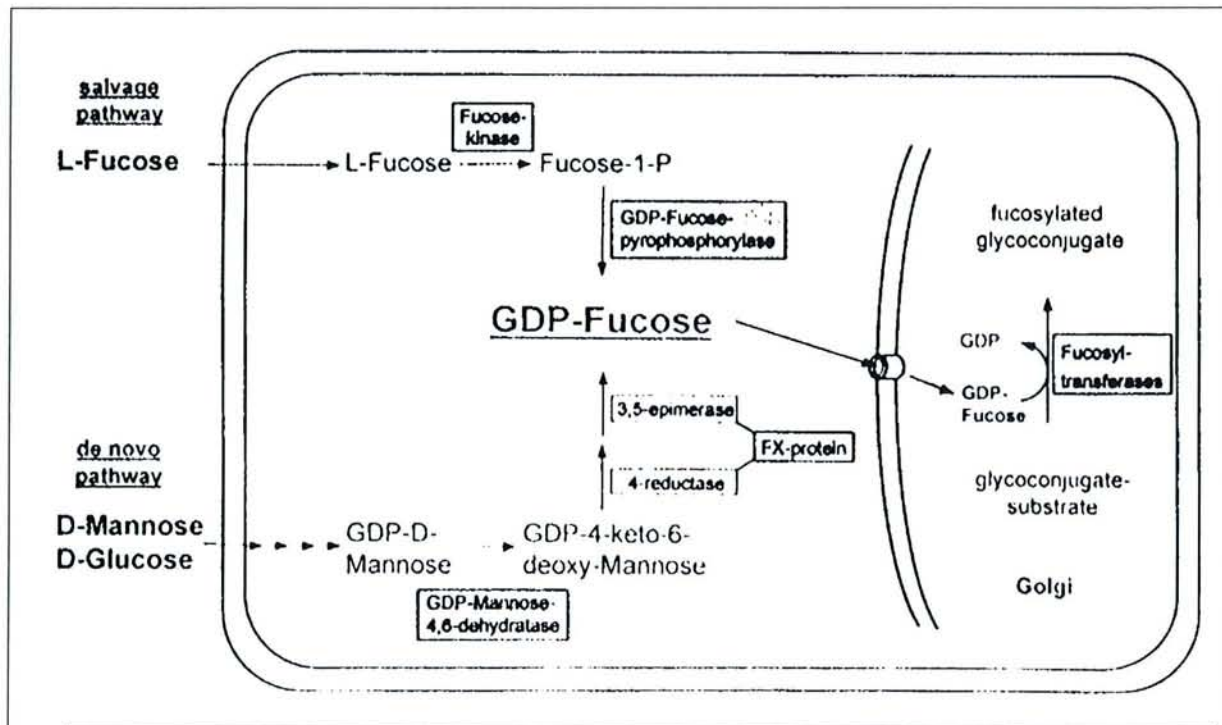
concernant la production d' $H_2O_2$  a été rapportée dans la glycogénose Ib (Schroten H, 1991), mais notre cas d'hétérogénéité phénotypique de l'expression des récepteurs d'adhérence est, à notre connaissance, le premier cas rapporté. Ces récepteurs d'adhérence jouant un rôle majeur dans la mobilité et l'adhésion des PNN à la barrière endothéliale (Carlos TM, 1994), ce déficit, même partiel, contribue probablement à la survenue des complications infectieuses présentées par notre patient.

Ce déficit d'expression ne peut être directement expliqué par la mutation sur le chromosome 11q23 trouvée chez cette famille (Annabi B, 1998; Veiga-da-Cunha M, 1998) puisque le gène de la chaîne  $\beta_2$  des intégrines est localisé sur le chromosome 21q22.3 (Etzioni A, 1999).

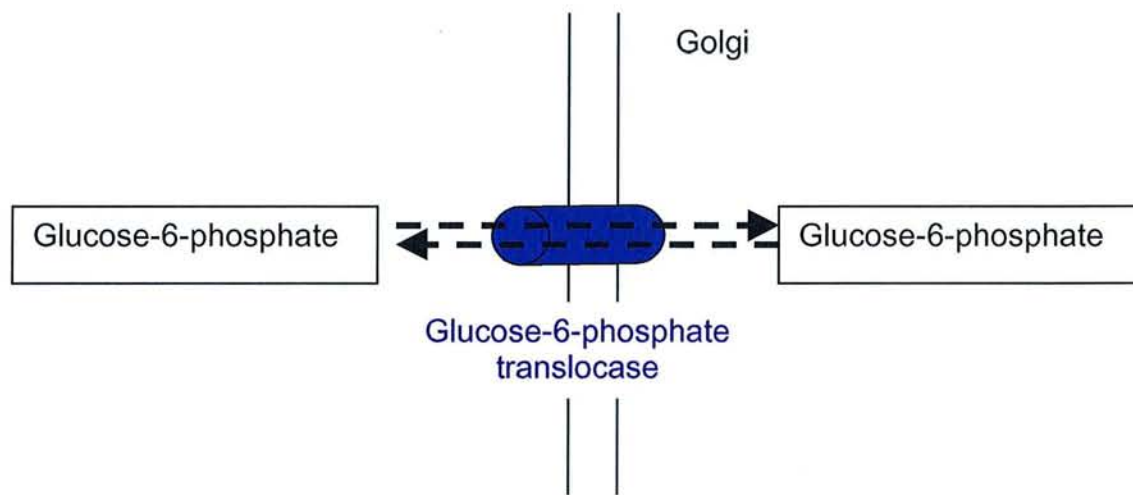
Nous proposons une nouvelle hypothèse en établissant un parallélisme avec une récente observation concernant le "LAD" syndrome de type II. Ce syndrome résulte, comme nous l'avons détaillé dans la première partie (*figures n°III-2-2 et III-2-9*), d'une hypofucosylation des produits glycoconjugués comme le sialyl-Lewis X ou la substance H et est la résultante d'une anomalie du transport du GDP-fucose dans le Golgi (Lübke T, 1999; Marquardt T, 1999). En établissant un parallélisme, la glycogénose-Ib est liée à une anomalie de transport microsomal du G6P. Nous supposons que cette translocase est physiologiquement présente dans la membrane leucocytaire afin d'assurer le transport des résidus de glucose depuis le cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique. En effet, la biosynthèse du dolichol pyrophosphoryl oligosaccharide des oligosaccharides N-liés nécessite la présence de trois résidus glucosés qui sont ajoutés au dolichol pyrophosphoryl oligosaccharide lorsque celui-ci est basculé à la face luminale du réticulum endoplasmique (Brockhausen I, 1993) (*figure n°III-2-10*). Or la L-sélectine et les  $\beta_2$  intégrines sont des oligosaccharides N-liés, dont la biosynthèse pourrait être altérée par une anomalie de la protéine de transport du G6P.

Il a été d'ailleurs décrit les GDGS, "carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes" un groupe hétérogène de pathologies héréditaires présentant une anomalie de glycosylation des glycoprotéines et regroupant (Hirschberg CB, 1998) :

- les glycogénoses Ia, Ib, II, III, IV, V et
- les "LAD" syndrome type II.



Pour le "LAD" syndrome type II, il a été décrit une anomalie du transporteur du GDP-fucose dans le Golgi (d'après Marquardt T, 1999b).



La glycogénose Ib est caractérisée par une anomalie de la glucose-6-phosphate translocase.

Figure n°III-2-9 : En faisant un parallélisme avec le "LAD" syndrome type II, la glycogénose-Ib est liée à une anomalie de transporteur microsomal du glucose-6-phosphate.



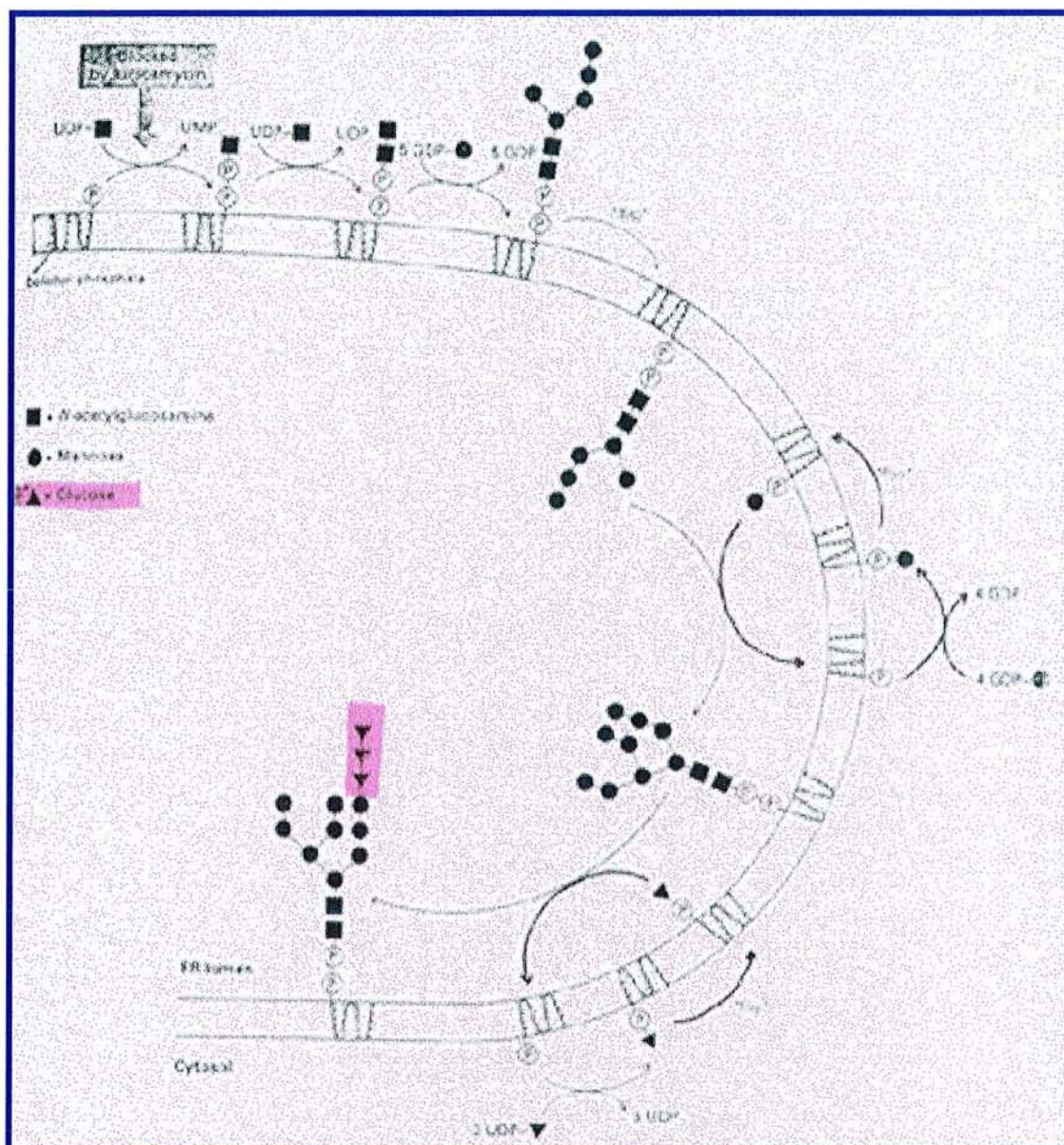


Figure III-2-10 : La biosynthèse du dolichol pyrophosphoryl oligosaccharide des oligosaccharides N-liés nécessite la présence de trois résidus glucosés qui sont ajoutés au dolichol pyrophosphoryl oligosaccharide lorsque celui-ci est basculé à la face luminale du réticulum endoplasmique. Ceci nécessite la présence d'un transporteur du glucose (d'après Brockhausen I, 1993).

Le traitement par facteur de croissance a entraîné une nette amélioration du statut infectieux du patient associé à une augmentation de la concentration en PNN (*figure n°III-2-5-B*) et une normalisation, *in vitro*, des tests de phagocytose et de l'expression des récepteurs d'adhérence (*tableau n°III-2-2 et figure n°III-2-8*), alors que le chimiotactisme et le métabolisme oxydatif sont restés altérés. La distribution bimodale de l'expression des récepteurs d'adhérence a disparu et les valeurs quantitatives sont similaires à celles trouvées pour les témoins. Si le rôle du G-CSF sur la neutropoïèse est bien établi et utilisé, son implication sur l'amélioration des fonctions leucocytaires est également cliniquement importante (Schroten H, 1991; Yong K, 1992; Höglund M, 1997; Leavey PJ, 1998; Spiekermann K, 1997). En effet, le G-CSF possède une action positive sur la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante, la propriété d'adhérence, la phagocytose et la mort des microorganismes, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Par contre, aucun effet n'a été noté sur le chimiotactisme. La réponse observée pour notre patient au traitement par facteur de croissance est cohérent avec les données de la littérature, excepté pour le métabolisme oxydatif. Il a été montré que le G-CSF augmentait l'expression de CD11b *in vitro* et *in vivo* (Yuo A, 1989; Höglund M, 1997; Spiekermann K, 1997). Des études cinétiques ont montré que cette augmentation survenait précocement avec un maximum observé 1 heure après administration de G-CSF (Kerst JM, 1993) et persistait 5 jours après (Höglund M, 1997). Les données sont, par contre, divergentes concernant l'effet du G-CSF sur l'expression de CD62-L. Certains rapportent une diminution de son expression (Ohsaka A, 1993; Yong K, 1991) alors que Griffin et al. (1990) ne montrent aucune variation. Cependant, une augmentation marquée de l'affinité de CD62L pour son ligand a été décrite (Spertini O, 1991).

La normalisation, après traitement par G-CSF, de l'expression des récepteurs d'adhérence et de la phagocytose associée à une augmentation du nombre de PNN contribue à la nette amélioration du statut infectieux de notre patient.

Ce déficit d'expression en récepteurs d'adhérence est le premier rapporté chez un patient atteint de glycogénose Ib. La quantification de ces récepteurs, par une méthode standardisée, chez d'autres patients atteints de glycogénose, permettrait de comprendre l'implication de ces récepteurs dans la genèse des infections observées dans ce contexte.

### **Chapitre III-3**

**APPROCHE FONCTIONNELLE DE LA FLUIDITÉ  
MEMBRANAIRE DES MONOCYTES CHEZ LES SUJETS  
PRESENTANT UNE CIRRHOSE ALCOOLIQUE :  
QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE,  
ETUDE DU CHIMIOTACTISME ET EXPOSITION DES  
PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES**



### Chapitre III-3

## **APPROCHE FONCTIONNELLE DE LA FLUIDITÉ MEMBRANAIRE DES MONOCYTES CHEZ LES SUJETS PRESENTANT UNE CIRRHOSE ALCOOLIQUE : QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE, ETUDE DU CHIMIOTACTISME ET EXPOSITION DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES**

### **I- INTRODUCTION- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

Ce travail résulte d'une collaboration entre Dr Marchand-Arvier M, professeur Vigneron C et moi même (service d'Hématologie Biologique) et le professeur JP. Bronowicki (service d'Hépatogastro-Entérologie) dont l'une des thématiques de travail est représentée par l'étude de la mauvaise réponse vaccinale au virus de l'hépatite B (VHB) des sujets atteints de cirrhose alcoolique. Un travail de thèse (H. Barraud, 2000) a montré une augmentation de la fluidité membranaire profonde des monocytes chez les sujets non-répondeurs. L'analyse de la fluidité membranaire des monocytes a été motivée par le fait que, d'une part le monocyte représente un acteur principal de la réponse immunitaire du fait de son rôle en tant que cellule présentatrice de l'antigène aux lymphocytes et d'autre part, que la fluidité membranaire influence directement le comportement des récepteurs par le biais de la composition lipidique. Cette modification de la fluidité pourrait donc être impliquée dans les altérations des phénomènes de reconnaissance cellulaires et transduction du message survenant dans la réponse immunitaire, ainsi que dans les anomalies fonctionnelles observées pour les cellules immunes.

Le but de notre travail a été d'étudier les monocytes de ces sujets par une approche plus fonctionnelle, en explorant ces cellules par des tests dont les variations impliquent des modifications de la fluidité membranaire. Notre choix s'est porté sur un test fonctionnel global, le chimiotactisme, et sur deux tests spécifiques, l'un impliquant des récepteurs membranaires d'activation cellulaire, soit l'expression des récepteurs d'adhérence, et l'autre impliquant l'organisation des lipides membranaires par la mesure de l'exposition des phospholipides anioniques.

Après un rappel bibliographique sur la mauvaise réponse vaccinale au VHB chez le sujet cirrhotique alcoolique et sur la fluidité membranaire, nous commenterons le choix de nos tests et présenterons notre étude.

## **I-1- SUSCEPTIBILITE DES PATIENTS ATTEINTS DE CIRRHOSE ALCOOLIQUE A PRESENTER DES INFECTIONS ET MAUVAISE REPONSE VACCINALE AU VIRUS DE L'HEPATITE B (VHB)**

Les infections bactériennes sont des complications fréquentes et graves rencontrées chez les patients cirrhotiques. Leur incidence est d'ailleurs plus importante chez ces patients par rapport aux patients présentant une cirrhose liée à une autre étiologie (Rosa H, 2000). Trente à 50% d'entre eux présentent une infection bactérienne à l'admission ou développent un sepsis durant l'hospitalisation (Iber FL, 1999 ; Navasa M, 1999). Parmi ces infections, beaucoup sont nosocomiales (15 à 35%), ce qui contraste avec la fréquence des infections acquises durant une hospitalisation pour la population générale (5 à 7%). Les complications les plus souvent observées sont les infections spontanées du liquide d'ascite, des voies respiratoires et urinaires. Ces complications peuvent menacer à court terme le pronostic vital. Le taux de survie après un épisode de péritonite bactérienne spontanée est en effet respectivement à un et deux ans de 30 à 50% et de 25 à 30% (Rimola A, 2000).

L'équipe du Pr JP. Bronowicki (Service d'Hépatogastro-Entérologie, CHU Nancy) s'est particulièrement intéressée à la réponse médiocre à la vaccination contre l'hépatite B chez le cirrhotique. Le taux de réponse à la vaccination contre le VHB est en moyenne compris entre 18 et 50% en cas de cirrhose alcoolique, 44 à 54% en cas de cirrhose non-alcoolique, et de 43 à 82% chez des patients alcooliques ayant une hépatopathie minime (Degos F, 1986 ; Bronowicki JP, 1997). Les facteurs démontrés impliqués dans la non-réponse anti-HBs sont l'appartenance à la classe B de Child-Pugh, l'âge supérieur à 50 ans, l'existence d'une leucopénie, un nombre absolu et un pourcentage de lymphocytes CD8 faibles. Bronowicki et al. (1997) ont montré que la présence de l'antigène HLA DR7 et l'absence de l'antigène HLA DR1 étaient liés avec la non-réponse anti-HBs.

Ces anomalies de réponse sont liées à l'immunodépression induite par la maladie hépatique, la toxicité de l'alcool et les carences nutritionnelles.

## **I-2- PERTURBATIONS DU SYSTEME IMMUNITAIRE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CIRRHOSE ALCOOLIQUE**

### **I-2-A- IMMUNITE HUMORALE : HYPERGAMMAGLOBULINEMIE**

L'élévation de la concentration sérique des IgA, mais aussi des IgG et de façon moindre des IgM est communément observée au cours de la cirrhose éthylique (Fischer D, 1980). Cette hypersécrétion par les lymphocytes B peut être spécifique (dirigés spécifiquement contre les antigènes d'origine digestive et les lipopolysaccharides, LPS) ou aspécifiques (sécrétion accrue de l'ensemble des immunoglobulines).

Elle semble être secondaire à une altération des mécanismes régulateurs, eux-mêmes corrélés au degré d'insuffisance hépato-cellulaire. Les lymphocytes B de patients atteints de cirrhose éthylique secrètent spontanément des quantités importantes d'anticorps quand ils sont mis en culture et cette sécrétion augmente lors de la stimulation par les LPS. Or le taux sérique de LPS est augmenté chez le cirrhotique éthylique, suite à une altération des fonctions kuppfériennes, à un déficit d'absorption des complexes immuns des antigènes bactériens et viraux, mais aussi du fait d'une plus grande perméabilité de la muqueuse digestive (Parlesak A, 2000).

### **I-2-B- IMMUNITE CELLULAIRE LYMPHOÏDE**

Les perturbations de l'immunité cellulaire incluent une diminution de la réponse aux tests d'hypersensibilité retardée avec une anergie cutanée au test tuberculinique. Les lymphocytes totaux circulants sont moins nombreux et sont altérés dans leurs fonctions.

Les lymphocytes B semblent peu affectés, avec un nombre proche des valeurs moyennes physiologiques et une majoration de leur fonction, en partie liée à la diminution de l'activité des cellules T suppressives (Roselle G, 1995).

Les changements sont plus marqués pour les lymphocytes T, avec une diminution des cellules T "helper" (CD4) et supresseur (CD8). La prolifération de lymphocytes T de patients cirrhotiques est nettement diminuée par rapport à celle de sujets témoins lors des tests de prolifération lymphocytaires en présence de divers

mitogènes (Phytohemagglutinine A (PHA), concanavaline) (Giron-Gonzales JA, 1994). Ces altérations ne sont pas expliquées par un défaut de synthèse de l'IL-2 ou par une anomalie du récepteur à l'IL-2 (CD25). Elles pourraient être liées à un défaut, lié à l'alcool, dans les mécanismes de transduction membranaire, faisant intervenir une diminution du calcium et l'altération de la synthèse d'IP3. Il est également montré, pour un faible effectif, qu'après six mois d'abstinence, la réponse mitogénique des lymphocytes T revient aux valeurs physiologiques, témoignant de la réversibilité des altérations observées après arrêt de l'alcool (Spinozzi F, 1993).

Les autres anomalies lymphocytaires observées sont une expression augmentée des récepteurs d'adhérence (CD11a/CD18 ; CD11b/CD18) et des molécules d'histocompatibilité à la surface des lymphocytes T (CMH II). Ces variations seraient expliquées par un phénomène d'hyperactivation des lymphocytes T (Santos-Perez JL, 1996).

### **I-2-C- PERTURBATIONS DES CELLULES MONOCYTAIRES ET DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES**

La plupart des patients atteints de cirrhose alcoolique présentent une neutropénie, liée à l'hypersplénisme, ce qui contribue à l'immunodépression. Par ailleurs, il a été décrit une anomalie fonctionnelle des PNN impliquant une diminution de leur chimiotactisme, de leur capacité de phagocytose et de leur potentiel oxydatif (Feliu E, 1977; Laharrague P, 1985; Rajkovic IA, 1986).

Le monocyte représente un acteur important de la réponse immunitaire du fait de son pouvoir de phagocytose, de son rôle en tant que cellule présentatrice de l'antigène et de sa capacité à sécréter des cytokines immunomodulatrices (IL-10, IL-12).

Le monocyte est ainsi impliqué dans la réponse vaccinale : il capte, incorpore les molécules d'antigènes et en diminue la complexité par digestion enzymatique. Il intervient de façon déterminante en présentant l'antigène aux lymphocytes et en sécrétant divers facteurs d'activation des cellules lymphoïdes.

#### **- Perturbations des cytokines**

+ Chez les cirrhotiques alcooliques, il a été montré une synthèse accrue de cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8) et de TNF $\alpha$  par les monocytes, en

réponse à une stimulation par les LPS (Cook RT, 1998; Hong F, 2002; McClain CJ, 2002). La sécrétion excessive de  $TNF\alpha$  contribue à la destruction cellulaire du fait de son effet toxique direct et de son rôle favorisant l'engagement vers l'apoptose. Les patients avec hépatite alcoolique aiguë ont d'ailleurs des concentrations en  $TNF\alpha$  élevées, qui entraînent la génération par les mitochondries hépatocytaires d'anions superoxydes toxiques pour les cellules. Il a été d'ailleurs montré récemment qu'un traitement par l'infliximab, un anti- $TNF\alpha$ , diminuait le nombre de décès des patients atteints d'hépatite alcoolique aiguë ; une diminution des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8 et  $INF\gamma$ ) a été notée (Jalan R, 2001).

+ La synthèse par les monocytes d'IL-10, qui possède une action anti-inflammatoire, est inférieure à celle observée pour des sujets sains, ce qui explique l'absence d'inhibition de la sécrétion des autres cytokines pro-inflammatoires comme le  $TNF\alpha$  (Le Moine O, 1995).

- ***Perturbations des fonctions du monocyte***

Les monocytes des patients atteints de cirrhose éthylique sont altérés dans leur capacité de chimiotactisme, de phagocytose et de synthèse d'enzymes lysosomiaux tels que la bêta-glucuronidase ou la N-acétyl bêta-glucosaminidase (Holdstock G, 1982).

- ***Perturbation de son rôle de cellule présentatrice de l'antigène***

Il a été montré que l'exposition *in vitro* de monocytes provenant de sujets sains à des concentrations variables d'alcool diminuait leur capacité à présenter l'antigène aux cellules T (Szabo G, 1993). Cette réduction était attribuée à un effet de la réduction alcool-dépendante de l'IL-1 $\beta$  et de l'augmentation du TGF $\beta$ . Ensuite, il a été démontré que l'absorption d'alcool chez l'animal (souris) altérait la présentation antigénique *in vitro* (Mikszta JA, 1995). Si l'exposition à l'alcool survenait après la présentation antigénique et l'étape de reconnaissance antigène-monocyte, l'efficacité de la réponse immunitaire ne semblait pas altérée (Waltenbaugh C, 1997). Ainsi, la réduction de l'immunité à médiation cellulaire apparaît être le résultat de la perte d'une étape précoce et critique dans la présentation antigénique, liée à une modification de la fonction des monocytes et/ou à une altération dans les interactions monocytes/lymphocytes T (Szabo G, 1998).

### - **Anomalie d'expression des récepteurs membranaires**

Il a été montré une augmentation de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des monocytes et lymphocytes périphériques de patients avec cirrhose alcoolique, cette anomalie étant corrélée avec d'autres marqueurs inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 soluble) et avec la gravité de la maladie (score de Child-Pugh) (Luna-Casodo L, 1997). Ces données sont en faveur de la présence d'un phénomène inflammatoire au cours de la cirrhose alcoolique contribuant aux altérations hépatiques.

Les monocytes/macrophages sont capables de lyser les cellules cibles recouvertes d'anticorps grâce à leur récepteur spécifique Fc $\gamma$  (Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity, ADCC). Gomez et al. (1994) ont montré qu'une altération de l'activité ADCC des macrophages, mesurée par la détermination de la clairance de leur récepteur Fc $\gamma$ , était corrélée au degré d'insuffisance hépatique. Cette anomalie du récepteur Fc $\gamma$  contribue à expliquer l'incidence élevée des infections bactériennes chez les patients cirrhotiques.

## **I-3- ALTERATION DE LA FLUIDITE DES MEMBRANES MONOCYTAIRES CHEZ LES CIRRHOTIQUES ALCOOLIQUES**

L'existence, chez les cirrhotiques alcooliques, d'une présentation inadéquate de l'antigène HBs par les monocytes, responsable d'une altération de leur interaction avec les lymphocytes T, d'une anomalie d'expression de récepteurs membranaires et d'une diminution du chimiotactisme, nous a orienté vers l'hypothèse d'une anomalie de la fluidité membranaire des membranes monocytaires (Thèse de Barraud H, 2000).

### **I-3-A- LA FLUIDITE MEMBRANAIRE : GENERALITES ET DEFINITION**

**La structure fondamentale de la membrane est la bicouche phospholipidique.** Les protéines noyées dans cette bicouche lipidique remplissent les fonctions particulières comme le transport sélectif de molécules et la reconnaissance intercellulaire (Alberts B, 1999 ; Cooper GM, 1999). C'est le modèle de la mosaïque fluide de J. Singer et G. Nicolson proposé en 1972. La membrane

plasmique des cellules animales contient quatre principaux types de phospholipides (la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline) qui comptent pour au moins la moitié des lipides (*figure n°III-3-1*). Ces phospholipides sont répartis de façon asymétrique dans les deux moitiés de la bicouche membranaire : le feuillet externe de la membrane plasmique contient surtout la phosphatidylcholine et la sphingomyéline alors que la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine sont les phospholipides prédominants du feuillet interne. La membrane plasmique contient également du cholestérol (même nombre de moles que les phospholipides) et des glycolipides (2% des lipides).

***La double couche lipidique est un fluide bidimensionnel.*** L'environnement aqueux à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule empêche les lipides membranaires de quitter la double couche lipidique, mais rien n'empêche ces molécules de se déplacer et d'échanger entre elles leur place dans le plan de la double couche. Cette propriété s'appelle la fluidité, c'est-à-dire la facilité avec laquelle les molécules lipidiques se déplacent dans le plan de la double couche lipidique. Il a été montré que (*figure n°III-3-2*) :

+ les molécules de phospholipides basculent très rarement d'une monocouche à l'autre. C'est le mouvement de « flip-flop »,

+ du fait des mouvements thermiques, les molécules lipidiques à l'intérieur d'une monocouche tournent très rapidement sur leur grand axe : mouvement de rotation,

+ elles échangent aussi en permanence leur place avec leurs voisines. C'est la diffusion latérale.



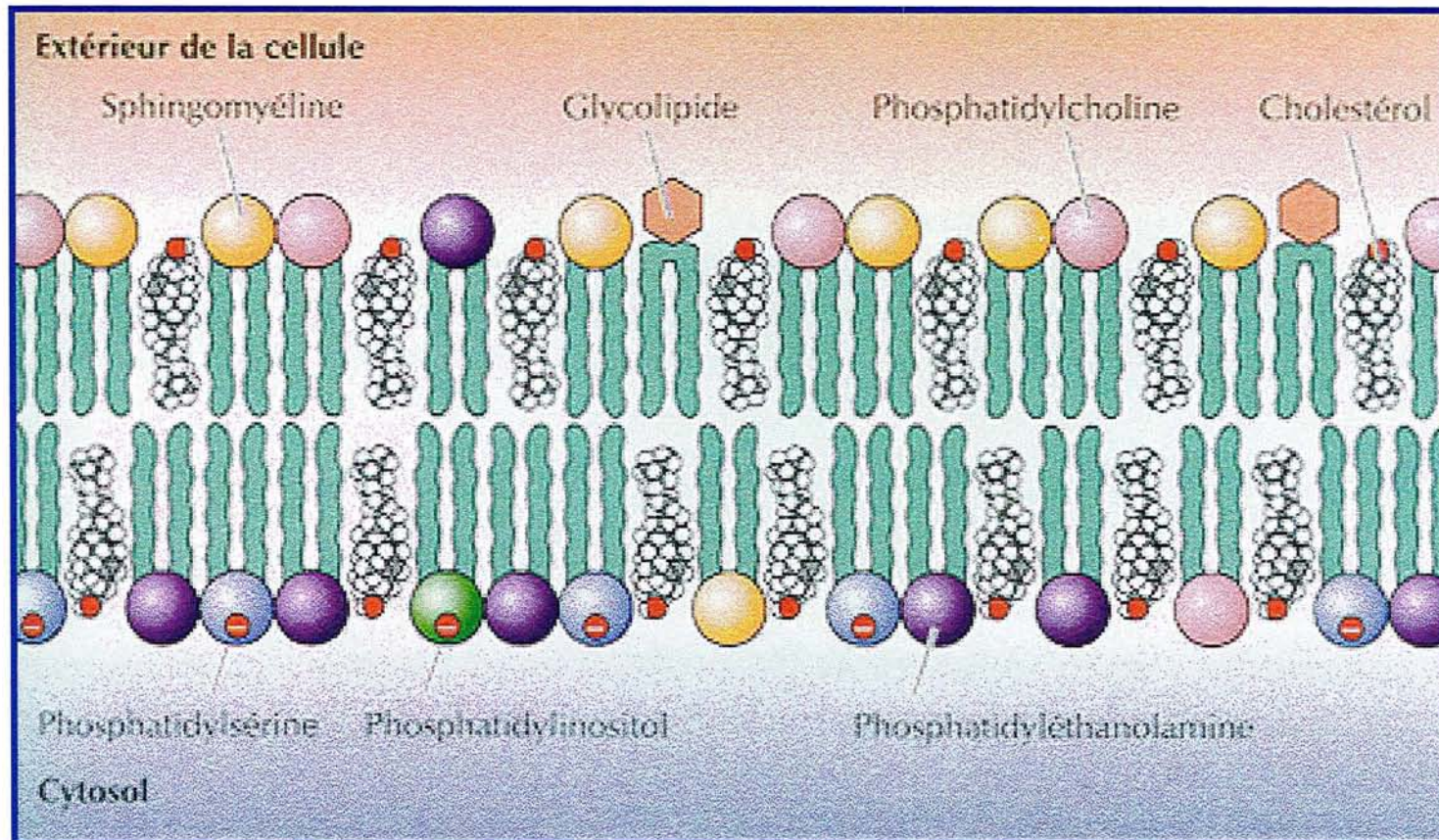


Figure n°III-3-1 : Composants lipidiques de la membrane plasmique. Le feuillet externe comporte surtout de la phosphatidylcholine, de la sphingomyéline tandis que le feuillet interne contient de la phosphatidyléthanolamine, de la phosphatidylsérine (d'après Cooper GM, La cellule, une approche moléculaire. Ed 1999, DeBoeck Université).



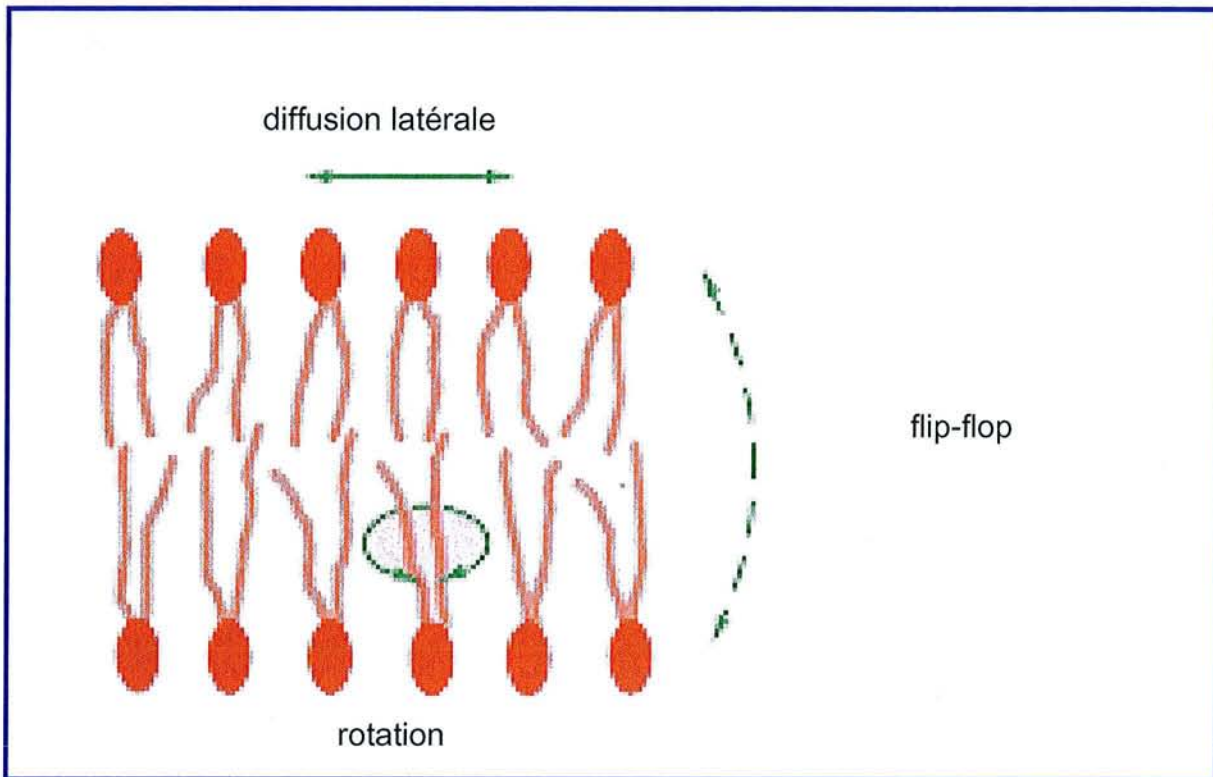


Figure n°III-3-2 : Les trois types de mouvement possibles pour les molécules phospholipidiques dans une double couche lipidique (d'après Alberts B. L'essentiel de la biologie cellulaire. Ed 1999, Flammarion).

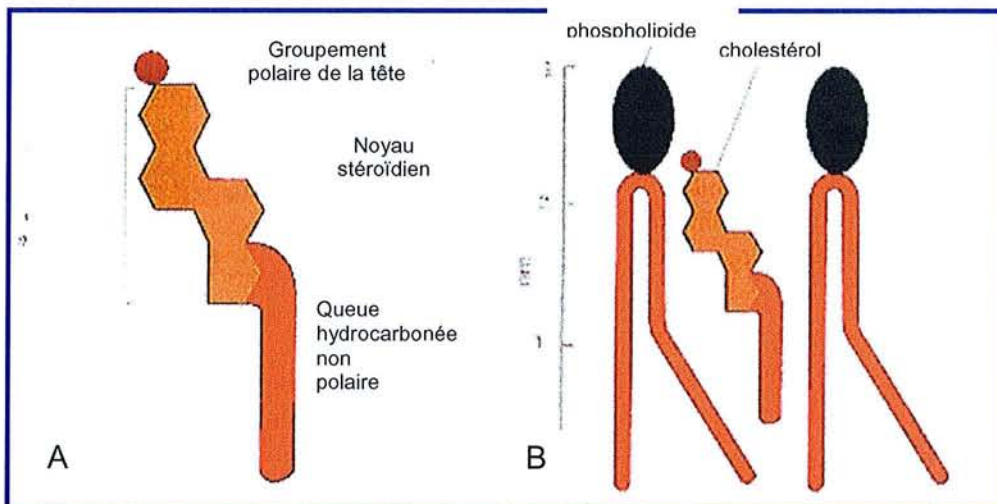


Figure n°III-3-3: Le rôle du cholestérol dans les membranes cellulaires. [A] montre la structure du cholestérol. [B] montre l'adaptation des molécules phospholipidiques au sein de la double couche lipidique (d'après Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. L'essentiel de la biologie cellulaire. Ed 1999, Flammarion).

***La fluidité membranaire est déterminée par la composition de la membrane.***

Le cholestérol est incapable à lui seul de former une membrane, mais il va s'insérer dans la bicouche entre les phospholipides par leurs coudes de leur queue hydrocarbonée insaturée (*Figure n°III-3-3*). Le cholestérol joue un rôle clé, puisqu'il réduit la fluidité membranaire en ordonnant les phospholipides, en réduisant la distance intermoléculaire les séparant, et en limitant la flexibilité de leur chaîne acyle. Ainsi, le rapport cholestérol/phospholipides représente un facteur déterminant : il a été montré par des techniques physico-chimiques variées qu'une augmentation du taux de cholestérol/phospholipides diminuait la fluidité des membranes biologiques et artificielles.

La composition des phospholipides (le rapport lécithine/sphingomyéline), la longueur et le degré d'insaturation des chaînes phospholipidiques des acides gras affectent la fluidité.

Les interactions lipide-protéine à travers la membrane biologique peuvent aussi modifier la fluidité membranaire.

### **I-3-B- FACTEURS INFLUENÇANT LA FLUIDITE MEMBRANAIRE**

Les variations des paramètres caractérisant la fluidité en fonction des types membranaires et des conditions physiologiques ont permis la mise en évidence d'une adaptation du métabolisme cellulaire, donc de la composition membranaire tendant à maintenir constante la fluidité locale des membranes. En effet, dans les conditions physiologiques, une membrane donnée possède une fluidité bien définie ; toute perturbation qui tendrait à modifier cette fluidité est compensée par une modification de la composition lipidique qui s'y oppose. C'est le phénomène d'adaptation homéovisqueuse.

#### **I-3-B-①- L'adaptation membranaire à la présence d'alcool**

Il a été démontré, par des expérimentations chez les rats, que la prise d'alcool induit initialement une solubilisation de l'alcool dans les membranes avec comme conséquence une augmentation de la fluidité (La Droitte P, 1984). Puis lors de l'absorption chronique, la présence continue d'alcool dans les membranes modifie le métabolisme cellulaire, et par contrecoup, la composition lipidique membranaire avec une moins bonne dissolution de l'alcool dans les membranes et par conséquent une fluidification moindre. Ainsi l'administration chronique d'alcool entraîne une certaine adaptation, caractérisée par la restauration partielle de la fluidité. Cette adaptation passe par une modification du comportement des lipides, liée à sa moins bonne dissolution dans les membranes. Si l'on interrompt la prise d'alcool (sevrage), le métabolisme, puis la composition lipidique reprennent leur état basal. Une nouvelle prise d'alcool induira une nouvelle fluidification membranaire. Des phénomènes comparables ont été observés chez l'homme, en étudiant la fluidité membranaire érythrocytaire de sujets alcooliques chroniques (Beauge F, 1991).

### **I-3-B-②- Rôle de la maladie hépatique dans les variations de la fluidité membranaire chez l'alcoolique**

Benedetti et al. (1987) ont comparé des membranes érythrocytaires d'alcooliques chroniques avec dysfonction hépatique minime par rapport à des sujets sains et ont observé une diminution de la fluidité, une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides et du ratio acides gras saturés/ insaturés.

Gilsanz et al. (1992) ont montré que les variations de fluidité de base des membranes érythrocytaires dues à l'ingestion chronique d'alcool sont observées uniquement en présence d'une maladie hépatique. Aucune variation significative de la fluidité membranaire des érythrocytes de patients éthyliques chroniques sans maladie hépatique n'est, en effet, observée. La fluidité membranaire diminue avec la progression de la maladie hépatique.

Owen et al. (1982) ont observé une diminution de la fluidité membranaire associée à une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides chez des patients présentant une pathologie hépatique variée et grave (ictère obstructif intra et extra-hépatique, cirrhose alcoolique, hépatite alcoolique, hépatite médicamenteuse, hépatopathie virale). Cette observation montre que la maladie hépatique influence elle-même la fluidité des membranes biologiques.

Les modifications de la fluidité membranaire observées chez les patients atteints de cirrhose éthylique sont probablement en rapport avec les perturbations du métabolisme des lipides, des lipoprotéines plasmatiques et la diminution de la LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase) dont la synthèse et la libération sont diminuées du fait de l'atteinte hépatique.

Les variations de la composition de la membrane lipidique peuvent affecter la structure et donc les propriétés des érythrocytes ; leur configuration et leur déformabilité sont anormales. Shiraishi et al. (1993) ont montré une corrélation étroite entre la déformabilité des hématies, leur fluidité membranaire, leur volume globulaire moyen et les anomalies de la composition lipidique des membranes. Ces anomalies pourraient être en partie responsables de la diminution du flux sanguin sinusoidal dans la maladie hépatique contribuant ainsi aux perturbations des fonctions métaboliques hépatiques.

### **I-3-B-③- Influence de la fluidité des membranes monocytaires sur la réponse à la vaccination contre l'hépatite B chez les cirrhotiques alcooliques.**

Ce travail a été réalisé par H. Barrault durant sa thèse d'exercice (2000) sous la direction du Pr Bronowicki (service d'Hépatogastro-Entérologie). Il s'est donné comme objectif d'étudier la fluidité des membranes des érythrocytes et des monocytes provenant de patients atteints de cirrhose alcoolique et présentant une mauvaise réponse à la vaccination contre l'hépatite B. L'hypothèse reposait sur le fait que la fluidité des membranes cellulaires influence l'accessibilité des récepteurs membranaires et la liaison à leur ligand. Un défaut dans la présentation de l'antigène HBs, liée à une anomalie de la conformation et de la fonction des récepteurs monocytaires, par le biais de la perturbation de la fluidité membranaire, pourrait contribuer à l'altération de la réponse vaccinale.

L'étude de 43 patients atteints de cirrhose ayant répondu à la vaccination à l'antigène HBs pour 37% a montré que :

+ La fluidité membranaire des monocytes n'était pas statistiquement corrélée à celle des érythrocytes.

+ Les paramètres nutritionnels tels que l'albumine, la préalbumine, la transferrine, le cholestérol, les triglycérides, les vitamines A, C, E, le cuivre, le sélénium et le zinc n'avaient aucune influence statistiquement significative sur la fluidité membranaire des monocytes.

+ La gravité de la maladie cirrhotique appréciée par le score de Child n'est pas corrélée à la fluidité membranaire des monocytes.

+ ***La réponse vaccinale est significativement corrélée à la fluidité profonde membranaire des monocytes. En effet, cette dernière est augmentée chez les non-répondeurs à la vaccination.*** En revanche, aucune influence n'est montrée pour le paramètre fluidité membranaire superficielle.

+ Par contre, la réponse à la vaccination contre le virus de l'hépatite B n'est statistiquement pas liée à la fluidité membranaire des érythrocytes, ce qui paraît logique puisque ces cellules ne sont pas impliquées dans la réponse vaccinale.

***Ces résultats montrent que seul le paramètre fluidité profonde est corrélé à l'absence de réponse à l'antigène HBs.***

**Or il a été montré que la fluidité membranaire influence la translation** (Klausner RD, 1980), **la conformation** (Diamond MS, 1994 ; Kakimoto H, 1995), **l'accessibilité** (Gimpl G, 1997 ; Bastiaanse EM, 1997) **et l'affinité de liaison** (Heron D, 1980 ; Dave JR, 1986 ; Peterson SW, 1992) **des récepteurs par le biais de la variation de la composition lipidique** (Gimpl G, 1997). Ainsi lorsque l'augmentation du ratio cholestérol/phospholipides entraîne une diminution de la fluidité, les récepteurs sont exposés à l'environnement aqueux. A l'inverse, lorsque ce ratio diminue, la fluidité membranaire augmente et les protéines s'enfoncent au sein de la bicouche lipidique, expliquant leur moindre accessibilité (Shinitzky M, 1984). Cet effet de la fluidité membranaire sur la disponibilité des récepteurs pourrait être impliqué dans les anomalies de certaines fonctions spécifiques des membranes cellulaires telles que la reconnaissance intercellulaire et les phénomènes de transduction membranaire (Hoek JB, 1990) aboutissant à l'activation et à la prolifération cellulaire.

Ainsi la fluidité membranaire conditionne les fonctions spécifiques des récepteurs protéiques :

- la reconnaissance récepteur-ligand, fonction de l'accessibilité et de l'affinité de liaison,
- la transduction du message, soit par activation d'une enzyme effectrice, soit par regroupement polaire (phénomène de "clusterisation") des complexes ligand-récepteur et induction secondaire d'une cascade de réactions intracellulaires.

Une fluidité optimale doit exister pour assurer au mieux ces fonctions puisque ces deux étapes sont inversement corrélées à la viscosité membranaire : l'accessibilité des récepteurs augmente si la fluidité diminue et l'activation de l'enzyme effectrice ou la translation des récepteurs augmentent si la fluidité membranaire s'accroît (Shinitzky M, 1984).

Dans ces conditions, l'imprégnation alcoolique chronique agit directement sur les fonctions des récepteurs membranaires (Heron D, 1982). En effet, il a été montré, que l'alcool augmentait la fluidité membranaire et par conséquent entraînait une diminution de l'accessibilité des récepteurs. Puis le phénomène d'adaptation membranaire à la présence chronique d'alcool entraîne une rigidification de la membrane par augmentation du cholestérol, rendant les récepteurs disponibles. Lors du sevrage, se produit un état hyper-rigide. L'accessibilité aux récepteurs, tous

disponibles, peut expliquer le syndrome d'abstinence. La réversibilité des variations de la fluidité membranaire nécessite au moins cinq à six semaines d'abstinence.

Ces données sont en faveur d'une altération de la présentation de la fonction des récepteurs par les monocytes de patients cirrhotiques alcooliques. L'altération de la réponse vaccinale à l'antigène HBs chez ces patients pourrait être en rapport avec une mauvaise présentation des récepteurs membranaires monocytaires, expliquant alors un défaut d'internalisation de l'Ag HBs, une mauvaise interaction des monocytes avec les lymphocytes T, et par conséquent, un état de non-réponse au vaccin. Il en est de même pour expliquer la susceptibilité de ces patients à présenter des complications infectieuses.

La phagocytose, une autre fonctionnalité des cellules mononucléées impliquée dans la défense anti-infectieuse, a également été attribuée à des variations de fluidité membranaire. Une diminution de la fluidité membranaire *in vitro*, par augmentation du ratio cholestérol/phospholipides dans la membrane de cellules mononucléées, s'associait avec une altération de la propriété de phagocytose (Esfahani M, 1986). A l'inverse, l'apport d'acides gras insaturés majorait la phagocytose (Calder PC, 1990).

Les modifications de la concentration en cholestérol affectent également l'expression et le groupement des molécules HLA de classe I à la surface des lymphoblastes humains : l'enrichissement de la membrane plasmique en cholestérol rigidifie la bicouche lipidique, diminue l'expression des épitopes du CMH I et augmente leur degré d'association (Bodnar A, 1996). Cette modulation apparaît essentielle dans le contrôle de l'efficacité de la présentation antigénique (interaction du CMH I et des récepteurs des cellules T effectrices) et la lyse cellulaire conséquente par les cellules T et les cellules NK.

L'augmentation de la fluidité membranaire profonde trouvée chez les patients cirrhotiques non répondeurs à la vaccination à l'HBs est liée à la modification de la composition lipidique des membranes monocytaires, dont l'origine est probablement multifactorielle. L'effet fluidifiant de l'alcool et la maladie hépatique par le biais de multiples carences nutritionnelles et des perturbations lipidiques induites (diminution de la synthèse et de la biodisponibilité de la LCTA, perturbations des lipoprotéines et

du métabolisme des acides gras, hypercholestérolémie) influencent très certainement la composition des lipides membranaires. Dans ces conditions, des mesures diététiques s'avéreraient utiles dans la modulation de la fluidité afin de restaurer les fonctions immunes. D'ailleurs, des premiers travaux sont orientés dans ce sens. Il a été montré que l'augmentation de la fluidité membranaire de cellules épithéliales Hep-2 humaines *in vitro* inhibe l'adhésion des *Escherichia Coli* entropathogènes, empêchant ainsi le développement d'une infection (Ismaili A, 1999). Le contrôle des acides gras alimentaires semble d'ores et déjà une perspective de recherche intéressante pour moduler les fonctions immunitaires cellulaires liées à la fluidité membranaire.



## II- MATERIELS ET METHODES

### II-1- BUT DU TRAVAIL : CHOIX DES TESTS UTILISÉS

Après avoir montré une altération du paramètre fluidité membranaire des monocytes chez les patients atteints de cirrhose alcoolique, le but de cette étude était d'explorer *in vitro* les fonctions des cellules monocytaires impliquées dans la mauvaise réponse infectieuse, au moyen de tests dont le principe implique des variations de la fluidité membranaire. Notre choix s'est porté sur l'analyse :

- du chimiotactisme des monocytes,
- de l'expression des récepteurs d'adhérence de type sélectine CD62L et intégrine CD11b/CD18,
- de l'étude de l'asymétrie lipidique membranaire par mesure de l'exposition des phospholipides anioniques.

Nous allons commenter les raisons de ce choix des divers tests.

#### II-1-A- FLUIDITE MEMBRANAIRE ET CHIMIOTACTISME DES MONOCYTES

Les variations de chimiotactisme attribuées à des fluctuations de fluidité membranaire ont été démontrées, en premier lieu, chez le nouveau-né (Yasui K, 1988). Dans cette population, la diminution du chimiotactisme des PNN est expliquée par une diminution de la fluidité membranaire de 23% par rapport à la population adulte (Wolach B, 1992). Cette différence pourrait être le fait d'une diminution du ratio cholestérol/phospholipides de 10% par rapport à l'adulte. De plus, il a été observé durant l'enfance une amélioration du chimiotactisme des PNN corrélée à la variation de la fluidité membranaire des PNN (Yasui K, 1990). Ces données ont ensuite suscité des expériences de modulation de la fluidité membranaire par un agent rigidifiant (cholesteryl hémissuccinate) dont l'incorporation, dans la membrane de PNN de nouveau-nés, a entraîné une diminution attendue de la fluidité membranaire associée à une augmentation du chimiotactisme (Wolach B, 1992).

Une autre démonstration de la relation entre chimiotactisme et fluidité membranaire a été apportée par l'étude de la capacité métastatique de lignées

cellulaires chez la souris (Taraboletti G, 1989). En effet, une corrélation entre ces deux paramètres a été montrée pouvant expliquer le rôle joué par la fluidité des membranes cellulaires dans la survenue de cancers métastatiques.

L'implication pathologique de ces variations de fluidité de la membrane leucocytaire concerne en particulier la maladie vasculaire ischémique où le rôle du leucocyte sanguin dans la genèse des plaques athéromateuses est de plus en plus démontré. Une étude récente, portant sur des sujets ayant présenté un accident vasculaire cérébral, a montré une diminution de la fluidité membranaire des PNN après stimulation par des facteurs chimiotactiques (fMLP ou PMA) par rapport à des sujets témoins (Caimi G, 2000).

Ces variations du chimiotactisme en fonction de la fluidité membranaire sont attribuées à des modifications des propriétés des récepteurs aux facteurs chimiotactiques. Il a été montré que des agents modulateurs de la fluidité membranaire comme des alcools aliphatiques (butanol, propanol) incubés à des doses faibles non toxiques en présence de PNN entraînent une augmentation de la fluidité membranaire associée à une augmentation (d'un facteur 1,5) de l'expression du nombre des récepteurs au fMLP ainsi qu'une augmentation de leur affinité (d'un facteur 10) sans en altérer leur spécificité. Ainsi une fluidité membranaire accrue favoriserait la transduction des signaux *via* le récepteur au fMLP (Yuli I, 1982 ; Tomonaga A, 1983). Une application pratique de ces données a été apportée par une étude réalisée chez des patients présentant une hypercholestérolémie : dans cette population, un taux élevé de LDL provoque une altération de la composition lipidique de la membrane des polynucléaires neutrophiles, entraînant une diminution de la fluidité de leur membrane et expliquant l'altération du signal de transduction médié par le R-fMLP (Paragh G, 1999).

Ces données montrent bien que chimiotactisme, comportement des récepteurs membranaires et fluidité membranaire sont des paramètres corrélés et que l'étude du chimiotactisme cellulaire représente donc une bonne approche fonctionnelle de l'étude de la fluidité membranaire.

## II-1-B- FLUIDITE MEMBRANAIRE ET EXPRESSION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE

Nous avons rapporté ci-dessus que **la fluidité membranaire influence la translation** (Klausner RD, 1980), **la conformation** (Diamond MS, 1994 ; Kakimoto H, 1995), **l'accessibilité** (Gimpl G, 1997 ; Bastiaanse EM, 1997) **et l'affinité de liaison** (Heron D, 1980 ; Dave JR, 1986 ; Peterson SW, 1992) **des récepteurs par le biais de la variation de la composition lipidique** (Gimpl G, 1997).

La littérature est riche de l'implication de ces données dans la compréhension de pathologies diverses. Ainsi, il a été montré que l'infection par le prion entraînait une diminution d'un facteur 7 de la fluidité des membranes neuronales causant une réduction de 90% de la fonction de récepteurs membranaires comme l'IP3, second messenger de la réponse à la bradykinine (Wong K, 1996). Ces dysfonctionnements membranaires pourraient également expliquer la survenue des lésions de vacuolisations neuronales rencontrées dans cette pathologie. Dans la maladie d'Alzheimer, l'augmentation de la fluidité membranaire observée pour les plaquettes est associée à une diminution de l'expression des récepteurs GPIIb/IIIa consécutive à un défaut d'accessibilité de ces protéines anormalement enfoncées dans la bicouche lipidique (Kozubski W, 1999). Cette notion pourrait participer aux arguments diagnostiques de la maladie. Dans la maladie de Parkinson, il a été récemment montré une modulation des propriétés des récepteurs au GABA(A) par l'influence du cholestérol sur la fluidité membranaire, ce qui laisse entrevoir des ouvertures d'actions pharmacologiques par un régime modulé en apport en cholestérol (Sooksawate T, 2001a et b). Dans le domaine de la diététique, un régime riche en acides gras polyinsaturés influence la fluidité membranaire en agissant sur le ratio acides gras polyinsaturés/saturés et affecte le récepteur à la leptine, OB-Rb, c'est-à-dire le récepteur hypothalamique de l'hormone leptine qui est connue pour son rôle dans la régulation de l'appétit et du poids (Heshka JT, 2001).

La relation directe entre fluidité membranaire et expression de récepteurs d'adhérence comme les intégrines a été apportée par une expérience ayant montré une modulation de l'expression quantitative et qualitative des récepteurs CD11a/CD18 et CD11b/CD18 à la surface de monocytes et de lymphocytes incubés en présence de composants de la paroi bactérienne de *Staphylococcus aureus*.

Cette modulation était corrélée aux modifications de fluidité membranaire mesurée par polarisation de fluorescence (Carratelli CR, 1996).

En conclusion, la fluidité membranaire est un paramètre déterminant dans le comportement des protéines membranaires. La mesure de l'expression des récepteurs d'adhérence du monocyte constitue donc un moyen complémentaire approprié d'étude de la fluidité membranaire de ces cellules.

### II-1-C- FLUIDITE MEMBRANAIRE ET ETUDE DE L'ASYMETRIE LIPIDIQUE PAR MESURE DE L'EXPOSITION DES PHOSPHOLIPIDES ANIONIQUES

L'asymétrie lipidique physiologique des membranes plasmiques signifie, à l'état basal, une répartition prédominante de certains aminophospholipides, phosphatidylcholine et sphingomyéline, au niveau du feuillet externe de la bicouche lipidique alors que d'autres aminophospholipides, phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine, sont séquestrés préférentiellement dans le feuillet interne de la membrane plasmique (Bretscher M, 1972).

Le maintien de cette répartition asymétrique des phospholipides membranaires résulte d'un équilibre dynamique entre les deux feuillets du fait de trois transporteurs (Zwaal RFA, 1997; Bevers EM, 1998a et 1998b) (*figure n°III-3-4*).

- ① Le transporteur le mieux connu sur le plan fonctionnel est ***l'aminophospholipide translocase***. Il est  $Mg^{2+}$ -ATP-dépendant et transporte spécifiquement et rapidement les aminophospholipides tels que la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine. Dans la membrane à l'état basal, ce transporteur est responsable du maintien du côté cytoplasmique de la phosphatidylsérine et de la phosphatidyléthanolamine qu'il transporte spécifiquement, du feuillet externe vers le feuillet interne contre le gradient de concentration (Devaux PF, 1991 et 1994; Dolis D, 1997). Ce phénomène est rapide ( $T_{1/2}$  : 5-10 min) et nécessite une molécule d'ATP pour une molécule de lipide transportée. Son activité est inhibée par de fortes concentrations en  $Ca^{2+}$ .

- ② le deuxième transporteur est une ***floppase***, ATP dépendante, qui transporte de façon moins spécifique, à la fois les aminophospholipides et les cholinephospholipides, du feuillet interne vers le feuillet externe. Sa  $T_{1/2}$  est dix fois plus longue que celle de l'aminophospholipide translocase.

- ③ le troisième transporteur est représenté par une **scramblase**,  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante, qui assure des mouvements transmembranaires, de façon non spécifique de l'ensemble des phospholipides, rapidement (en quelques minutes) et de façon bidirectionnelle entre les deux feuillettes : mouvements de *flip-flop*. L'activité de ce transporteur ne nécessite pas d'ATP, mais requiert la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sims PJ, 2001).

Ainsi, à l'état basal, l'action combinée et équilibrée entre la translocase, qui internalise rapidement la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine, la floppase, qui extériorise 10 fois plus lentement les phospholipides, et la scramblase, qui agit rapidement en bidirectionnel, assure la stabilité physiologique de l'asymétrie membranaire.

Pour des concentrations cytoplasmiques en  $\text{Ca}^{2+}$  physiologiques (c'est-à-dire basses), l'aminophospholipide translocase et la floppase sont toutes les deux actives, permettant le maintien de l'asymétrie membranaire.

Lors de l'activation cellulaire, les fortes concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  activent la scramblase lipidique et inhibent l'action coopérative de la translocase et de la floppase qui sont alors incapables de réinternaliser ces phospholipides. Ceci conduit à une répartition au hasard des phospholipides, entraînant une déstabilisation locale de la membrane et du brassage ("scrambling") des phospholipides entre les deux feuillettes au sein de la bicouche lipidique, et une perte de cette asymétrie avec exposition plus importante des phospholipides tels que la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine (Zwaal RFA, 1993 ; Bassé F, 1993 ; Zimmerman ML, 1993 ; Williamson P, 1995 ; Gaffet P, 1995).

L'exposition de ces phospholipides anioniques :

- favorise la coagulation, en offrant une surface catalytique aux complexes enzymatiques vitamine K dépendants, prothrombinase et tenase, à la surface des plaquettes activées et des microparticules,
- représente un message de reconnaissance pour les macrophages, favorisant l'élimination de ces cellules par le système réticulo-endothélial,
- constitue un signal précoce d'apoptose, précédant même la fragmentation de l'ADN.

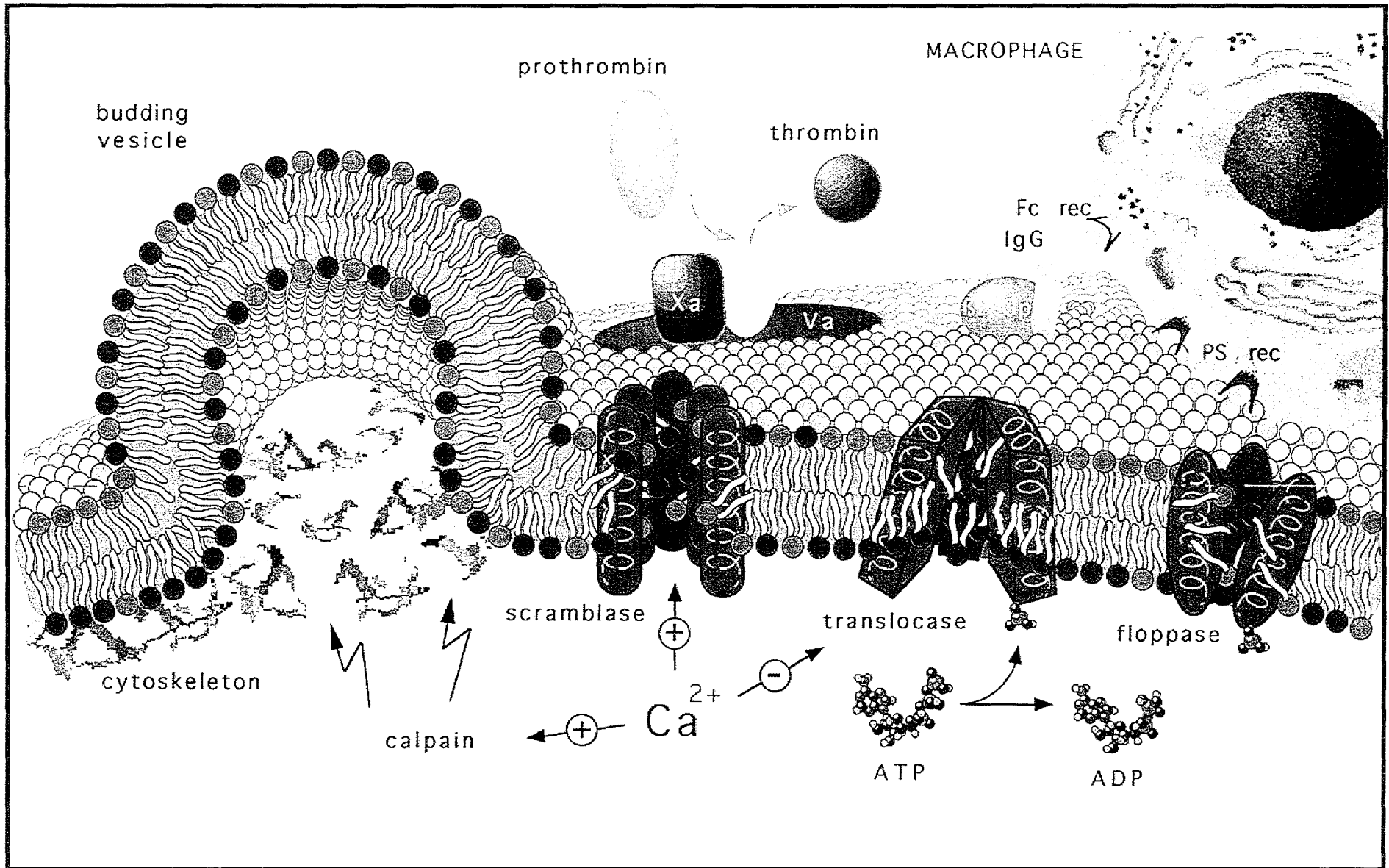


Figure n° III-3-4 : Régulation de l'asymétrie phospholipidique membranaire (d'après Zwaal RFA, 1997).



Cette asymétrie des phospholipides membranaires dépend directement du fonctionnement de récepteurs protéiques, dont on a précédemment montré l'influence de la fluidité membranaire sur leurs expressions quantitative et fonctionnelle. Une étude a établi la relation directe entre asymétrie membranaire et fluidité membranaire en montrant, pour des lymphocytes d'origine humaine, que l'asymétrie des membranes plasmiques diminuait avec l'âge et que ce phénomène correspondait à une altération de la fluidité membranaire superficielle (Noble JM, 1999). Cette anomalie, montrée ici pour les lymphocytes, pourrait exister pour d'autres cellules de la réponse immune comme le monocyte, ce qui contribuerait à l'altération des interactions cellulaires impliquées dans la réponse immunitaire. Il a été d'ailleurs montré les effets d'une modulation des phospholipides membranaires sur l'activité biologique des lymphocytes, PNN et monocytes (Galdiero F, 1991). Ainsi, les phospholipides contenant des acides gras de C12 à C20, comme la phosphatidylcholine, entraînent une diminution des capacités de chimiotactisme et d'adhérence des PNN. Les phospholipides contenant des acides gras de C14 à C17 améliorent la chimiluminescence des PNN alors que phosphatidylcholine et L-phosphatidyl-glycérol altèrent cette chimiluminescence.

L'étude de cette asymétrie membranaire est réalisée, par cytométrie en flux, à l'aide de la mesure de la fixation d'annexine V (Kuypers FA, 1996 ; Tait J, 1999). En effet, l'annexine V représente une sonde spécifique des phospholipides anioniques puisque elle a pour propriété de se fixer, de façon calcium dépendante, préférentiellement sur ces phospholipides et en particulier la phosphatidylsérine (Dachary-Prigent J, 1993). Par conséquent, la quantité d'annexine V mesurée sera proportionnelle à l'exposition de phosphatidylsérine, témoin de l'asymétrie lipidique.

Ce test représente donc bien une approche fonctionnelle de la fluidité membranaire des monocytes.



## II-2- PATIENTS ET TEMOINS

### II-2-A- PATIENTS

De mai 2001 à juin 2002, 24 patients atteints de cirrhose alcoolique, consultants ou hospitalisés dans le service d'Hépatogastro-Entérologie du CHU de Nancy, ont été inclus dans l'étude (1 patient a été exclu du fait de l'absence de renseignements cliniques). Le diagnostic de cirrhose était cliniquement évident (hépatomégalie, signes d'hypertension portale (splénomégalie, circulation collatérale cutanée de type porto-cave) et signes d'insuffisance hépato-cellulaire (angiomes stellaires dans le territoire cave supérieur, érythrose palmaire)) ou prouvé histologiquement (fibrose, architecture nodulaire du parenchyme, caractère diffus des lésions dans tout le foie). Son origine était exclusivement éthylique (consommation avouée, anomalies biologiques traduisant la consommation excessive d'alcool (augmentation du volume globulaire moyen et de l'activité de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, augmentation de l'activité des aminotransférases prédominant sur l'ASAT, rapport ASAT/ALAT >1, présence de lésions histologiques liées à l'alcool comme la stéatose macrovacuolaire, mitochondries géantes, lésions d'hépatite alcoolique); les autres étiologies (virales B et C, hémochromatose, maladie de Wilson, causes médicamenteuses, et auto-immunes) ayant été éliminées. Aucun patient ne présentait d'hépatocarcinome (tomodensitométrie hépatique et concentration d' $\alpha$  foeto-protéine normales). L'hémogramme a été analysé à la recherche d'un éventuel épisode infectieux intercurrent (hyperleucocytose à PNN) ou d'un hypersplénisme (thrombopénie et leuconéutropénie).

La **gravité de la cirrhose** a été appréciée pour chaque patient par la détermination du score de Child-Pugh, prenant en compte les paramètres suivants et calculé ainsi :

|                                  |      |           |           |
|----------------------------------|------|-----------|-----------|
| Encéphalopathie                  | non  | confusion | coma      |
| Ascite clinique                  | non  | modérée   | abondante |
| Bilirubine ( $\mu\text{mol/L}$ ) | < 35 | 35-50     | > 50      |
| Albuminémie (g/L)                | > 35 | 28-35     | < 28      |
| Taux de Quick (%)                | > 50 | 40 à 50   | < 40      |

On définit trois classes:

- classe A : score de 5-6
- classe B : score 7-9
- classe C : score > 10

Il a été analysé également chez ces patients cirrhotiques :

- la fréquence des **complications infectieuses** (infections péritonéale, pulmonaire, urinaire),
- la fréquence des **complications hémorragiques**, digestives et autres.

### **II-2-B- TEMOINS**

Vingt-deux témoins ont été analysés dans les mêmes conditions. Il s'agit de patients consultant pour des endoscopies de surveillance, ou du personnel du service, tous sains et volontaires.

## II-3- DESCRIPTION DES TESTS UTILISES

### II-2-A- ANALYSE DU CHIMIOTACTISME DES MONOCYTES

#### PRINCIPE

L'étude du chimiotactisme des monocytes est l'analyse du procédé par lequel un facteur chimiotactique, disposé selon un gradient de concentration, induit un mouvement de migration orientée de cette cellule vers ce facteur. Les monocytes expriment des récepteurs pour des agents chimiotactiques provenant de la paroi bactérienne comme les peptides N-formylés, des facteurs provenant de l'activation complémentaire (C5a), ou dérivant du métabolisme cellulaire, de l'acide arachidonique (leukotriène B4) ou de la phosphatidylcholine (facteur activateur plaquettaire, PAF). Les monocytes présentent également des récepteurs pour les chimiokines  $\beta$  de type C-C (MIP-1).

Les récepteurs aux facteurs chimiotactiques appartiennent à la famille des "serpentes" nommées ainsi du fait de leur structure moléculaire qui "serpente" à travers la membrane cellulaire grâce à 7 domaines transmembranaires, et qui sont couplés à des protéines G liant le GDP. La liaison d'un agent chimiotactique à son récepteur entraîne l'échange de ce GDP en GTP et la protéine G ainsi activée, active à son tour des mécanismes de transduction conduisant, via une mobilisation du calcium ionisé, à la mobilisation des granules intracellulaires et au chimiotactisme par réorganisation du cytosquelette nécessaire à la mobilité cellulaire.

Le principe de ce test est de reproduire la migration des monocytes sur un gel d'agarose en présence de substances attractantes réparties selon un gradient de concentration. Les facteurs chimiotactiques utilisés dans notre étude est le formyl méthionyl leucyl phénylalanine (fMLP), peptide synthétique reproduisant une structure de base des parois bactériennes et le ZAS (sérum activé par le zymosan).

#### MATERIEL ET REACTIFS

- Boîtes de Pétri stériles en plastique pour culture cellulaire (Falcon 3002, 60 x 15 mm).
- Réchaud.
- Incubateur à 37°C à atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

- Tubes jaugés de 10 mL, en verre.
- Emporte-pièce pour gélose de 3 mm de diamètre intérieur.
- Eau distillée stérile.
- Milieu MEM 10X (Minimum Essential Medium) concentré 10 fois (Gibco, réf 21430-020).
- Bicarbonate de sodium à 7,5% (Prolabo, réf 27 778.293).
- Pool de sérum humain inactivé par la chaleur (chauffer le sérum à 56°C pendant 30 min) et conservé à -80°C.
- Agarose = indubiose A37 (Industrie Biologique Française, réf 230 231).
- Zymosan (Sigma, réf Z 4250).
- fMLP (Sigma, réf F 6004).
- Méthanol (Merck, réf MC 310655).
- Formaldéhyde (Prolabo, réf 20 909.290).
- Fuschine (RAL).
- Milieu Lymphoprep (Eurobio, réf 914 630).
- Solution de Percoll (Sigma, réf P 7828).

## MODE OPERATOIRE

**Prélèvement.** Sang veineux recueilli en présence de l'anticoagulant héparine lithium (tube Vacuteiner, Becton-Dickinson). Le délai, entre le prélèvement et l'analyse, doit être raccourci au maximum afin de limiter l'activation artéfactuelle des monocytes *in vitro* (en pratique délai inférieur à 15 min).

### Isolement des monocytes

Les monocytes sont séparés des autres cellules sanguines à l'aide de 2 milieux de séparation :

- + milieu Lymphoprep (Eurobio, réf 914 630), densité  $d = 1,077 \pm 0,001$  g/L, permettant de récupérer les cellules mononucléées.
- + solution de Percoll (Sigma, réf P 7828), densité  $d = 1,13 \pm 0,005$  g/L, permettant de séparer les monocytes des lymphocytes.

### Préparation des facteurs chimiotactiques

+ ZAS :

- Suspension de zymosan à 10 mg/mL dans du tampon PBS.
- Ajouter 1 mL de sérum frais à 100  $\mu$ L de cette suspension.

- Incuber 60 min à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 5 min à 3500 trs/min et récupérer le surnageant en fractions de 100-200 µL, conservées à - 20°C.

+ fMLP :

- Préparer une solution à  $10^{-3}$  M, soit dissoudre 2,2 mg de fMLP dans 5 mL de milieu MEM.
- Faire 2 dilutions au 1/100 pour obtenir une concentration de  $10^{-7}$  M.
- Congeler à -20°C et attendre au moins 15 jours avant toute utilisation.

### **Préparation des boîtes de Pétri**

+ Préparation de la gélose (pour 4 boîtes de gélose) :

- Ajouter 0,24 g d'indubiose A 37 à 10 mL d'eau distillée dans un tube jaugé en verre de 10 mL.
- Placer le tube au bain-marie bouillant 5 à 10 min jusqu'à dissolution complète, en le remuant de temps en temps.
- Dans un bécher, déposer de façon stérile :
  - . 5,8 mL d'eau distillée stérile
  - . 2,0 mL MEM 10X
  - . 2,0 mL de sérum inactivé
  - . 0,2 mL de NaHCO<sub>3</sub> à 7,5%.
- Ajouter la gélose dans le bêcheur et mélanger.
- Distribuer rapidement 4,7 mL de ce milieu dans chaque boîte de Pétri en évitant l'introduction de bulles d'air. Homogénéiser les boîtes et laisser refroidir en les laissant d'abord sur la paillasse puis en les mettant à 4°C (30 min minimum et une ½ journée au maximum).

+ Découpe des puits : découper 4 séries de 2 puits de 3 mm de diamètre, séparés entre eux de 3 mm (*figure n°III-3-5*).

### **Dépôt de la suspension cellulaire et des facteurs chimiotactiques**

- Déposer dans trois puits externes 10 µL de facteur chimiotactique, le quatrième restant vide, représentera le contrôle. Le ZAS sera déposé 1 heure à l'avance afin d'établir le gradient de concentration ; ce temps de diffusion préalable n'est pas nécessaire au fMLP.
- Déposer dans les quatre puits externes 10 µL de suspension monocyttaire.

- Laisse incuber les boîtes dans l'incubateur à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>, durant 24 heures.

### **Fixation et coloration**

- Fixation : recouvrir les boîtes de 5 mL de méthanol pendant 30 min ; puis remplacer le méthanol par 5 mL de formaldéhyde pendant 30 min et vider.
- Décoller soigneusement les gélules et retourner sur un papier absorbant.
- Coloration : mettre 2 à 3 gouttes de fuschine avec de l'eau distillée durant quelques secondes. Rincer doucement à l'eau distillée et laisser sécher.

### **Lecture** (*figure n°III-3-5*)

- Au microscope, objectif x 10, avec un quadrillage de 10 carreaux sur 10 de 0,12 mm de côté.
- Repérer les plages de migration autour des puits des monocytes. En positionnant la grille en bordure des puits, mesurer les distances A et B de façon radiaire, en repérant la bande de la grille qui renferme encore au moins 2 monocytes ayant migré.
- Faire la moyenne des 3 puits et convertir la distance mesurée en mm, en sachant que 1 carreau (= 1 bande) = 0,12 mm.

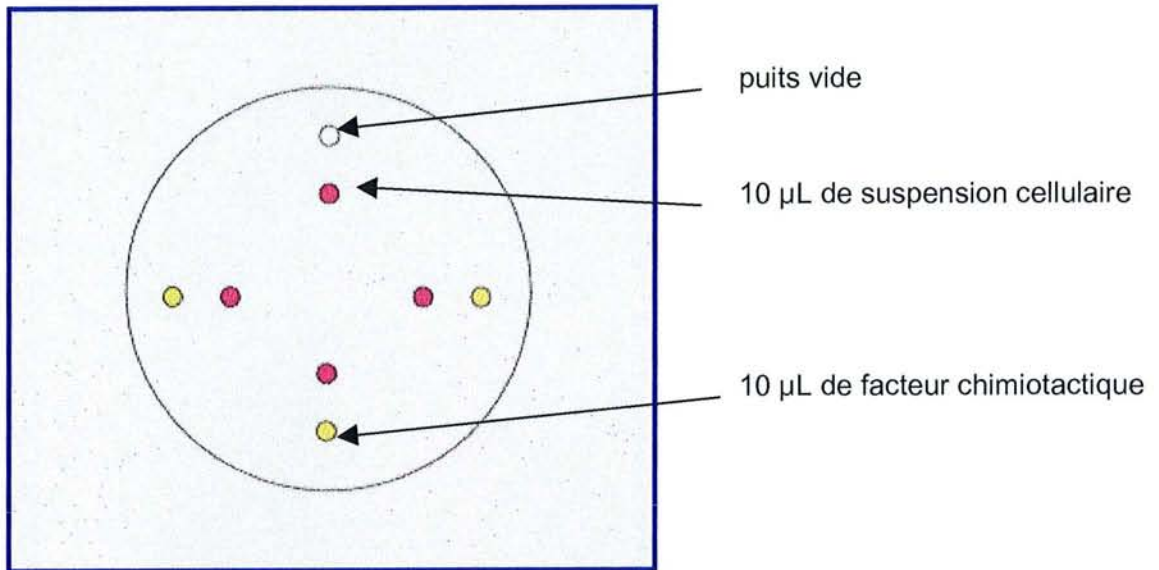
### **Expression des résultats**

- A : migration par chimiotactisme
- B : migration spontanée
- A-B : différentielle chimiotactique
- A/B : index chimiotactique

### **ANALYSE STATISTIQUE**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type et les comparaisons sont réalisées à l'aide de test impair de Student. Les différences sont considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ .

**Découpe des puits - Dépôt de la suspension cellulaire et des facteurs chimiotactiques**



**Migration des cellules vers le facteur chimiotactique**

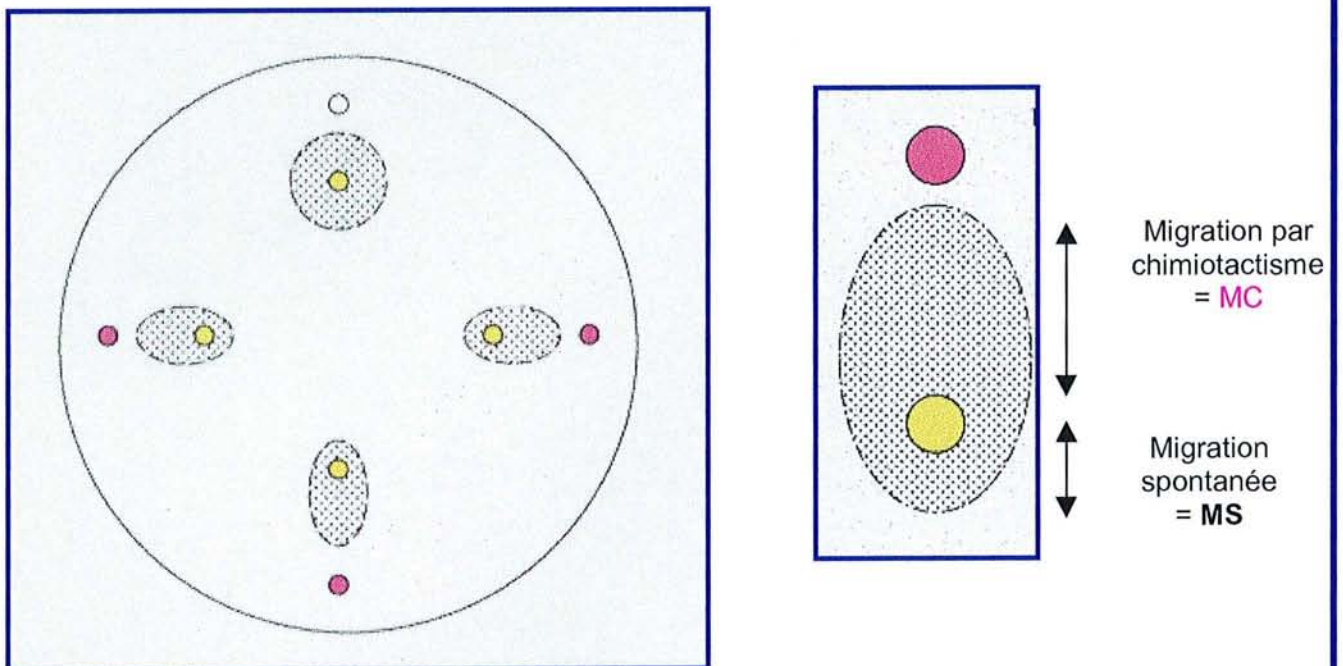
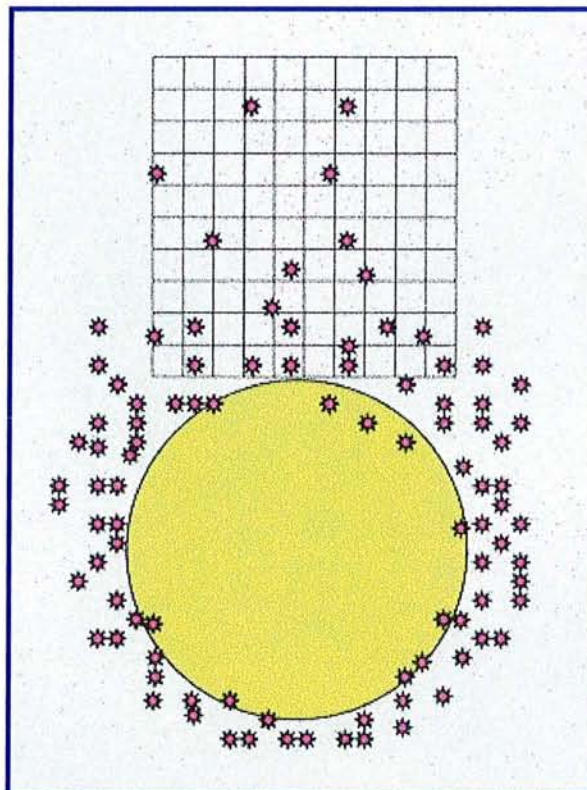


Figure n°III-3-5 : Analyse du chimiotactisme des monocytes.

**Lecture au microscope.** Objectif x 10 avec un quadrillage de 10 carreaux x 10 carreaux de 0,12 mm de coté, en plaçant le bord du quadrillage au bord du puits de cellules. Prendre en compte la rangée qui ne renferme plus que 2 cellules.



### Expression des résultats

**A** : migration par chimiotactisme = moyenne des MC x 0,12 mm

**B** : migration spontanée = moyenne des MS x 0,12 mm

**A-B** : différentielle chimiotactique

**A/B** : index chimiotactique

Figure n°III-3-5 (suite) : Analyse du chimiotactisme des monocytes.



## **II-2-B- QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE A LA SURFACE DES MONOCYTES PAR CYTOMETRIE EN FLUX**

### **PRINCIPE**

L'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des monocytes est mesurée à l'aide d'un immunomarquage par immunofluorescence directe par des anticorps monoclonaux, puis analyse par cytométrie en flux. Les monocytes sont repérés grâce à leurs paramètres taille/structure ainsi qu'à l'aide de l'expression de CD14 (récepteur spécifique de la lignée monocyttaire). La mesure arbitraire (unité en intensité moyenne de fluorescence) mesurée à partir de cette population monocyttaire est convertie en unité quantitative (nombres de sites occupés par les anticorps) à l'aide des billes de calibration. Cette expression est proportionnelle au nombre de récepteurs présents à la surface de la cellule. Cette mesure est réalisée à l'état basal et après stimulation des monocytes par le zymozan afin d'analyser le ratio d'activation des monocytes (= expression du récepteur étudié après stimulation / expression du récepteur à l'état basal).

### **MATERIEL ET REACTIFS**

- Cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickinson).
- Tubes à fond rond en polypropylène de 4,5 mL (Becton-Dickinson).
- Centrifugeuse GR 4-12 (Jouan).
- Bain marie.
- IgG1 souris-FITC (Beckman Coulter, réf IM 0639).
- IgG1 souris-PC5 (Beckman Coulter, réf IM 2663).
- Anticorps anti-CD62L-PC5 (Beckman Coulter, réf IM 2655).
- Anticorps anti-CD11b-FITC (Beckman Coulter, réf IM 0530).
- Anticorps anti-CD18-FITC (Beckman Coulter, réf IM 1568).
- Anticorps anti-CD14-PE (Immunotech, réf IM0650F).
- Billes de calibration (Quantum Simply Cellular, réf QSC100).
- Zymozan (Sigma, réf Z4250).
- Tampon PBS (Phosphate-buffered saline) glucosé 1 mmol/L, PH=7,4.
- Réactif de lyse des globules rouges (Immunotech, IM 3514).

## **MODE OPERATOIRE**

### **Prélèvement**

Sang veineux recueilli en présence de l'anticoagulant EDTA (tube Vacuteiner, Becton-Dickinson). Le délai entre le prélèvement et l'analyse doit être raccourci au maximum afin de limiter l'activation artéfactuelle des monocytes *in vitro* (en pratique délai inférieur à 15 mn).

### **Stimulation des monocytes**

- Ajouter 500 µL de sang total à 500 µL de zymosan.
- Incuber à 37°C, sans agitation pendant 20 min.

### **Immunomarquage**

- Dix µL de l'anticorps anti-récepteur d'adhérence marqué (anti-CD62L, CD11b ou CD18) sont ajoutés à 100 µL de sang total (sans et avec zymosan). Incuber à température ambiante, à l'obscurité, durant 40 min.
- Ajouter l'anticorps anti-CD14-PE dans tous les tubes. Incuber à température ambiante, à l'obscurité, durant 20 min.
- Ajouter 2 mL de réactif de lyse des hématies dans tous les tubes. Incuber à température ambiante, à l'obscurité, durant 10 min.
- Centrifuger 5 min à 1000 trs/min, décantation du surnageant.
- Laver avec 2 mL de PBS, réaliser une 2<sup>ème</sup> centrifugation dans les mêmes conditions et décanter le surnageant.
- Le culot est resuspendu dans 300 µL de tampon PBS.

### **Préparation des billes de calibration**

- Dix µL de l'anticorps anti-récepteur d'adhérence marqué (anti-CD62L, CD11b ou CD18) sont ajoutés à 50 µL de suspension de billes. Incuber à température ambiante, à l'obscurité, durant 60 min.
- Centrifuger 5 min à 1000 trs/mn et décanter le surnageant.
- Laver avec 2 mL de PBS, réaliser une 2<sup>ème</sup> centrifugation dans les mêmes conditions et décanter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 300 µL de tampon PBS.

### **Analyse des cellules et des billes par cytométrie en flux (figure n°III-3-6)**

- Analyse des billes de calibration :
  - 1- Définir la population des billes sur l'histogramme biparamétrique taille /structure par une fenêtre électronique (R1).

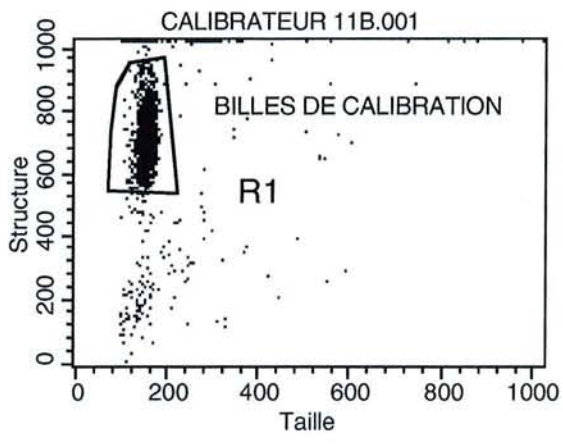
- 2- Mesurer l'IMF géométrique de chaque population de bille sur l'histogramme de fluorescence approprié.
  - 3- Construire la droite de calibration, reliant l'IMF au nombre de sites occupés par l'anticorps ou CLA, pour chaque population de billes (indiqué sur la trousse).
- Analyse des monocytes :
- 4- Définir la population des monocytes sur l'histogramme biparamétrique taille /structure (fenêtre R1) et sur l'histogramme de fluorescence FL2 à l'aide de la fluorescence liée à l'expression de CD14 (récepteur spécifique de la lignée monocyttaire) (fenêtre R2).
  - 5- Mesurer l'IMF géométrique de cette population définie par la fenêtre  $R1 \cap R2$ , sur l'histogramme de fluorescence approprié.
  - 6- Se reporter sur la droite de calibration pour convertir cette valeur de l'IMF géométrique en nombre de sites occupés par l'anticorps (ou CLA).

## **EXPRESSION DES RESULTATS**

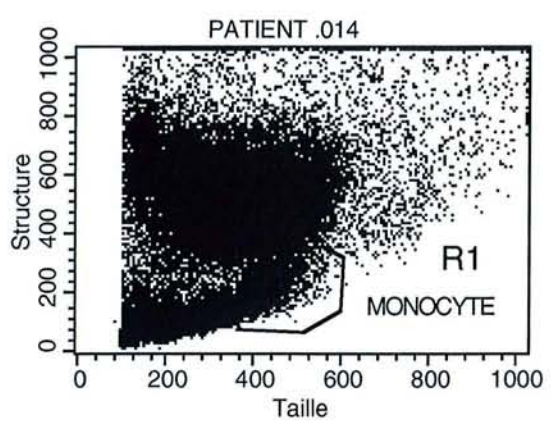
Les résultats sont exprimés sous forme de ratio d'activation des monocytes pour l'expression des récepteurs d'adhérence (= expression du récepteur étudié après stimulation / expression du récepteur à l'état basal).

## **ANALYSE STATISTIQUE**

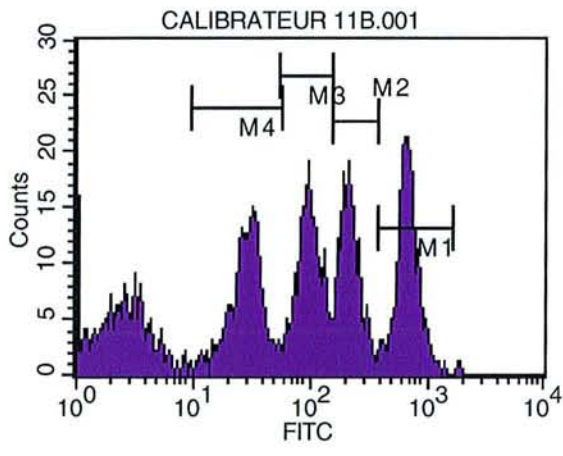
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type et les comparaisons sont réalisées à l'aide de test impair de Student. Les différences sont considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ .



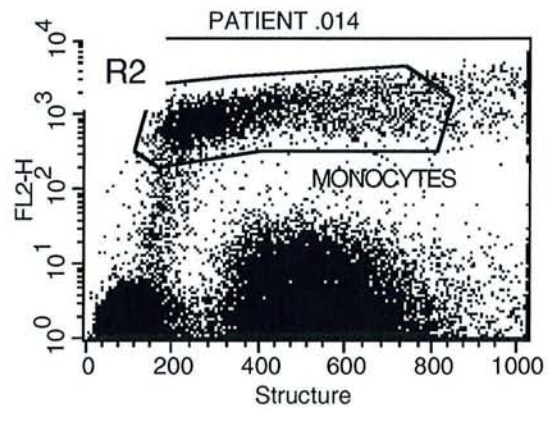
1



4



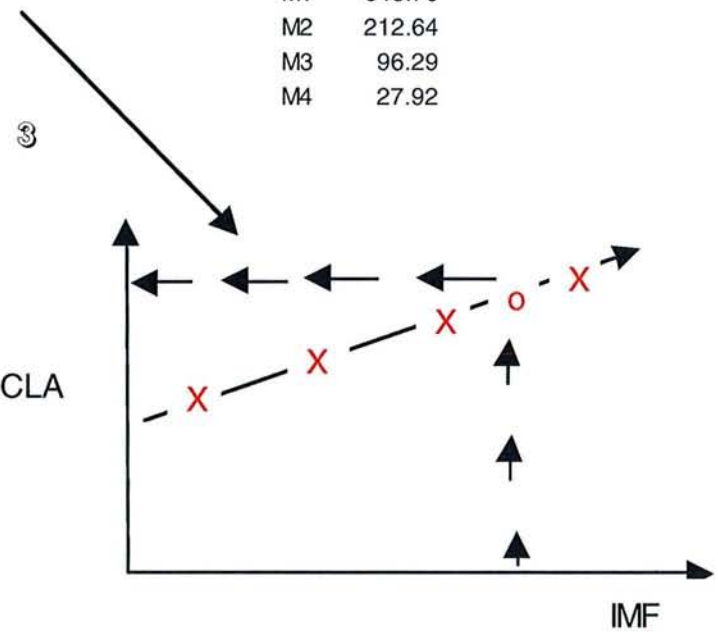
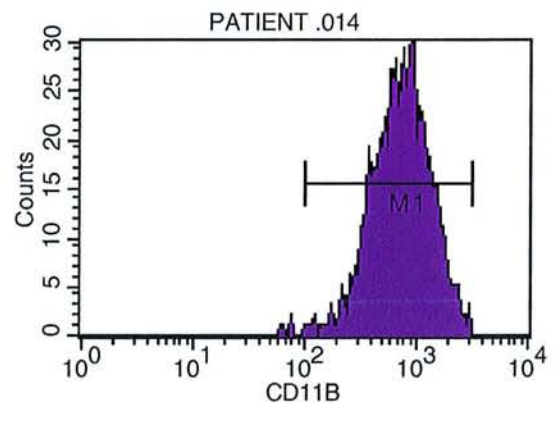
2



5

File: CALIBRATEUR 11B.001  
Gate: G1

| Marker | Geo Mean |
|--------|----------|
| All    | 71.83    |
| M1     | 643.70   |
| M2     | 212.64   |
| M3     | 96.29    |
| M4     | 27.92    |



File: PATIENT .014  
Gate: G2

| Marker | Geo Mean |
|--------|----------|
| All    | 688.00   |
| M1     | 690.45   |

6

Droite de calibration pour l'anticorps CD11b

Figure n° III-3-6: Quantification de l'expression du recepteur d'adherence CD11b a la surface des monocytes, par cytometrie en flux.

## II-2-C- MESURE DE L'EXPOSITION DES PHOSPHOLIPIDES ANIONIQUES A LA SURFACE DES MONOCYTES A L'AIDE DE L'ANNEXINE V PAR CYTOMETRIE EN FLUX

### PRINCIPE

Le but de cette exploration est d'analyser l'asymétrie membranaire à l'état basal et après stimulation des monocytes par le zymozan. Pour ce, nous utilisons l'annexine V, une sonde spécifique des phospholipides anioniques qui a pour propriété de se fixer, de façon calcium dépendante, préférentiellement sur ces phospholipides et en particulier la phosphatidylsérine (Dachary-Prigent J, 1993). Nous mesurons, par cytométrie en flux, (Kuypers FA, 1996 ; Tait J, 1999), l'expression d'annexine V à la surface des monocytes, à l'état basal et après stimulation par le zymozan afin d'analyser le ratio d'activation des monocytes pour l'annexine V (= expression d'annexine V après stimulation / expression d'annexine V à l'état basal).

### MATERIEL ET REACTIFS

- Cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickinson).
- Tubes à fond rond en polypropylène de 4,5 mL (Becton-Dickinson).
- Centrifugeuse GR 4-12 (Jouan).
- Bain marie.
- Anticorps anti-CD14-PE (Immunotech, réf IM0650F).
- Annexine V-FITC (Bioproducts, Boehringer Ingelheim, réf BMS 306 FI).
- Tampon HNKGB: pour 100 mL d'eau distillée, peser :

- . 7,770 g de NaCl
- . 0,438 g de KCl
- . 0,900 g de glucose
- . 2,61 g de Hepes-Na
- . 1 g de BSA
- . 0,277 mg de CaCl<sub>2</sub>

A diluer au 1/10 lors de l'utilisation et ajuster le pH à 7,4.

- Zymozan (Sigma, réf Z 4250).
- Réactif de lyse des globules rouges à base de NH<sub>4</sub>Cl (Merck, réf 522.A 992945).

## **MODE OPERATOIRE** (d'après Tait JF, 1999)

### **Prélèvement**

Sang total prélevé en présence de l'anticoagulant EDTA (tube Vacuteiner, Becton Dickinson). Le délai, entre le prélèvement et l'analyse, doit être raccourci au maximum afin de limiter l'activation artéfactuelle des monocytes *in vitro* (en pratique délai inférieur à 15 mn).

### **Lyse des hématies**

- Ajouter 7 volumes de lyse  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à un volume de sang.
- Incuber 10 min à température ambiante.
- Centrifuger 5 min à 1000 trs/min et décanter.
- Faire un premier lavage avec 40 mL de PBS et centrifuger 5 min à 1000 trs/min puis décanter.
- Faire un deuxième lavage dans les mêmes conditions avec 10 mL de HNKGBC et resuspendre le culot dans 600  $\mu\text{L}$  de HNKGBC.

**Numération des leucocytes** de la suspension cellulaire à l'aide de l'automate  $\text{H}_2$  (Technicon). Diluer éventuellement la suspension afin d'obtenir une suspension de leucocytes à la concentration de  $20 \times 10^6/\text{L}$ .

### **Stimulation des monocytes**

+ Tube "état basal" : ajouter à 200  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire 50  $\mu\text{L}$  de tampon HNKGBC. Incuber 20 min à température ambiante.

+ Tube "stimulation des monocytes" : ajouter 200  $\mu\text{L}$  de zymosan à 200  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire. Incuber à  $37^\circ\text{C}$ , avec agitation pendant 20 min.

### **Immunomarquage**

- Reprendre 40  $\mu\text{L}$  de la suspension cellulaire stimulée ou non, et ajouter 10  $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-CD14 et 6  $\mu\text{L}$  d'annexine V.
- Ajuster à 400  $\mu\text{L}$  avec du tampon HNKGBC et incuber 15 min dans de la glace et à l'obscurité.
- Faire deux lavages en ajoutant 2 mL de tampon HNKGBC et en centrifugeant 5 min à 1000 trs/min, puis resuspendre le culot dans 300  $\mu\text{L}$  de HNKGBC.

### **Analyse des cellules par cytométrie en flux** (*figure n°III-3-7*)

- 1- Définir la population des monocytes sur l'histogramme biparamétrique taille /structure (fenêtre R1) et sur l'histogramme de fluorescence FL2 à l'aide de

la fluorescence liée à l'expression de CD14 (récepteur spécifique de la lignée monocytaire) (fenêtre R2).

2- Mesurer l'IMF de cette population définie par la fenêtre R1∩R2, sur l'histogramme de fluorescence FL1 (FITC).

### **EXPRESSION DES RESULTATS**

Les résultats sont exprimés sous forme de ratio d'activation des monocytes pour l'annexine V (= IMF de l'annexine V après stimulation/ IMF de l'annexine V à l'état basal).

### **ANALYSE STATISTIQUE**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type et les comparaisons sont réalisées à l'aide de test impair de Student. Les différences sont considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ .



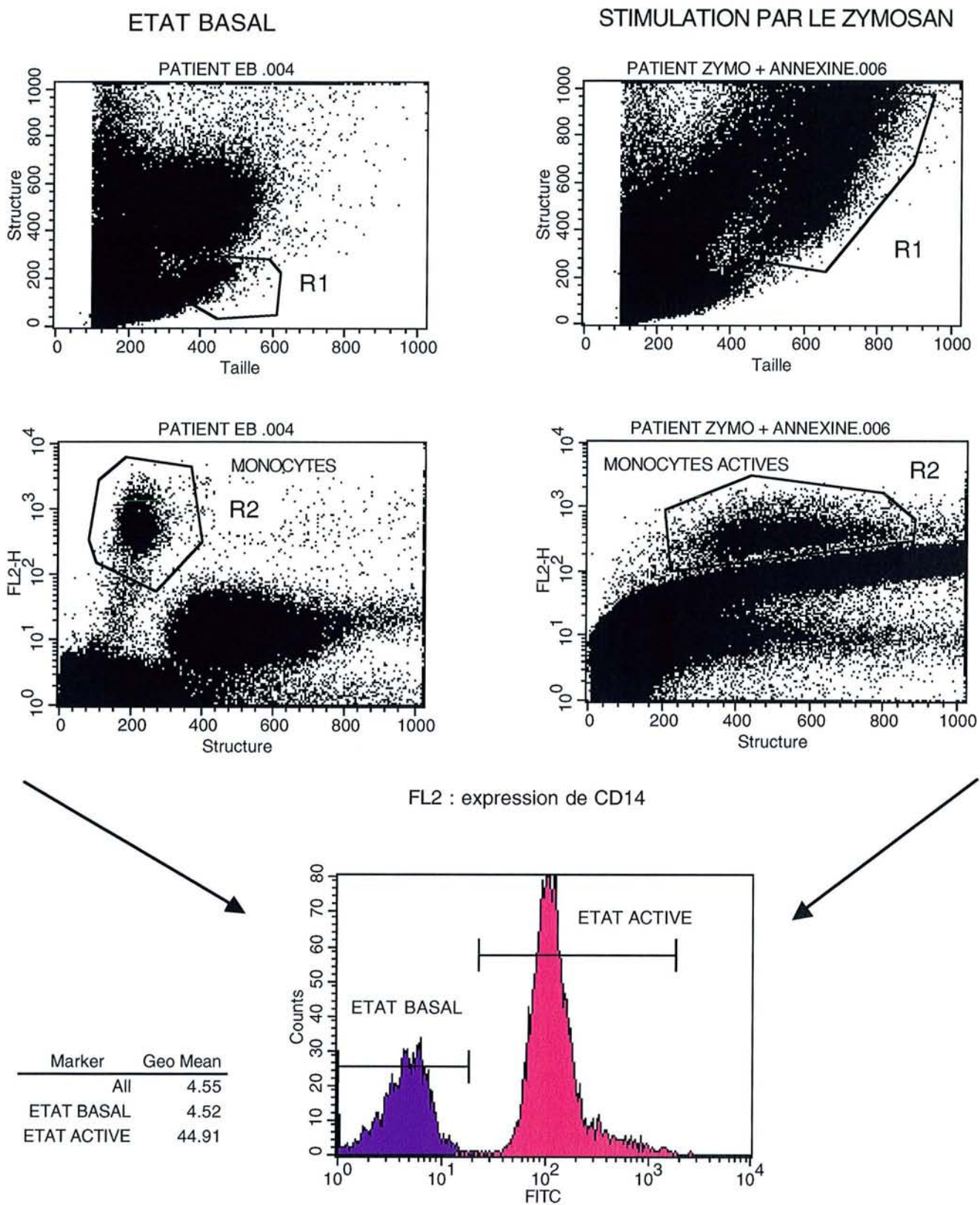


Figure n° III-3-7: Mesure de l'expression des phospholipides anioniques a la surface des monocytes a l'aide de l'annexine V, par cytométrie en flux.



### III- RESULTATS

#### III-1- ANALYSE DESCRIPTIVE

##### DESCRIPTION GENERALE DES PATIENTS

L'étude descriptive des patients est représentée en fonction :

- des critères du score de Child et Pugh (*tableau n°III-3-1*),
- des données de l'hémogramme et des complications infectieuses et hémorragiques (*tableau n°III-3-2*).

L'âge moyen des 23 patients retenus dans l'étude était de  $56,00 \pm 9,73$  ans avec des extrêmes allant de 36 à 71 ans. Le sexe masculin prédominait largement avec 61% (14/23) d'hommes et 39% de femmes (9/22).

La répartition des patients selon le score de Child-Pugh était essentiellement représentée par des stades B et C :

- stade A : 1 patient (4%)
- stade B : 10 patients (44%)
- stade C : 12 patients (52%)

| N° | Date de réalisation de l'examen | Sexe | Date de naissance | ascite | Encéphalopathie | Albumine (g/L) | Bilirubine (µmol/L) | TQ (%) | Score de Child et Pugh | Stade de Child et Pugh |
|----|---------------------------------|------|-------------------|--------|-----------------|----------------|---------------------|--------|------------------------|------------------------|
| 1  | 03/05/01                        | H    | 25/05/41          | 1      | 1               | 29,6           | 197                 | 19     | 15                     | C                      |
| 2  | 15/05/01                        | H    | 25/04/46          | 1      | 0               | 26,4           | 21                  | 77     | 10                     | C                      |
| 3  | 22/05/01                        | H    | 13/12/33          | 1      | 0               | 26,6           | 12                  | 73     | 9                      | B                      |
| 4  | 29/05/01                        | H    | 29/10/30          | 1      | 0               | 26,9           | 93                  | 37     | 13                     | C                      |
| 5  | 12/06/01                        | F    | 01/09/46          | 1      | 0               | 25,5           | 43                  | 44     | 13                     | C                      |
| 6  | 12/06/01                        | H    | 03/04/52          | 1      | 0               | 18,3           | 18                  | 49     | 9                      | B                      |
| 7  | 19/06/01                        | F    | 26/05/52          | 1      | 0               | 26,8           | 31                  | 49     | 11                     | C                      |
| 8  | 21/06/01                        | H    | 27/06/40          | 1      | 1               | 24,5           | 83                  | 36     | 14                     | C                      |
| 9  | 28/06/01                        | H    | 09/12/32          | 1      | 0               | 29,4           | 15                  | 84     | 8                      | B                      |
| 10 | 28/06/01                        | F    | 27/12/65          | 1      | 0               | 30,8           | 5                   | 65     | 7                      | B                      |
| 11 | 05/07/01                        | H    | 02/08/32          | 1      | 0               | 18,6           | 14                  | 63     | 9                      | B                      |
| 13 | 12/10/01                        | F    | 10/01/37          | 1      | 1               | 23,4           | 70                  | 35     | 14                     | C                      |
| 14 | 15/11/01                        | H    | 12/02/43          | 1      | 1               | 25,2           | 45                  | 36     | 13                     | C                      |
| 15 | 22/11/01                        | F    | 28/06/44          | 1      | 0               | 23,0           | 17                  | 62     | 9                      | B                      |
| 16 | 04/12/01                        | F    | 06/02/58          | 0      | 0               | 34,9           | 4                   | 92     | 5                      | A                      |
| 17 | 06/12/01                        | F    | 13/03/37          | 1      | 0               | 27,0           | 12                  | 47     | 8                      | B                      |
| 18 | 13/12/01                        | H    | 26/02/50          | 1      | 0               | 39,7           | 18                  | 59     | 7                      | B                      |
| 19 | 20/12/01                        | H    | 06/05/64          | 1      | 0               | 20,1           | 46                  | 41     | 12                     | C                      |
| 20 | 15/01/02                        | F    | 22/01/44          | 1      | 1               | 23,6           | 15                  | 41     | 11                     | C                      |
| 21 | 22/01/02                        | F    | 17/04/59          | 1      | 1               | 14,9           | 12                  | 73     | 10                     | C                      |
| 22 | 05/02/02                        | H    | 18/08/02          | 1      | 0               | 19,7           | 39                  | 44     | 12                     | C                      |
| 23 | 07/02/02                        | H    | 03/02/37          | 1      | 0               | 33,0           | 19                  | 58     | 9                      | B                      |
| 24 | 05/03/02                        | H    | 21/12/43          | 0      | 0               | 20,4           | 12                  | 64     | 8                      | B                      |

Tableau n°III-3-1 : Etude descriptive des patients inclus en fonction des critères du score de Child et Pugh (pour ascite et encéphalopathie : 0 signifie absence et 1 signifie présence).

| N° | Date de réalisation de l'examen | Leucocytes (G/L)<br>[VR:4-10] | PNN (G/L)<br>[VR:2-7,5] | Monocytes (G/L)<br>[VR:0,2-1] | Plaquettes (G/L)<br>[VR:150-400] | Complications infectieuses                       | Complications hémorragiques   |
|----|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|---|
| 1  | 03/05/01                        | 12,6                          | 10,4                    | 1,07                          | 77                               | Infection liquide d'ascite<br>Infection urinaire | Volumineux hématome pariétal du flanc droit                           |
| 2  | 15/05/01                        | 4,75                          | 3,37                    | 0,37                          | 200                              | 0  | 0   |
| 3  | 22/05/01                        | 4,90                          | 3,71                    | 0,41                          | 118                              | 0  | Hémorragie digestive  |
| 4  | 29/05/01                        | 6,73                          | 4,88                    | 0,78                          | 78                               | 0  | Hématome post PBH   |
| 5  | 12/06/01                        | 3,80                          | 2,68                    | 0,29                          | 99                               | 0  | 0   |
| 6  | 12/06/01                        | 9,13                          | 7,62                    | 0,99                          | 217                              | 0  | Hématémèse secondaire à rupture de varices oesophagiennes             |
| 7  | 19/06/01                        | 3,10                          | 1,92                    | 0,34                          | 92                               | 0  | Nombreux angiomes stellaires et hématomes, rectorragies.              |
| 8  | 21/06/01                        | 14,8                          | 12                      | 1,52                          | 128                              | 0  | 0   |
| 9  | 28/06/01                        | 5,98                          | 4,51                    | 0,41                          | 160                              | Pneumopathie base droite<br>Infection urinaire   | Hématémèse secondaire à rupture de varices oesophagiennes avec décès  |
| 10 | 28/06/01                        | 6,57                          | 5,09                    | 0,44                          | 82                               | 0  | Nombreuses hématémèse secondaires à rupture de varices oesophagiennes |
| 11 | 05/07/01                        |                               |                         |                               |                                  | 0  | 0   |
| 13 | 12/10/01                        | 7,24                          | 5,61                    | 0,51                          | 40                               | Infection urinaire                               | Hématémèse secondaire à rupture de varices oesophagiennes             |

Tableau n°III-3-2 : Etude descriptive des patients inclus en fonction des données de l'hémogramme, des complications infectieuses et hémorragiques. (VR : valeurs de référence, si chiffre > VR : en gras, si chiffre < VR : en gras et italique).

| N° | Date de réalisation de l'examen | Leucocytes (G/L)<br>[VR:4-10] | PNN (G/L)<br>[VR:2-7,5] | Monocytes (G/L)<br>[VR:0,2-1] | Plaquettes (G/L)<br>[VR:150-400] | Complications infectieuses                    | Complications hémorragiques  |
|----|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---|--|
| 14 | 15/11/01                        | 9,00                          | 5,36                    | 0,86                          | <b>107</b>                       | 0   | 0  |
| 15 | 22/11/01                        | 6,52                          | 3,73                    | 0,95                          | <b>138</b>                       | Infection liquide d'ascite                    | Hématémèse secondaire à rupture de varices oesophagiennes  |
| 16 | 04/12/01                        | <b>12,4</b>                   | <b>9,81</b>             | 0,88                          | 270                              | 0   | 0  |
| 17 | 06/12/01                        | 4,49                          | 2,25                    | 0,30                          | <b>121</b>                       | Infection liquide d'ascite                    | 0  |
| 18 | 13/12/01                        |                               |                         |                               |                                  | 0   | 0  |
| 19 | 20/12/01                        | 4,76                          | 3,69                    | 0,52                          | <b>46</b>                        | Pneumopathie bilatérale<br>Infection urinaire | 0  |
| 20 | 15/01/02                        | <b>3,06</b>                   | <b>1,67</b>             | 0,291                         | <b>50</b>                        | Nombreuses infections urinaires               | Hématémèse secondaire à rupture de varices oesophagiennes<br>Purpura diffus<br>Nombreuses ecchymoses |
| 21 | 22/01/02                        | 4,04                          | 2,4                     | 0,69                          | 177                              | Infection liquide ascite                      | Hémorragie sur duodénite d'HTP   |
| 22 | 05/02/02                        | 8,98                          | 6,04                    | 0,87                          | <b>126</b>                       | 0   | 0  |
| 23 | 07/02/02                        | 8,4                           | 4,32                    | 0,73                          | 261                              | 0   | 0  |
| 24 | 05/03/02                        | 6,00                          | 3,00                    | 0,65                          | <b>91</b>                        | 0   | Hématémèse secondaire à rupture de varices oesophagiennes  |

Tableau n°III-3-2 (suite) : Etude descriptive des patients inclus en fonction des données de l'hémogramme, des complications infectieuses et hémorragiques. (VR : valeurs de référence, si chiffre > VR : en gras, si chiffre < VR : en gras et italique).

### III-2- RESULTATS DES TESTS - COMPARAISON DES PATIENTS PAR RAPPORT AUX TEMOINS

| Paramètre étudié pour les monocytes        | Patients (n=23) | Témoins (n= 20) | p             |
|--|-----------------|-----------------|---------------|
| Test de chimiotactisme au ZAS              |                 |                 |               |
| - Migration spontanée                      | 1,31 ± 0,41     | 1,37 ± 0,50     | 0,7358        |
| - Migration par chimiotactisme             | 1,78 ± 0,69     | 1,91 ± 0,67     | 0,5779        |
| - Différentielle chimiotactique            | 0,47 ± 0,41     | 0,55 ± 0,27     | 0,5289        |
| - Index chimiotactique                     | 1,35 ± 0,30     | 1,42 ± 0,17     | 0,4556        |
| Test de chimiotactisme au fMLP             |                 |                 |               |
| - Migration spontanée                      | 1,28 ± 0,36     | 1,39 ± 0,37     | 0,3793        |
| - Migration par chimiotactisme             | 1,71 ± 0,46     | 1,92 ± 0,52     | 0,2175        |
| - Différentielle chimiotactique            | 0,44 ± 0,24     | 0,53 ± 0,18     | 0,2645        |
| - Index chimiotactique                     | 1,36 ± 0,23     | 1,38 ± 0,11     | 0,7564        |
| Expression de CD62L (x10 <sup>3</sup> CLA) |                 |                 |               |
| - Etat basal                               | 88,70 ± 38,70   | 133,00 ± 122,82 | <b>0,1312</b> |
| - Stimulation par ZAS                      | 1,62 ± 0,99     | 3,58 ± 6,51     | <b>0,1728</b> |
| - Ratio d'activation                       | 69,06 ± 53,59   | 62,95 ± 46,53   | <b>0,9427</b> |
| Expression de CD11b (x10 <sup>3</sup> CLA) |                 |                 |               |
| - Etat basal                               | 210,07 ± 105,81 | 149,40 ± 63,27  | 0,0317*       |
| - Stimulation par ZAS                      | 226,64 ± 75,19  | 303,48 ± 140,21 | 0,0306*       |
| - Ratio d'activation                       | 1,24 ± 0,46     | 2,17 ± 1,01     | 0,0004*       |
| Expression de CD18 (x10 <sup>3</sup> CLA)  |                 |                 |               |
| - Etat basal                               | 242,93 ± 129,24 | 215,16 ± 116,17 | 0,4699        |
| - Stimulation par ZAS                      | 461,05 ± 227,03 | 618,70 ± 360,90 | 0,0948        |
| - Ratio d'activation                       | 2,01 ± 0,54     | 3,04 ± 1,65     | 0,00797*      |
| Fixation d'annexine V (IMF)                |                 |                 |               |
| - Etat basal                               | 5,05 ± 3,05     | 3,34 ± 1,76     | 0,0341*       |
| - Stimulation par ZAS                      | 109,56 ± 54,99  | 120,32 ± 71,48  | 0,5853        |
| - Ratio d'activation                       | 28,02 ± 18,89   | 42,32 ± 25,64   | 0,0450*       |

Tableau n°III-3-3 : Comparaison des tests des patients par rapport aux témoins. Résultats exprimés en moyenne ± écart-type. Le signe \* signifie un p significatif < 0,05.

### III-3- ETUDE DES RESULTATS CHEZ LES PATIENTS EN FONCTION DE LEUR SUSCEPTIBILITE A PRESENTER DES COMPLICATIONS INFECTIEUSES

| Paramètre étudié pour les monocytes        | Patients avec infection(s) (n=8) | Patients sans infection (n= 15) | p       |
|--|----------------------------------|---------------------------------|---------|
| Test de chimiotactisme au ZAS              |                                  |                                 |         |
| - Migration spontanée                      | 1,71 ± 0,76                      | 1,83 ± 0,67                     | 0,9188  |
| - Migration par chimiotactisme             | 1,19 ± 0,43                      | 1,39 ± 0,40                     | 0,4504  |
| - Différentielle chimiotactique            | 0,52 ± 0,37                      | 0,44 ± 0,44                     | 0,43269 |
| - Index chimiotactique                     | 1,42 ± 0,22                      | 1,31 ± 0,35                     | 0,3891  |
| Test de chimiotactisme au fMLP             |                                  |                                 |         |
| - Migration spontanée                      | 1,63 ± 0,59                      | 1,76 ± 0,39                     | 0,9799  |
| - Migration par chimiotactisme             | 1,22 ± 0,37                      | 1,32 ± 0,36                     | 0,7578  |
| - Différentielle chimiotactique            | 0,40 ± 0,24                      | 0,46 ± 0,25                     | 0,6523  |
| - Index chimiotactique                     | 1,31 ± 0,15                      | 1,40 ± 0,27                     | 0,9550  |
| Expression de CD62L (x10 <sup>3</sup> CLA) |                                  |                                 |         |
| - Etat basal                               | 94,91 ± 38,97                    | 227,14 ± 299,23                 | 0,1572  |
| - Stimulation par ZAS                      | 2,44 ± 1,98                      | 4,16 ± 7,74                     | 0,5634  |
| - Ratio d'activation                       | 56,87 ± 43,92                    | 76,71 ± 52,91                   | 0,3657  |
| Expression de CD11b (x10 <sup>3</sup> CLA) |                                  |                                 |         |
| - Etat basal                               | 247,63 ± 112,22                  | 145,16 ± 53,31                  | 0,0003* |
| - Stimulation par ZAS                      | 247,54 ± 85,16                   | 191,87 ± 35,25                  | 0,05946 |
| - Ratio d'activation                       | 1,13 ± 0,41                      | 1,46 ± 0,54                     | 0,0133* |
| Expression de CD18 (x10 <sup>3</sup> CLA)  |                                  |                                 |         |
| - Etat basal                               | 281,47 ± 137,14                  | 175,17 ± 90,42                  | 0,0013* |
| - Stimulation par ZAS                      | 548,66 ± 229,44                  | 315,74 ± 128,43                 | 0,0001* |
| - Ratio d'activation                       | 2,07 ± 0,52                      | 1,97 ± 0,61                     | 0,9952  |
| Fixation d'annexine V (IMF)                |                                  |                                 |         |
| - Etat basal                               | 5,48 ± 3,79                      | 4,67 ± 2,85                     | 0,4903  |
| - Stimulation par le ZAS                   | 102,55 ± 55,36                   | 107,40 ± 57,27                  | 0,9674  |
| - Ratio d'activation                       | 27,61 ± 25,04                    | 28,55 ± 16,77                   | 0,8569  |

Tableau n°III-3-4 : Résultats des tests pour les patients en fonction de leur susceptibilité à présenter des complications infectieuses. Résultats exprimés en moyenne ± écart-type. Le signe \* signifie un p significatif < 0,05.

### III-2- ETUDE DES RESULTATS EN FONCTION DE LEUR SUSCEPTIBILITE A PRESENTER DES COMPLICATIONS HEMORRAGIQUES

| Paramètre étudié pour les monocytes        | Patients avec hémorragie(s) (n=11) | Patients sans hémorragie (n= 12) | p      |
|--|------------------------------------|----------------------------------|--------|
| Test de chimiotactisme au ZAS              |                                    |                                  |        |
| - Migration spontanée                      | 1,74 ± 0,69                        | 1,83 ± 0,73                      | 0,5863 |
| - Migration par chimiotactisme             | 1,35 ± 0,44                        | 1,28 ± 0,41                      | 0,8723 |
| - Différentielle chimiotactique            | 0,39 ± 0,33                        | 0,56 ± 0,49                      | 0,1786 |
| - Index chimiotactique                     | 1,28 ± 0,18                        | 1,43 ± 0,40                      | 0,1851 |
| Test de chimiotactisme au fMLP             |                                    |                                  |        |
| - Migration spontanée                      | 1,75 ± 0,54                        | 1,67 ± 0,39                      | 0,9569 |
| - Migration par chimiotactisme             | 1,34 ± 0,45                        | 1,22 ± 0,23                      | 0,7558 |
| - Différentielle chimiotactique            | 0,43 ± 0,23                        | 0,45 ± 0,27                      | 0,9306 |
| - Index chimiotactique                     | 1,36 ± 0,25                        | 1,37 ± 0,22                      | 0,9582 |
| Expression de CD62L (x10 <sup>3</sup> CLA) |                                    |                                  |        |
| - Etat basal                               | 126,81 ± 64,97                     | 188,15 ± 304,58                  | 0,4469 |
| - Stimulation par ZAS                      | 2,45 ± 1,79                        | 2,10 ± 1,56                      | 0,9820 |
| - Ratio d'activation                       | 73,46 ± 61,21                      | 73,44 ± 45,20                    | 0,9937 |
| Expression de CD11b (x10 <sup>3</sup> CLA) |                                    |                                  |        |
| - Etat basal                               | 209,92 ± 70,45                     | 216,14 ± 131,37                  | 0,4375 |
| - Stimulation par ZAS                      | 227,09 ± 49,32                     | 230,40 ± 92,75                   | 0,6783 |
| - Ratio d'activation                       | 1,21 ± 0,52                        | 1,26 ± 0,45                      | 0,7397 |
| Expression de CD18 (x10 <sup>3</sup> CLA)  |                                    |                                  |        |
| - Etat basal                               | 264,82 ± 108,27                    | 231,95 ± 149,84                  | 0,9092 |
| - Stimulation par ZAS                      | 492,60 ± 221,62                    | 454,83 ± 240,49                  | 0,7028 |
| - Ratio d'activation                       | 1,86 ± 0,31                        | 2,16 ± 0,64                      | 0,2878 |
| Fixation d'annexine V (IMF)                |                                    |                                  |        |
| - Etat basal                               | 4,60 ± 2,54                        | 4,49 ± 2,47                      | 0,3117 |
| - Stimulation par le ZAS                   | 103,69 ± 55,05                     | 112,52 ± 55,24                   | 0,9802 |
| - Ratio d'activation                       | 28,79 ± 24,19                      | 29,61 ± 14,86                    | 0,7988 |

Tableau n°III-3-5 : Résultats des tests pour les patients en fonction de leur susceptibilité à présenter des complications hémorragiques. Résultats exprimés en moyenne ± écart-type. Le signe \* signifie un p significatif < 0,05.

| <b>Paramètre étudié</b>       | <b>Patients avec hémorragies (n=11)</b> | <b>Patients sans hémorragie (n= 12)</b> | <b>p</b> |
|-------------------------------|---|---|----------|
| TQ (temps de Quick)           | 55,82 ± 19,17                           | 53,36± 18,43                            | 0,8404   |
| Numération plaquettaire (G/L) | 112,91 ± 55,00                          | 143,60 ± 75,40                          | 0,6838   |

Tableau n°III-3-6 : Influence du TQ et de la numération plaquettaire sur la susceptibilité à présenter des complications hémorragiques. Résultats exprimés moyenne ± écart-type. Le signe \* signifie un p significatif < 0,05.



## IV- DISCUSSION

Cette étude a fait suite à un premier travail réalisé avec le professeur JP. Bronowicki, service d'Hépatogastro-entérologie (thèse d'exercice 2000, H Barraud). Ce travail a, dans un premier temps, confirmé l'existence d'une mauvaise réponse à la vaccination contre l'hépatite B (taux de réponse de 37%) chez les patients atteints de cirrhose éthylique et, dans un second temps, a mis en évidence, chez ces patients non répondeurs à la vaccination, une augmentation de la fluidité membranaire profonde des monocytes.

Le but de notre étude est de préciser les conséquences fonctionnelles de cette altération de fluidité membranaire sur le comportement des monocytes ainsi que leurs implications dans les complications infectieuses et hémorragiques présentées par ces patients. Nous avons donc orienté l'exploration des monocytes par des tests fonctionnels *in vitro* dont les variations impliquent des modifications de la fluidité membranaire. Nous avons exploré un ensemble de patients atteints de cirrhose alcoolique sans connaître leur statut répondeur vis-à-vis du VHB et sans analyser en parallèle les paramètres de fluidité membranaire. En effet, le but de cette première étude était de savoir s'il existait, chez ces patients, des perturbations des fonctions monocytaires qui impliquaient la fluidité membranaire.

Le choix d'explorer les cellules monocytaires repose sur leur rôle prépondérant dans la défense anti-infectieuse, de par son rôle bactériostatique et bactéricide vis-à-vis des germes intracellulaires, et dans la réponse immunitaire, de par son rôle de cellule présentatrice de l'antigène. En effet, de nombreuses cellules présentatrices de l'antigène disséminées dans tout l'organisme ont une origine macrophagique, cellules de Langerhans dans la peau, cellules interdigitées dans le thymus, cellules réticulaires dans la rate, cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques. Elles participent au processus de coopération cellulaire avec les lymphocytes T en présentant l'antigène en association avec les molécules du CMH de classe II et au phénomène de "processing" antigénique par protéolyse intralysosomale de l'antigène endocyté. Les monocytes/macrophages possèdent également un rôle d'épuration de l'organisme et de modulation de l'hémostase, en synthétisant des facteurs de la coagulation (facteurs II, V, VII, IX, X) et du facteur tissulaire. L'altération de ces fonctions, *via* des anomalies de fluidité membranaire,

peut donc entraîner des déficits impliqués dans la survenue de complications infectieuses et hémorragiques.

Les tests utilisés représentent une approche fonctionnelle indirecte d'étude de la fluidité membranaire et les raisons de leur choix ont été largement commentées dans la partie "Matériels et Méthodes".

Notre étude a permis d'explorer le chimiotactisme, l'expression quantitative des récepteurs d'adhérence et l'asymétrie membranaire des monocytes de 23 patients, âgés de 36 à 71 ans, sexe-ratio de 14/9, présentant une cirrhose alcoolique, de stades essentiellement B et C de Child et Pugh.

**L'analyse du chimiotactisme des monocytes** vis-à-vis du ZAS et du fMLP montre une diminution non statistiquement significative des paramètres chimiotactiques (différentielle et index chimiotactiques) des patients par rapport aux sujets témoins (*tableau n° III-3-3*). Le faible échantillonnage explique probablement l'absence de différence statistique. Aucune différence de chimiotactisme n'est notée pour les patients en fonction de leur susceptibilité à présenter des complications infectieuses (*tableau n°III-3-4*) ou hémorragiques (*tableau n°III-3-5*). Une diminution du chimiotactisme des PNN et des monocytes a été rapportée depuis longtemps dans la littérature (Blanchard M, 1989; Blusse van Oud A, 1985; Feliu E, 1977; Holdstock G, 1982; Rajkovic IA, 1984; Van Epps DE, 1975). Le chimiotactisme des monocytes est un phénomène impliquant à la fois des facteurs sériques et des récepteurs cellulaires. Parmi les facteurs sériques, on trouve les facteurs chimiotactiques (peptides N-formylés provenant de bactéries, C5a provenant de l'activation du complément, le leucotriène B<sub>4</sub>, le PAF ou les chimiokines  $\beta$  de type C-C comme la MIP-1). Les récepteurs cellulaires impliqués appartiennent à la famille des serpentes (nommées ainsi du fait de leur structure moléculaire qui "serpente" à travers la membrane cellulaire grâce à 7 domaines transmembranaires et qui sont couplés à des protéines G liant le GDP). La liaison d'un agent chimiotactique à son récepteur entraîne l'échange de ce GDP en GTP et la protéine G ainsi activée, active à son tour des mécanismes de transduction conduisant, *via* une mobilisation du calcium ionisé, à la mobilisation des granules intracellulaires et au chimiotactisme par réorganisation du cytosquelette nécessaire à la mobilité cellulaire. De nombreux auteurs ont rapporté, chez les patients atteints de cirrhose alcoolique, la présence

d'une anomalie sérique, soit la présence d'un inhibiteur sérique (Blusse van Oud A, 1985; Feliu E, 1977; Rajkovic IA, 1984; Van Epps DE, 1975), soit la diminution de facteurs chimiotactiques comme les facteurs complémentaires (CH50, C3, C4), par défaut de synthèse ou par consommation exagérée (Blanchard M, 1989). La nature du facteur inhibiteur n'a jamais été clairement identifiée, et de nombreux candidats sont possibles : antiprotéases ( $\alpha_1$  anti-trypsine), le "lymphocyte inhibitor factor" (LIF), le "neutrophil inhibitor factor" (NIF), protéoglycanes (héparine, acide hyaluronique), cytokines (IL-1, G-CSF). Ces anomalies expliqueraient la faible concentration des PNN dans l'ascite ou dans les poumons et par conséquent la fréquence des infections dans ces topographies.

Cependant, les tests utilisés dans notre étude explorent la fonctionnalité des monocytes en dehors de leur environnement sérique puisqu'ils sont isolés par des procédures incluant de nombreux lavages et les monocytes ainsi isolés sont mis en suspension dans du PBS. Les monocytes de patients et de témoins sont incubés en présence des facteurs chimiotactiques expérimentaux (fMLP et ZAS) selon un protocole opératoire strictement identique et standardisé. Dans ces conditions, la diminution de chimiotactisme observée pour nos patients ne peut être attribuée à une anomalie des facteurs sériques, mais plutôt à un dysfonctionnement des monocytes. Or, nous avons vu que le chimiotactisme dépendait également du bon fonctionnement des récepteurs aux facteurs chimiotactiques, eux-mêmes sensibles aux variations de fluidité membranaire (Yuli I, 1982; Tomonaga A, 1983). En effet, ces auteurs ont montré que des agents modulateurs de la fluidité membranaire comme des alcools aliphatiques (butanol, propanol) incubés à des doses faibles non toxiques en présence de PNN entraînent une augmentation de la fluidité membranaire associée à une augmentation (d'un facteur 1,5) de l'expression du nombre des récepteurs au fMLP ainsi qu'une augmentation de leur affinité (d'un facteur 10) sans en altérer leur spécificité. Ainsi, une fluidité membranaire accrue favoriserait la transduction des signaux *via* le récepteur au fMLP.

Or, dans la précédente étude (thèse H Barraud, 2000), il a été démontré que les monocytes de patients atteints de cirrhose alcoolique présentaient une augmentation de la fluidité profonde membranaire. Il se pourrait que cette variation de fluidité influence le comportement des récepteurs protéiques dans le sens où l'augmentation de fluidité membranaire profonde favorise un enfoncement des protéines au sein de la bicouche lipidique, aboutissant à leur moindre accessibilité

(Shinitzky M, 1984). Dans ces conditions, cet effet de la fluidité membranaire sur la disponibilité des récepteurs au fMLP pourrait être impliqué dans la diminution du chimiotactisme des patients. Une étude complémentaire incluant un nombre plus élevé de patients et associant l'étude de la fluidité membranaire des monocytes semble intéressante pour poursuivre ce travail.

**La quantification des récepteurs d'adhérence à la surface des monocytes** a montré, à l'état basal, une augmentation de l'expression des  $\beta_2$  intégrines associée à une diminution de celle de CD62L des patients par rapport aux témoins, puis après stimulation des monocytes, une diminution statistiquement significative du ratio d'activation pour les chaînes des intégrines CD11b et CD18 sans différence statistique pour la sélectine CD62L (*tableau n°III-3-3*).

L'analyse quantitative de ces récepteurs à l'état basal montre, pour les témoins, des niveaux d'expression beaucoup plus élevés pour les monocytes que pour les PNN (*tableau n°III-3-7*) avec des écart-types importants. Par ailleurs, les valeurs trouvées diffèrent de celles trouvées par Bikoue et al. (1996) à la surface des monocytes (*tableau n°III-3-7*). Ces données renvoient à des commentaires d'ordre méthodologique, abordés lors de la première étude et détaillés lors de la cinquième étude. Les différences trouvées sont liées à des différences de procédure opératoire lors du protocole d'immunomarquage : technique directe ou indirecte, site épitopique de fixation de l'anticorps, rapport fluorescence/protéine de l'anticorps. Bikoue et al. (1996) utilisent une procédure d'immunofluorescence indirecte (trousse de quantification QIFIKIT, Dako) avec des anticorps provenant de Biosys alors que nous avons utilisé, dans ce travail, une procédure d'immunofluorescence directe (trousse de quantification Quantum Simply Cellular) avec des anticorps de source commerciale Beckman Coulter. De plus, les protocoles d'immunomarquage sont différents avec une température d'incubation à 4°C et une fixation au paraformaldéhyde à 1% pour Bikoue et al. et une incubation à température ambiante et l'absence de fixation pour notre étude. Ces données illustrent parfaitement la nécessité d'un protocole méthodologique de quantification standardisé pour assurer la reproductibilité des mesures multicentriques.

|       | PNN           |                     | Monocytes       |                     |
|-------|---------------|---------------------|-----------------|---------------------|
|       | Nos résultats | Bikoue et al (1996) | Nos résultats   | Bikoue et al (1996) |
| CD62L | 38,50 ± 17,30 | NR                  | 88,70 ± 38,70   | NR                  |
| CD11b | 36,50 ± 10,40 | 45 ± 20             | 149,40 ± 63,27  | 52 ± 18             |
| CD18  | 23,00 ± 8,80  | 49 ± 15             | 215,16 ± 116,17 | 93 ± 19             |

Tableau n°III-3-7 : Comparaison de l'expression quantitative des récepteurs d'adhérence pour les PNN et les monocytes. Résultats exprimés en  $\times 10^3$  CLA/cellule. (NR : non réalisé).

La comparaison de l'expression des récepteurs d'adhérence à l'état basal, montre une augmentation statistiquement significative de CD11b/CD18 associée à une diminution de CD62L à la surface des monocytes de sujets cirrhotiques par rapport aux témoins. Ces résultats sont en faveur d'un état d'activation des monocytes circulants. Aucune étude n'a, à notre connaissance, exploré les récepteurs d'adhérence à la surface des monocytes dans ce cadre pathologique. Cependant, les données de la littérature montrent que la pathogenèse de l'hépatite puis de la cirrhose alcoolique serait liée à un processus inflammatoire en réponse à l'alcool et/ou à ses métabolites (Adams DH, 1994). Taieb et al. (2000) rapportent une activation des PNN avec une augmentation de CD11b/CD18 associée à une diminution de CD62L ainsi que l'élévation de leur capacité à synthétiser des cytokines inflammatoires (IL-8 et  $TNF\alpha$ ). Adams et al. (1994) montrent une activation des cellules endothéliales, *via* une élévation de la concentration sérique de E-sélectine. Cette sélectine est exprimée par les cellules endothéliales et devient sérique après un clivage protéolytique. Il a été également rapporté une augmentation de l'expression de CD11b/CD18, LFA-3 (CD58) et ICAM-1 à la surface des lymphocytes (Luna-Casado L, 1997; Haydon G, 2002). Nos résultats trouvés pour les monocytes sont donc cohérents avec ceux de la littérature rapportés pour les autres cellules de la réponse immunitaire et confortent la présence d'une réaction inflammatoire dans la pathologie alcoolique hépatique. Cette réaction inflammatoire serait liée initialement à une augmentation de l'endotoxémie du fait de la réduction de la clairance hépatique Kuppérienne et d'une augmentation de la perméabilité intestinale sous l'effet de l'alcool. Ces endotoxines (essentiellement le LPS) agissent conjointement avec l'acétaldéhyde, les produits de la peroxydation lipidique, et les cytokines inflammatoires pour activer les cellules de Kupffer. L'activation de ces

monocytes/macrophages (cellules de Kupffer) entraîne leur hypersécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le  $\text{TNF}\alpha$  en réponse au LPS ou l'IL-8 (McClain CJ, 2002). Ces cytokines sont des inducteurs actifs de la réponse inflammatoire hépatique. Le  $\text{TNF}\alpha$  accroît l'expression des  $\beta_2$  intégrines à la surface des leucocytes et l'IL-8 exerce un puissant pouvoir chimotactique sur les PNN. Dans ce contexte inflammatoire, les récepteurs d'adhérence semblent donc jouer un rôle important dans l'inflammation du tissu hépatique en favorisant le recrutement des cellules inflammatoires ainsi que leur migration trans-endothéliale vers le parenchyme hépatique expliquant l'infiltration par le PNN lors de la phase aiguë de l'hépatite alcoolique puis du lymphocyte lors de la phase tardive (Haydon G, 2002; Jaeschke H, 2002). La nature de ces récepteurs d'adhérence pourrait varier en fonction de l'évolution de la maladie et la connaissance plus précise de ces voies d'activation pourrait aboutir à l'utilisation de thérapeutiques bloquant ces récepteurs d'adhérence (Adams DH, 1994).

La stimulation des monocytes par le ZAS entraîne, pour les témoins comme pour les patients, une diminution de l'expression de CD62L associée à une augmentation de celle de CD11b/CD18. Cependant, le ratio d'activation de CD11b/CD18 est statistiquement diminué pour les patients par rapport aux témoins, alors qu'aucune différence significative n'est notée pour le ratio de CD62L. Cette moindre réactivité des monocytes des patients par rapport aux témoins peut avoir plusieurs explications. D'une part, la présence d'une "préactivation" des PNN circulants chez le cirrhotique alcoolique diminue leur potentiel de réactivité lors de leur stimulation par des agonistes comme le ZAS. D'autre part, nous avons vu que le comportement de ces récepteurs glycoprotéiques, comme leur capacité de translation (Klausner RD, 1980), leur conformation (Diamond MS, 1994 ; Kakimoto H, 1995), leur accessibilité (Gimpl G, 1997 ; Bastiaanse EM, 1997) et leur affinité de liaison (Heron D, 1980 ; Dave JR, 1986 ; Peterson SW, 1992) pouvait être influencé par des variations de fluidité membranaire. La bonne fonctionnalité de ces récepteurs dépend d'un équilibre stable du paramètre fluidité membranaire. Or, ce facteur est lui-même influencé par, d'une part la consommation chronique d'alcool et, d'autre part le dysfonctionnement hépatique, qui sont tous deux à l'origine de la cirrhose hépatique. Dans un premier temps, la prise d'alcool induit une solubilisation de l'alcool dans les membranes avec, comme conséquence, une augmentation de la fluidité (La Droitte P, 1984). Puis, lors de l'absorption chronique, la présence

continue d'alcool dans les membranes modifie le métabolisme cellulaire, et par contrecoup, la composition lipidique membranaire, avec une moins bonne dissolution de l'alcool dans les membranes et, par conséquent, une fluidification moindre. La maladie hépatique influence également ce paramètre fluidité membranaire : il a été rapporté une diminution de la fluidité, une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides et du ratio acides gras saturés/ insaturés (Benedetti A, 1987; Owen J, 1982), cette rigidification évoluant avec la progression de la maladie hépatique. Les modifications de la fluidité membranaire observées chez les patients atteints de cirrhose éthylique sont probablement en rapport avec les perturbations du métabolisme des lipides, des lipoprotéines plasmatiques et la diminution de la LCAT (lécithine cholestérol acyl transférase), dont la synthèse et la libération sont diminuées du fait de l'atteinte hépatique. L'action combinée de l'alcool et de la progression de la maladie hépatique aboutissant au stade maximum d'insuffisance hépatique lors de l'installation de la cirrhose ont pour conséquence une diminution globale de la fluidité membranaire. Ceci peut altérer le comportement des récepteurs glycoprotéiques impliqués dans la transduction du signal et expliquer la moindre réactivité *in vitro* des monocytes des sujets cirrhotiques alcooliques.

L'analyse des résultats, en fonction de la susceptibilité des patients à présenter des complications, montre une augmentation significative de l'expression de CD11b/CD18 associée à une diminution de CD62L chez les patients ayant présenté une/des complication(s) infectieuse(s) par rapport à ceux sans infection (*tableau n°III-3-4*). Aucune différence n'est par contre notée en fonction de la survenue de complications hémorragiques (*tableau n°III-3-5*). Ces données sont cohérentes avec les données de la littérature qui ont largement montré que l'augmentation de l'expression de CD11b leucocytaire représentait un marqueur précoce et sensible de survenue d'un état septique (Arnaout A, 1990; Lin RY, 1993 et 1994; Maekawa K, 1998; Russwurm S, 2002) (cf. chapitre III-5). D'ailleurs, le contraste entre la faible symptomatologie des infections survenant chez ces patients, consistant souvent, pour l'infection du liquide d'ascite, en des symptômes peu spécifiques limités à une altération de l'état général ou une diarrhée, et la gravité des complications infectieuses, souligne l'intérêt de disposer d'un marqueur infectieux sensible. La quantification de l'expression de CD11b à la surface des leucocytes selon un protocole standardisé pourrait être proposé comme un marqueur de surveillance systématique dans l'évolution de cette maladie (cf. chapitre III-5).

***L'analyse de l'expression des phospholipides anioniques à la surface des monocytes par la fixation d'annexine V*** montre, à l'état basal, une augmentation significative de l'expression des phospholipides anioniques pour les sujets cirrhotiques par rapport aux sujets témoins. Cette différence est cohérente avec celle trouvée pour les récepteurs d'adhérence, et est en faveur d'un état d'activation des monocytes des sujets cirrhotiques du fait d'une réaction inflammatoire systémique rapportée dans la pathologie alcoolique hépatique. Après stimulation des monocytes par le ZAS, il est noté une diminution significative du ratio d'activation chez les patients cirrhotiques par rapport aux témoins, ce qui témoigne, pour les monocytes de ces patients, d'une mauvaise régulation *in vitro* de l'exposition des phospholipides anioniques (*tableau n°III-3-3*). Aucune différence n'est par contre notée chez les patients en fonction de leur susceptibilité à présenter des complications infectieuses (*tableau n°III-3-4*) ou hémorragiques (*tableau n°III-3-5*).

Cette asymétrie physiologique des phospholipides membranaires résulte d'un équilibre dynamique entre les deux feuillettes, phénomène régulé par l'action combinée de trois transporteurs, l'amino-phospholipide translocase, une floppase et une scramblase, tous trois agissant selon la concentration cytoplasmique en  $Ca^{2+}$ . Dans notre travail, les monocytes de patients cirrhotiques présentent un défaut d'exposition des phospholipides anioniques après stimulation par le ZAS. Cette étude, est, à notre connaissance, la première à avoir mis en évidence une anomalie d'exposition des phospholipides anioniques à la surface des monocytes de sujets atteints de cirrhose alcoolique.

La problématique est double :

- Comment expliquer cette anomalie de régulation?
- Quelles en sont les conséquences biochimiques et cliniques?

Cette anomalie de régulation de l'exposition des phospholipides anioniques après stimulation cellulaire suppose une anomalie de fonctionnalité des transporteurs impliqués, *via* une anomalie structurelle ou fonctionnelle ou bien encore de leur régulation. Ces transporteurs sont des protéines insérées dans la bicouche lipidique (*figure n°III-3-4*). Tout comme les récepteurs d'adhérence, leur comportement ou celui de leurs protéines régulatrices peuvent être altérés par des variations de fluidité



membranaire superficielle et/ou profonde (Noble JM, 1999). Des études parallèles de la fluidité et de l'exposition des phospholipides anioniques chez ces sujets sont nécessaires pour rechercher une éventuelle corrélation entre ces deux paramètres.

Ce défaut d'exposition des phospholipides anioniques après stimulation cellulaire a des conséquences physiopathologiques essentiellement de deux types (Beveris EM, 1998a et b).

Cette anomalie entraîne, en premier lieu, un défaut d'apoptose ou "mort programmée" des monocytes. En effet, l'exposition des phospholipides anioniques à la surface cellulaire représente un signal précoce et sensible d'apoptose, précédant même la fragmentation de l'ADN, et constituant un message de reconnaissance pour les macrophages aboutissant ainsi à leur élimination par le système réticulo-endothélial. Ce phénomène d'apoptose est physiologiquement programmé pour l'ensemble des cellules humaines et constitue un processus d'élimination cellulaire spontané, afin de réguler l'homéostasie cellulaire et tissulaire de façon opposée à la mitose. Durant tout le déroulement de l'apoptose, il est important de signaler que la membrane cellulaire reste intacte. Les phagocytes endocytent soit la cellule entière, soit des fragments de celle-ci mais restent toujours limités par une membrane. Cette intégrité membranaire et la rapidité d'élimination cellulaire, font que l'apoptose, même massive, n'induit aucune inflammation. Elle se distingue de la nécrose qui est une forme de mort cellulaire passive, déclenchée par une agression et qui aboutit à l'éclatement de la cellule qui déverse son contenu enzymatique au sein des tissus, suivi d'une réaction inflammatoire. L'apoptose prévient donc la lyse cellulaire et la survenue d'une inflammation tissulaire. Un excès d'apoptose des hépatocytes a été largement décrit dans la maladie hépatique alcoolique (Cardin R, 2002; Casey CA, 2001; Higuchi H, 1996; Nanji AA, 1998; Natori S, 2001; Rust C, 2000; Takahashi T, 2000; Ziol M, 2001). Elle serait déclenchée, soit par la production de dérivés oxygénés induite par l'absorption d'alcool, *via* l'activation du cytochrome P450 mitochondrial, soit *via* l'activation du récepteur CD95 (Fas-ligand) (Minana JB, 2002). Elle expliquerait la destruction progressive du tissu hépatique. Les bases moléculaires restent encore peu élucidées et des études sur les mécanismes régulateurs sont en cours. Il a été récemment montré, par exemple, que l'IL-6 inhibait l'apoptose induite par l'alcool en stimulant des molécules à effets antiapoptotiques comme Bcl2 et Bcl-xL (Hong F, 2002). L'effet inhibiteur de ces protéines

membranaires s'exercerait en contrôlant, d'une part, l'ouverture des mégacanaux et la fuite des produits tels que le cytochrome c, et d'autre part, en piégeant le complexe APAF-1/caspase 9 sur la paroi mitochondriale, empêchant l'activation de la protéase.

Notre étude a mis en évidence un défaut d'exposition des phospholipides anioniques des monocytes pouvant conduire à un défaut d'apoptose. Dans ces conditions, ce défaut d'apoptose empêcherait l'élimination des monocytes, ce qui contribuerait à l'entretien et l'amplification de la réponse inflammatoire observée dans l'hépatite alcoolique et conduisant au remodelage fibrotique de la cirrhose. Ce défaut d'apoptose montré ici pour les monocytes, pourrait atteindre également d'autres cellules de la réponse inflammatoire comme le PNN ou le lymphocyte et expliquer l'infiltration du tissu hépatique par ces cellules lors de la maladie alcoolique. La perte de l'homéostasie cellulaire pourrait jouer alors un rôle déterminant dans le développement et la persistance de l'inflammation et l'évolution vers la fibrose. Ces premières données, à notre connaissance jamais rapportées dans la littérature, méritent d'être complétées par l'étude de l'exposition des phospholipides anioniques des autres cellules inflammatoires ainsi que par l'exploration des molécules impliquées dans les différentes phases d'initiation, d'exécution et de dégradation protéolytique et nucléaire de l'apoptose comme le Fas-ligand, les membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bad) ou bien les caspases, protéases impliquées dans la dégradation de l'ADN.

En second lieu, ce défaut d'exposition des phospholipides anioniques expose à une diminution de l'activité procoagulante de la surface cellulaire des monocytes. En effet, cette activité procoagulante, initialement décrite pour les plaquettes, existe également, bien que de façon moins prononcée, à la surface des monocytes (Tracy PB, 1985 & 1988). Les phospholipides anioniques, principalement la phosphatidylsérine, sont nécessaires à l'assemblage des complexes enzymatiques caractéristiques du système de la coagulation. Une fois exposés à la surface de la plaquette activée et de celle des microparticules qui s'en détachent, les phospholipides procoagulants complexent les facteurs vitamine K-dépendants VII, IX, X, II par l'intermédiaire de leurs radicaux  $\gamma$ -carboxyglutamiques, ainsi que les cofacteurs VIIa et Va. Il s'en suit une réponse rapide du système, car autoamplifiée par la thrombine, enzyme ultime de la cascade. Une séquestration de ces phospholipides anioniques procoagulants dans le feuillet interne aboutit donc à une

insuffisance de production de la thrombine, qui ne peut assurer une hémostase normale. La conséquence pathologique de cette situation est donc la survenue d'hémorragies. Cette pathologie a été caractérisée et nommée, du nom de la première famille atteinte, par "Scott syndrome". Les sujets atteints ne présentent aucune activité procoagulante et des épisodes hémorragiques graves alors que les parents, hétérozygotes, possèdent une activité intermédiaire et ne présentent aucune complication hémorragique (Toti F, 1996). Notre hypothèse était que ce défaut d'exposition de phospholipides anioniques, observé pour les monocytes, pouvait contribuer à la survenue des complications hémorragiques survenant chez le sujet cirrhotique alcoolique. Cependant, dans notre étude, aucune différence de fixation d'annexine V n'a été mise en évidence chez les sujets en fonction de leur susceptibilité à présenter des complications hémorragiques (*tableau n°III-3-5*). Le TQ et la numération plaquettaire ne semblent pas influencer également la survenue d'hémorragie, bien que notre effectif d'étude soit faible (*tableau n°III-3-6*). Ces données semblent en cohérence avec la réalité clinique puisque l'hémorragie du cirrhotique est essentiellement représentée par l'hémorragie digestive haute consécutive à la rupture de varices oesophagiennes et/ou gastriques. Le risque de saignement est corrélé à la persistance d'une intoxication alcoolique active, au score de Child-Pugh, et surtout à la taille des varices oesophagiennes et à la pression portale. La cause de ces hémorragies semble donc être d'ordre mécanique et non liée directement à une anomalie cellulaire. Dans ces conditions, il ne nous semble donc pas opportun d'étudier l'exposition des phospholipides anioniques à la surface des plaquettes dans ce cadre pathologique.

En conclusion, cette étude des monocytes de sujets atteints de cirrhose alcoolique a permis de mettre en évidence une anomalie de réactivité de ces cellules, tant au niveau de l'expression des récepteurs d'adhérence qu'au niveau de l'exposition de phospholipides anioniques. Ces données, jamais rapportées à notre connaissance dans la littérature, ouvrent des nouvelles voies explicatives de cette maladie à la pathogénie encore peu connue. Corrélation de ces anomalies avec des variations de fluidité membranaire, étude de l'apoptose des cellules inflammatoires semblent des études perspectives intéressantes.

## Chapitre III-4

**QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE  
DU PNN : UN MODELE D'ETUDE *IN VITRO* DE L'EFFET  
DES HEMOGLOBINES DE SYNTHESE SUR LES PNN**

## CHAPITRE III-4

### QUANTIFICATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE DU PNN: UN MODELE D'ETUDE *IN VITRO* DE L'EFFET DES HEMOGLOBINES DE SYNTHESE SUR LES PNN

TOUSSAINT M, **LATGER-CANNARD V**, CARON A, LECOMPTE T, STOLTZ JF, VIGNERON C, MENU P.

Effect of three hemoglobin-based oxygen-carrying solutions on neutrophil activation *in vitro* : quantitative measurement of the expression of adherence receptors.

Transfusion, 2001, 41: 226-231.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la thématique, menée par le professeur Vigneron C et Mr Menu P, concernant l'évaluation, *in vitro* puis *in vivo*, des substituts d'hémoglobines, afin de remplacer à plus ou moins long terme, l'utilisation de produits sanguins dont on connaît les limites en terme d'incompatibilité, de risque infectieux et de risque de pénurie (Nucci M, 1998).

Ce chapitre n'a pas pour dessein de présenter les substituts d'hémoglobine (thématique de thèse de Toussaint M.), mais de montrer que la quantification de l'expression des récepteurs d'adhérence pouvait représenter un outil simple d'utilisation et reproductible, de l'étude de l'activation leucocytaire.

Le but de ce travail est d'évaluer l'effet de transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobines modifiées sur le comportement *in vitro* des PNN et en particulier sur leur état d'activation. Or, nous avons précédemment montré que le niveau d'expression des récepteurs d'adhérence leucocytaires était directement fonction de leur état d'activation. Nous avons donc utilisé l'outil développé dans ce mémoire et représenté par la quantification de l'expression antigénique par cytométrie en flux, pour mesurer ces variations d'activation cellulaire.

Du sang total provenant de sujets sains a été incubé, à température physiologique (37°C), en présence de trois hémoglobines modifiées, à savoir l'Hb-Dex-BTC (Hémoglobine dextran-benzène-tétracarboxylate), l' $\alpha\alpha$ -Hb et une hémoglobine polymérisée, la o-raffinose-poly-Hb, durant 60 min. L'expression quantitative des récepteurs d'adhérence CD62L et CD11b/CD18 a été mesurée à 15,

30 et 60 min. L'effet de ces hémoglobines modifiées a été comparé à celui de d'hémoglobine libre purifiée, des diluants de ces hémoglobines modifiées (saccharose et solution de Ringer) et de solution d'expansion volumique habituellement utilisée en clinique pour maintenir une tension convenable en attendant la perfusion des produits sanguins (solution d'Elohes). Le contrôle positif est représenté par le  $TNF\alpha$ , agoniste fort de l'activation des PNN.

Aucune variation statistiquement significative n'a été notée dans l'expression quantitative des récepteurs d'adhérence à la surface des PNN, pour les trois hémoglobines modifiées testées, par rapport aux différents contrôles négatifs. Ces résultats semblent en faveur de l'absence d'activation *in vitro* des PNN par les hémoglobines modifiées. Dans les conditions analytiques testées, l'effet oxydant de l'hémoglobine avec production de radicaux libres potentiellement activateurs des leucocytes n'est pas mis en évidence. Par ailleurs, ces expériences ne permettent pas de savoir si ces hémoglobines se fixent ou non à la surface des PNN.

En conclusion, ces résultats encourageants semblent favorables à l'utilisation clinique de ces substituts sanguins et devraient mener à des études *in vivo*, chez l'animal.

# Effects of three Hb-based oxygen-carrying solutions on neutrophil activation in vitro: quantitative measurement of the expression of adherence receptors

Marie Toussaint, Veronique Latger-Cannard, Alexis Caron, Thomas Lecompte, Jean-Francois Stoltz, Claude Vigneron, and Patrick Menu

**BACKGROUND:** Hb-based oxygen carriers (HbOCs) are currently under investigation as RBC substitutes. These solutions have vasoactive properties and may modify the behavior of the RBC in vitro. The effects of these agents on other blood cells have not been extensively investigated. The aim of this study was to evaluate the potential effect(s) of three differently modified HbOCs on the activation of PMNs.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** Whole blood from humans was incubated with Hb dextran-benzene-tetracarboxylate,  $\alpha\alpha$ -Hb, or o-raffinose-poly-Hb for 15, 30, and 60 minutes. The expression of adherence receptors CD62L, CD18, and CD11b, which reflects the activation state of the neutrophils, was assessed in vitro by a direct immunofluorescence method using calibration beads measured by flow cytometry.

**RESULTS:** The observed expression of each of the three adherence receptors for each solution at each time point was similar to that noted with the RPMI control. Decreases in CD62L and increases in CD18 expression were noted at 15 minutes of incubation but, when those values were compared to the values obtained with TNF $\alpha$  as the positive control of PMN activation, the profile of expression of adherence receptors obtained with HbOC solutions did not conform to the expected activation profile of PMNs.

**CONCLUSION:** Hb solutions modified by a variety of methods, as obtained and employed in this study, did not appear to activate neutrophils in vitro.

**H**emoglobin-based oxygen carriers (HbOCs) are a new class of compounds currently under investigation as RBC substitutes or oxygen-carrying plasma expanders. These HbOC solutions are prepared from purified cell-free Hb with subsequent chemical modification of the globin to increase their intravascular half-life and oxygen release properties. The chemical modifications used include polymerization, internal cross-linking, and conjugation.<sup>1</sup>

Understanding the impact of the different HbOCs on peripheral blood cells is desirable, as some HbOCs are undergoing Phase III clinical trials and may shortly become therapeutic agents for use in humans. Previous studies have shown that Hb solutions produced some in vitro modifications in RBC behavior, including changes in aggregation tendency.<sup>2,3</sup> However, the influence of Hb solutions on WBC activation and behavior has not been extensively investigated, although in vitro studies have shown that cell-free Hb stimulates MNCs, leading to the release of IL-6, IL-8, and TNF $\alpha$  and to an increase in their procoagulant activity.<sup>4,5</sup>

The first aim of this work was to evaluate by quantitative flow cytometry the potential effect(s) of different HbOCs on the expression of adherence receptors (CD62L, CD11b, CD18) on neutrophils (PMNs), because quantitative expression varies as a function of the WBC activation state.<sup>6</sup>

**ABBREVIATIONS:** Hb-Dex-BTC = Hb dextran-benzene-tetracarboxylate; HbOC(s) = Hb-based oxygen carrier(s); HES = hydroxyethyl starch.

From the Department of Hematology and Physiology, Faculty of Pharmacy; the Hematology Laboratory, Brabois University Hospital Center; and the Angiohematology Laboratory, Faculty of Medicine, Nancy, France.

*Address reprint requests to:* Marie Toussaint, Pharm D, PhD, Laboratoire d'Hematologie et Physiologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Nancy I, 54001 Nancy Cedex, France; e-mail: marie.toussaint@pharma.u-nancy.fr.

Received for publication January 10, 2000; revision received June 18, 2000, and accepted June 20, 2000.

TRANSFUSION 2001;41:226-231.

The expression profile of activation was determined with a positive control using TNF $\alpha$ , known to enhance PMN activation.<sup>7</sup> For comparative purposes, we also performed similar determinations on Ringer's lactate and saccharose solutions, which are used in the preparation of the different HbOCs tested, and on hydroxyethyl starch (HES), because it is in extensive clinical use as a plasma expander. Second, with the aim of determining the nature of the chemical modification of the globin moiety and the consequent molecular size, we compared the expression of adherence receptors in PMNs in the presence of three different HbOCs.

## MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the institutional review board of the Brabois University Hospital Center (Nancy, France).

PMNs were obtained from the whole blood of nine healthy adult volunteers who gave informed consent to their participation in the study. The volunteers were chosen with respect to two criteria: they were not undergoing a medical treatment except estrogen-progesterone combination, and they did not have any inflammatory syndrome. Venous blood was drawn by venipuncture into sterile plastic tubes containing 1 mg per mL of K<sub>3</sub> EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

### Solutions

**Reference solution.** Sterile medium (RPMI 1640) without phenol red, without glutamine, and with NaHCO<sub>3</sub> (endotoxin level <0.1 ng/mL; pH = 7.3) was purchased (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). This solution was used to preserve the cells during the experiments.

**Control solutions.** TNF $\alpha$  was also purchased (Sigma-Aldrich). It was used as positive control of PMN activation<sup>7,8</sup> at a concentration of 100 UI per mL. Ringer's lactate solution was purchased (Bieffe Medital, Sobinanigo, Spain). Saccharose solution (50 g/L) prepared in sodium chloride solution (0.45%) was obtained from Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins (Marcyl'Etoile, France). Because HbOCs were suspended in Ringer's lactate or saccharose, these solutions were used as controls to test their effects on PMNs and to allow comparison between the different HbOCs. HES was purchased (Elohes 6%, Fresenius France Pharma, Louvier, France). HES is a polysaccharide plasma-volume expander with an average molecular weight of 200 kDa.<sup>9</sup> Purified cell-free human Hb (purified free Hb) (50 g/L) (Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins) consisting of a solution of native Hb was extracted from outdated RBCs as described previously.<sup>10</sup> This solution had the same purity as Hb dextran-benzene-carboxylate (Hb-Dex-BTC) solution (Table 1).

**HbOCs.** Three solutions of human Hb prepared according to various chemical modifications were studied.

First was Hb Dex-BTC, which was developed for pre-clinical studies and used as a model of Hb conjugated to macromolecules. It was prepared from stroma-free Hb ex-

**TABLE 1. The physical and chemical properties of the HbOCs\***

|                                | Purified free Hb | Hb-Dex-BTC | $\alpha\alpha$ -Hb | o-raffinose-poly-Hb |
|--------------------------------|------------------|------------|--------------------|---------------------|
| Hb concentration (g/dL)        | 7.9              | 8.5        | 8.2                | 10.0                |
| Diluted solution               | Tyrode           | Saccharose | Ringer's lactate   | Ringer's lactate    |
| Average molecular weight (kDa) | 64               | 200        | 64                 | 128                 |
| P <sub>50</sub> † (torr)       | 19               | 23         | 29.5               | 34                  |
| pH                             | 7.4              | 7.2        | 7.5                | 7.3                 |
| Endotoxins (UE/mL)             | <0.5             | <0.5       | 0.25               | <0.06               |

\* Data are provided by the manufacturers of the different solutions.  
† Oxygen half-saturation pressure of Hb measured at 37°C.

tracted from outdated human RBCs by hemolysis, which was followed by centrifugation and microfiltration to remove membrane particles. The stroma-free Hb was then purified by chromatography, pasteurized, and conjugated with Dex-BTC and suspended in a solution of NaCl with saccharose (50 g/L). It was frozen at -20°C until its use.<sup>11</sup> The level of group A substances in the solution used is <0.78  $\mu$ g per mL and that of group B substances is <0.31  $\mu$ g per mL. The other characteristics were given in Table 1. Hb Dex-BTC was obtained from Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins.

Second is the  $\alpha\alpha$ -Hb solution, which is not clinical grade, but is described as identical to the diaspirin cross-linked Hb (DCLHb, Baxter Corp., Deerfield, IL) that has been tested in Phase III clinical trials.<sup>12</sup> The  $\alpha\alpha$ -Hb was prepared from outdated human RBCs.<sup>13</sup> Stroma-free Hb was extracted from RBCs by lysing with hypertonic salt solution, which was followed by centrifugation and filtration to eliminate the membrane particles. The  $\alpha$ -subunits of tetramer were intramolecularly crosslinked at the  $\alpha$ -99 lysine residues through the reaction of deoxyhemoglobin with bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate. The product was purified by a heat-treatment process, concentrated to 8.2 g per dL, and diafiltered into Ringer's lactate solution. It was frozen at -80°C until its use. The level of phospholipids of the solution used is 1.0  $\mu$ g per mL, and that of free iron is  $3.01 \times 10^{-5}$  mol of Fe per mol of heme. The other data concerning the purity of the solution were given in Table 1. The  $\alpha\alpha$ -Hb was a gift from Abdu Alayash, PhD (Center for Biologics Evaluation and Research, FDA, Bethesda, MD).

Third is o-raffinose-poly-Hb (Hemolink, Hemosol, Toronto, ON, Canada), currently in development, which is in Phase III clinical trials.<sup>14</sup> It was prepared from human stroma-free Hb extracted from outdated RBCs by hemolysis, which was followed by centrifugation and microfiltration to eliminate the membrane particles and then by pasteurization. Thus, the purified stroma-free Hb was polymerized and internally cross-linked with o-raffinose and suspended in Ringer's lactate solution. It was frozen at -80°C until its use.<sup>15</sup> The physical and chemical characteristics



were given in Table 1. O-raffinose-poly-Hb was a gift, provided by Hemosol.

Although all materials were not clinical grade, the solutions used in this study were highly purified, and, consequently, their activation patterns should be similar to those of the solutions with clinical grade as far as impurities and stroma residue content.

### Antibodies

Mouse MoAbs against human L-selectin (CD62L) and against human  $\beta_2$ -integrin CD18 conjugated with a fluorochrome FITC and mouse MoAb against human  $\beta_2$ -integrin CD11b (C3bi receptor) conjugated with PE were purchased (Dako, Trappes, France). For isotypic control, mouse IgG conjugated with FITC and mouse IgG conjugated with PE (Dako) were used. Calibration beads were obtained from the manufacturer (Quantum Simply Cellular, Flow Cytometry Standards Corp., San Juan, PR).

### Suspension preparation

Immediately after collection, 2 mL of human venous blood collected in EDTA was mixed with the solutions described above (saccharose solution, Ringer's lactate solution, purified free Hb solution, Hb-Dex-BTC,  $\alpha\alpha$ -Hb, or o-raffinose-poly-Hb), all diluted in RPMI medium to obtain a final Hb concentration of 16 g per L. This value corresponds to the plasma Hb concentration after volemic compensation of one-fifth of the total blood volume by an 80 g per L HbOC solution. This Hb concentration in the plasma simulates that observed in clinical situations of hemodilution, such as cardiopulmonary bypass or resuscitation from hypovolemic shock. So that the data may be comparable, all solutions were tested on the same blood sample for each experiment.

The reference solution was prepared with 2 mL of whole blood and RPMI. The positive control of PMN activation was prepared with 2 mL of whole blood mixed with TNF $\alpha$  at a concentration of 100 UI per mL.

These suspensions were incubated at 37°C in closed polypropylene tubes under gentle stirring (with a three-dimensional agitator) for 15, 30, or 60 minutes. After incubation, 1 mL of each solution was collected in a polypropylene tube, washed with 4 mL of cell wash solution, and centrifuged at 450  $\times$  g for 5 minutes.

To check the capacity of PMNs for activation after incubation with Hb solutions, some experiments were performed with the protocol described above. However, after incubation, one part of the solution collected was incubated with TNF $\alpha$  (100 UI/mL) for 15 minutes at 37°C and then washed and stained; the other part was washed and then stained immediately after sampling.

### Direct immunofluorescence labeling and flow cytometric analysis

Quantification of cell surface antigens was performed according to the quantitative direct immunofluorescence

method using the calibration beads.<sup>16,17</sup> All MoAbs were applied under previously determined saturating conditions<sup>16</sup>: for each sample, 10  $\mu$ L of MoAb was added to 100  $\mu$ L of cell suspension (previously incubated with the test solutions), and the cells were stained by contact for 40 minutes at room temperature (20-22°C) in darkness. The RBCs were then lysed with ammonium chloride (Ortho-mune Lysing Reagent, Ortho Diagnostic System, Issy les Moulineaux, France) for 10 minutes in darkness. After two washes in 5 minutes, the remaining cells were suspended in 300  $\mu$ L of PBS solution. Calibration beads were incubated for 40 minutes in the same conditions as PMNs with 10  $\mu$ L of MoAb against CD62L, CD11b, and CD18. After washing, the beads were resuspended with 300  $\mu$ L of PBS solution and maintained in darkness until they were analyzed by flow cytometry. The time between cell preparations and analysis by flow cytometry did not exceed 30 minutes, to avoid artefactual activation.

Flow cytometric analysis was performed on 3000 cells using a flow cytometer (FACSCAN, Becton Dickinson) and software (PC Lysis, Becton Dickinson). Under saturating conditions, F(ab')<sub>2</sub> fragments of the antibodies bind to surface antigens through monovalent interactions; the number of antigenic sites per bead is proportional to the MFI measured.<sup>18</sup> Thus, for each sample, corrected MFI (i.e., specific MFI minus that of the negative control measured under the same conditions) could be converted to antibody-binding capacity per cell (i.e., the mean number of cell surface molecules recognized by antibodies per cell).

### WBC count

The absence of cell loss during washing was checked by performing a peripheral blood count by routine analyzer (H2-Technicon, Bayer) on three blood samples from three volunteers. The count was repeated three times for each blood sample. The blood samples were prepared under the same conditions as in the experiment but without antibodies. After lysis of the RBCs, the WBCs were washed, centrifuged, and then resuspended into 2 mL of a wash solution, and a peripheral blood count was performed again.

### Data analysis and statistics

All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. For each solution, values of adherence receptor expression on PMNs were compared at each time point by repeated-measures ANOVA. For each time point, differences of adherence marker expression in the solutions were analyzed by a one-way ANOVA, with post-test assessment done with the Bonferroni method. Statistical significance was assumed at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The variations of expression observed for each solution at each of the three time points were similar to those noted with the RPMI control for the three adherence receptors

studied ( $n = 9$ ). The receptor expression in the presence of both saccharose and Ringer's lactate solutions was identical to the expression measured with the reference solution (RPMI medium). As these solutions have the same effect on PMN receptor expression, chemically modified Hb diluted in these vehicles could be compared.

Neither the three HbOCs nor purified free Hb solution had any effect on PMN activation: adherence receptor expression on neutrophils was equivalent to that observed with the control RPMI (Fig. 1). Comparison between HbOCs and HES revealed no difference in the PMN activation state (Fig. 1).

For all solutions, after 15 minutes of incubation, a decrease in CD62L receptor ( $p < 0.05$ ) and an increase in CD18 receptor ( $p < 0.05$ ) expression were noted, whereas there was no variation for CD11b. After 30 minutes' incubation, CD62L and CD11b showed constant expression, whereas CD18 expression decreased to the baseline level ( $p < 0.05$ ). After 60 minutes of incubation, no further variations in the expression of CD62L, CD11b, and CD18 were noted.

The positive control ( $n = 5$ ), TNF $\alpha$ , induced at 15 minutes a decrease in CD62L ( $p < 0.0001$ ), an increase in CD11b ( $p < 0.0001$ ), and an increase in CD18 ( $p < 0.0001$ ). At 30 and 60 minutes, the values of expression of these adherence receptors were identical to those noted at 15 minutes (Fig. 1). The variations in adherence receptor expression induced by the positive control were significantly different from those measured with all test and reference solutions at each time point (Fig. 1). The expression of adherence receptor on PMNs incubated with all the various Hb solutions and then stimulated with TNF $\alpha$  is identical to the expression measured on PMNs incubated with TNF $\alpha$  only (data not shown).

We have checked the absence of significant cell loss during washing by taking a WBC count of three blood samples, whose results, expressed as mean  $\pm$  SE of the concentration of the PMNs ( $\times 10^9/L$ ), are  $1358.8 \pm 15.8$ ,  $1304.3 \pm 21.3$ , and  $1673.9 \pm 19.6$  versus  $1259.7 \pm 20.6$ ,  $1207.7 \pm 25.2$ , and  $1537.1 \pm 54.0$  before and after washing, respectively.

These results showed that the loss of cells induced by washing did not exceed 8 percent of the total of the WBCs.

## DISCUSSION

Some HbOCs have been observed to induce modifications of the in vitro rheologic behavior of RBCs, such as hyperaggregability.<sup>2,3</sup> To further characterize the action of these solutions on blood cells, it is therefore desirable to evaluate whether Hb solutions have an in vitro effect on WBCs, and particularly on neutrophils. Indeed, we hypothesized that the infusion of cell-free Hb into the bloodstream may lead to PMN activation: the presence of a high concentration of free Hb in the plasma, the high molecular weight of some of these solution components, and/or the various

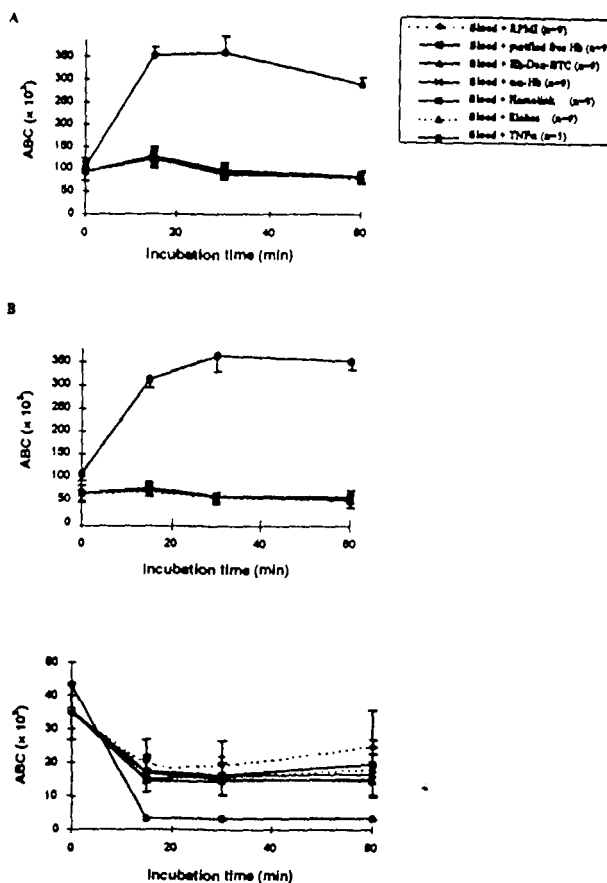


Fig. 1. Effect in vitro of the different solutions tested on the expression of adherence receptor CD18 (A), CD11b (B), and CD62L (C) by PMNs according to time ( $n = 9$  for all solutions except for TNF $\alpha$  [ $n = 5$ ]). These results are expressed as mean values  $\pm$  SEM. ABC = antibody-binding capacity.

chemical modifications to the Hb molecule are factors that could potentially activate WBCs.

To assess a potential activation of the PMNs in the presence of different HbOCs, we measured the expression of three adherence receptors: CD62L, a molecule of the selectin family, basically expressed on the cell surface and involved in the rolling step, whose expression decreases immediately when PMNs are activated<sup>8,19</sup>; and CD11b and CD18,  $\alpha$  and  $\beta$  chains of  $\beta_2$ -integrin molecules, that are involved in the firm adhesion, whose expression increases later with PMN activation.<sup>8,20</sup> CD11b/CD18 may be induced by oxidative stress. To assess these expression measures, we have chosen quantitative flow cytometry, which is an appropriate method of studying WBC function.<sup>6</sup> This method has the advantage of allowing a direct evaluation of the cellular response to the presence of Hb solutions, which has not yet been studied; previous studies on this subject used indirect methods, such as procoagulant activity measurement or quantification of cytokine release, to assess WBC activation.<sup>4,5,21</sup>

In this study, the Hb concentration used is higher than the concentrations used in previous studies<sup>4,5,21</sup>; it was chosen to mimic a concentration that is likely to be present in the plasma after hemodilution of one-fifth of the total blood volume (i.e., the concentration that may occur in clinical applications).

The diluted HbOC solutions were tested to check the lack of effect on the PMNs. The results were not different from those with the RPMI medium. Saccharose and Ringer's lactate did not induce activation of the PMNs. These results indicated that it is possible to compare all the Hb solutions tested in this study, regardless of the vehicle used. All Hb solutions exhibited an identical response and showed no difference from the control solution (RPMI medium).

The decrease in CD62L associated with an increase in CD18 ( $p < 0.05$ ) at 15 minutes with these solutions may represent an activation profile of PMNs. However, the activation profile induced by the positive control (TNF $\alpha$ ), which is known to enhance PMN activation,<sup>7</sup> is significantly different ( $p < 0.0001$ ) from the expression profile of PMN adherence receptors measured with all solutions tested and RPMI medium (Fig. 1). Thus, this result appears to be a phenomenon that may be associated with the preparation (stirring conditions, addition of solutions). The constant values at 30 and 60 minutes may reflect an adaptation of the cells to the new conditions. The investigations were stopped after 1 hour of incubation because, after that time, a degradation of PMNs was observed by optical microscopy on blood smears stained with May-Grumwald-Giemsa protocol (data not shown).

The profile of PMN receptor expression in the presence of both purified free Hb solution and modified HbOCs is similar to that observed with RPMI medium (Fig. 1). This suggests that neither the Hb molecule and its associated capacity to transport oxygen and potentially to generate oxygen radicals nor the various chemical modifications applied to Hb molecule (polymerization, internal cross-linking, or conjugation) activate PMNs in a manner that would result in their interaction and adherence to the vascular endothelium.

These results are in agreement with those of previous studies. McFaul et al.<sup>4</sup> reported an effect of Hb solutions on cytokine release by MNCs, but they did not observe any direct effect on chemotaxis or on the adherence of PMNs. Investigating the relationship between the presence of Hb and the proliferation of infection with *Escherichia coli*, Kim et al.<sup>21</sup> showed an inability of neutrophils to react against bacteria in the presence of Hb. We therefore show in this study that cell-free Hb does not inhibit the capacity of PMNs to express their adhesion receptor and then to be activated; the contact with TNF $\alpha$  after incubation with the various Hb solutions leads to the same activation profile as in PMNs incubated with TNF $\alpha$  alone.

Moreover, Kim et al.<sup>21</sup> hypothesized that Hb could be bound to neutrophils, but, in our study, no difference in

adherence receptor expression was noted in the cells incubated with RPMI and all Hb solutions tested. We can therefore suppose that the binding of the Hb molecule to the WBC membrane may impair accessibility to the receptor binding sites and/or may decrease their expression.

To evaluate the influence of the presence of a macromolecule, two ranges of molecular weights were tested: on the one hand, tetrameric  $\alpha\alpha$ -Hb and purified free Hb, which in dilute solution is present in the dimeric and tetrameric forms, and, on the other hand, oligomeric Hbs, those cross-linked with o-raffinose poly-Hb, Hb-Dex-BTC, and HES, which is a nonprotein macromolecule. Regardless of the molecular weight of the solution components, no differences were observed in the profiles of the PMN responses. These findings suggest that the presence of macromolecules does not induce specific changes in adherence receptor expression in our model. They also suggest that the physical interaction of the macromolecules (such as internal friction) with the cells did not induce any activation of PMNs.

Within the limitations of the methods presented here, this *in vitro* study shows that the presence of high concentration of various Hb solutions (purified free Hb,  $\alpha\alpha$ -Hb, Hb Dex-BTC, and o-raffinose-poly-Hb) mixed with blood led neither to neutrophil activation nor to neutrophil inactivation. In addition, no difference in adherence receptor (CD62L, CD11b, and CD18) expression was noted with the various Hb solutions, regardless of the modification applied to the protein.

These results appear favorable for the therapeutic use of HbOCs, and they must be confirmed *in vivo* to evaluate the effects of HbOCs on neutrophil adherence receptor expression and any subsequent effects upon neutrophil-endothelial cell interaction.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to George Biro, PhD (Hemosol) for critical review of the manuscript and to the cytology staff of the Brabois University Hospital Center for technical assistance.

#### REFERENCES

1. Winslow RM. New transfusion strategies: red cell substitutes. *Annu Rev Med* 1999;50:337-53.
2. Menu P, Caron A, Faivre-Fiorina B, Stoltz JF. Potential effect of hemoglobin solutions on blood components. *Transfusion* 1999;39:226-7.
3. Menu P, Longrois D, Donner M, et al. Rheological behavior of red blood cells in presence of hemoglobin solutions. *In vitro* study comparing dextran-benzene-tetra-carboxylate hemoglobin, stroma free hemoglobin and plasma expanders. *Transfus Sci* 1999;20:5-16.
4. McFaul SJ, Bowman PD, Villa VM, et al. Hemoglobin stimulates the release of proinflammatory cytokines from leukocytes in whole blood. *J Lab Clin Med* 2000;135:263-9.

5. Smith DJ, Winslow RM. Effects of extraerythrocytic hemoglobin and its components on mononuclear cell procoagulant activity. *J Lab Clin Med* 1992;119:176-82.
6. Freyburger G, Labrousse S. Flow cytometry assessment of leukocyte functions in vascular pathologies. *Hematol Cell Ther* 1996;38:513-26.
7. Ferrante A. Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors. *Immunol Ser* 1992;57:417-36.
8. Carlos T, Harlan J. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-101.
9. Baron JF. Pharmacology of low molecular weight hydroxyethylstarches. *Ann Fr Anesth Reanim* 1992;11:509-15.
10. Menu P, Faivre B, Labrude P, et al. Human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran as potential red cell substitute. II Pharmacotoxicological evaluation. *Biomat Art Cells Immob Biotech* 1994;24:551-8.
11. Prouchayret F, Fasan G, Grandgeorge M, et al. A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. I. Preparation, purification and characterization. *Biomat Art Cells Immob Biotech* 1992;20:319-22.
12. Winslow RM, Gonzales A, Gonzales M, et al. Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes in a rat haemorrhaged model. *J Appl Physiol* 1998;85:993-1003.
13. Winslow RM, Chapman KW. Pilot scale preparation of hemoglobin solutions. In: Everse J, Vandegriff KD, and Winslow RM, eds. *Methods in enzymology. Hemoglobins, biochemical and analytical methods*. Orlando, FL: Academic Press, 1994:3-16.
14. Carmichael FJ, Biro GP, Agensky L, et al. The safety and efficacy of the red cell substitute Hemolink™ in patients undergoing elective coronary artery bypass surgery (abstract). *Blood* 1999;94(Suppl 1):116b-117b.
15. Adamson JG, Moore C. Hemolink™, an o-raffinose crosslinked hemoglobin-based oxygen carrier. In: Chang TMS, ed. *Blood substitutes: principles, methods, products and clinical trials*. Basel: Karger Landes System, 1998:62-81.
16. Poncelet P, George F, Papa S, Lanza F. Quantitation of hematopoietic cell antigens in flow cytometry. *Eur J Histochem* 1996;40:15-32.
17. Lenkei R, Gratama JW, Rothe G, et al. Performance of calibration standards for antigen quantification with flow cytometry. *Cytometry* 1999;33:188-96.
18. Latger V, Dumas D, Lecompte T, et al. Vascular disease and cell activation: exploration of cell adhesion phenotype by quantitative flow cytometry. *J Mal Vasc* 1999;24:11-8.
19. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993;91:379-87.
20. Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990;75:1037-50.
21. Kim YM, Yamazaki I, Piette LH. The effect of hemoglobin, hematin, and iron on neutrophil inactivation in superoxide generating systems. *Arch Biochem Biophys* 1994;309:308-14. ■

## **Chapitre III-5**

**DEVELOPPEMENT D'UNE TROUSSE DE  
QUANTIFICATION DE CD11B A LA SURFACE DES  
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES.  
APPLICATION A LA PATHOLOGIE INFECTIEUSE**

## CHAPITRE III-5

### DEVELOPPEMENT D'UNE TROUSSE STANDARDISEE DE QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE CD11b A LA SURFACE DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES. APPLICATION EN PATHOLOGIE INFECTIEUSE.

#### I- INTRODUCTION

L'augmentation de l'expression de CD11b à la surface des cellules représente un marqueur sensible de l'activation leucocytaire *in vivo*. Cette variation a été utilisée dans de nombreuses situations pathologiques impliquant ces cellules.

#### I-1- VARIATION DE L'EXPRESSION DE CD11B ET PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Il a été montré une augmentation de l'expression de CD11b/CD18 à la surface de leucocytes de patients infectés par le **VIH** par rapport à des sujets témoins ; cette augmentation de densité du récepteur étant d'autant plus importante que la concentration en lymphocytes CD4 était plus basse, ce qui signifie une corrélation entre l'augmentation de l'expression de CD11b/CD18 et l'évolutivité de la maladie (Elbim C, 1995; Palmer S, 1993). Ainsi, il se produirait une activation leucocytaire par un facteur sérique (aucune corrélation n'a été trouvée entre l'expression de CD11b/CD18 et la concentration sérique de  $TNF\alpha$ ), aboutissant à une augmentation de l'expression des récepteurs d'adhérence des leucocytes périphériques ce qui favorise leur extravasation et leur agrégation observée dans cette maladie.

De nombreuses études ont rapporté l'augmentation progressive de l'expression de CD11b leucocytaire (PNN et monocytes) dans les **états septiques** dès la 3<sup>ème</sup> heure, cette augmentation étant d'autant plus prolongée que survenait un état de **choc septique**, l'activation leucocytaire contribuant à l'état de défaillance multiviscérale (Lin RY, 1993 et 1994; Maekawa K, 1998; Russwurm S, 2002). L'augmentation de CD11b à la surface des PNN a d'ailleurs été proposée comme marqueur précoce de surveillance de complication infectieuse après intervention chirurgicale (Wakefield CH, 1993; Klava A, 1997).

Des études récentes ont montré que l'expression de CD11b à la surface des PNN pouvait être utilisée comme marqueur précoce du diagnostic de survenue **d'infection néonatale bactérienne et virale** (Weirich E, 1998; Nupponen I, 2001). L'expression de CD11b était élevée chez tous les nouveaux-nés présentant une infection confirmée et l'intensité d'expression était corrélée avec la concentration de protéine C réactive (PCR) ( $r^2= 0,76$ ). Le marqueur CD11b était élevé le jour de l'admission, alors que la PCR n'augmentait qu'à partir du 2<sup>ème</sup> jour d'hospitalisation, faisant de ce paramètre un marqueur précoce d'infection néonatale. De plus, la valeur prédictive négative de ce récepteur chez les nouveaux-nés suspects ou porteurs d'infection était de 99%. La quantification de CD11b du PNN est donc proposée comme un test d'exclusion d'infection néonatale, plus précoce que les paramètres habituellement utilisés (PCR, leucocytose) et dont l'utilisation permettrait de réduire la durée d'hospitalisation ainsi que la consommation abusive d'antibiotiques.

## **I-2- VARIATION DE L'EXPRESSION DE CD11B ET PATHOLOGIE INFLAMMATOIRE**

La **polyarthrite rhumatoïde** représente une maladie inflammatoire chronique caractérisée cellulièrement par une infiltration de la membrane synoviale par des cellules mononucléées, associée à une accumulation de PNN dans le liquide synovial des articulations pathologiques. Il a été montré, dans cette maladie, une augmentation de l'expression de CD11b à la surface des PNN périphériques (McCarthy D, 1992; Macey MG, 1993), ainsi qu'une augmentation de ce récepteur à la surface des PNN provenant du liquide synovial témoignant de leur activation *in vivo* (De Clerck LS, 1995). Ces données ont contribué à la compréhension du rôle du PNN dans la destruction des articulations.

Il a été rapporté également une augmentation de l'intensité d'expression de CD11b/CD18 à la surface de tous les types de leucocytes de patients atteints de **sarcoïdose** par rapport à un groupe témoin (Shakoor Z, 1992). Cette surexpression des récepteurs d'adhérence pourrait contribuer à l'extravasation et l'agrégation cellulaire expliquant la formation du granulome non-caséux, caractéristique de cette maladie.

### I-3- VARIATION DE L'EXPRESSION DE CD11B ET PATHOLOGIE VASCULAIRE

Le rôle du PNN dans la pathologie vasculaire artérielle ischémique initiale ou après revascularisation (syndrome de resténose après dilatation) a été largement décrit (Ernst E, 1987; Hansen PR, 1995). L'athérosclérose a été considérée comme une maladie inflammatoire des vaisseaux artériels (Alexander RW, 1994) et l'augmentation, dans cette maladie, de l'expression des récepteurs d'adhérence leucocytaires, en particulier de CD11b/CD18, a largement contribué au fondement de cette explication (Mazzone A, 1993 et 1997 et 2001; De Servi S, 1995; Kassirer M, 1999). La mesure de l'expression de ce récepteur a même été proposée comme marqueur de surveillance d'ischémie myocardique asymptomatique en association avec le dosage de cytokines anti-inflammatoires ( $TNF\alpha$ ,  $INF\gamma$ ,  $IL-1\beta$  et  $IL-6$ ) (Mazzone A, 2001).

Une autre pathologie touchant les vaisseaux, la **pré-éclampsie** a été associée à une réaction inflammatoire avec activation leucocytaire comme en témoigne l'expression augmentée de CD11b/CD18 (Barden A., 1997; Gervasi MT, 2001; Mellembakken JR, 2002). Ces données suggèrent que la pré-éclampsie résulte d'un dysfonctionnement des cellules endothéliales associé à une réaction inflammatoire chronique de la membrane déciduale et du placenta, entraînant une stimulation locale des leucocytes. Ces PNN activés libèrent des radicaux libres et des protéases ce qui perpétue la réaction inflammatoire en entretenant le cercle vicieux de perturbation de l'endothélium local puis systémique.

De même dans le **diabète**, il a été montré une perturbation des fonctions du PNN et en particulier une adhésivité spontanée associée à une augmentation de l'expression des récepteurs d'adhérence CD11b/CD18, ces perturbations étant majorées chez les patients présentant des complications vasculaires (Delamaire M, 1995). Ainsi, ces anomalies pourraient favoriser la survenue des complications vasculaires aussi bien que celles d'épisodes infectieux.



L'expression de CD11b leucocytaire représente donc un marqueur potentiel de diagnostic positif et d'évolutivité de pathologies variées. Cependant, sa mesure dépend fortement des conditions préanalytiques de préparation des PNN et des conditions analytiques puisque il est bien connu que le PNN est très sensible à l'activation artéfactuelle *in vitro* (Barnett D, 1994 et 1998 et 2000; Gratama JW, 1998; Lenkei R, 1998, Smith KB, 1999). La liste des paramètres trouvés dans la littérature, pouvant influencer la mesure de ce marqueur, est détaillée en début du paragraphe discussion. L'absence de méthodologie standardisée réduit la valeur prédictive de ce marqueur et en limite donc son utilisation clinique malgré les nombreux domaines d'application.

Le but de cette étude est donc d'utiliser la méthode de quantification par CMF à l'aide de billes de calibration, développée dans ce travail, pour mettre au point une technique standardisée, d'utilisation rapide, aisée, et reproductible d'un laboratoire à un autre, pour mesurer l'expression de CD11b à la surface des PNN. Afin de tester la validation clinique de cet outil, il sera ensuite appliqué à une population d'adultes présentant des infections bactériennes et virales confirmées. Ce travail s'est déroulé au sein d'un partenariat avec, d'une part la société Biocytex, représentée par Dr I. Besson, qui a fourni les réactifs et d'autre part, le Dr T. Lecompte du service de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Nancy (Professeur P. Canton).

## **II- MATERIELS ET METHODES**

### **II-1-PRINCIPE**

L'expression de CD11b a été quantifiée par CMF à la surface de PNN provenant de sang total (sans étape de séparation), selon une méthode de quantification par immunofluorescence indirecte, sans étape de lavage et à l'aide de billes de calibration.

### **II-2- MATERIELS ET REACTIFS**

#### **Matériels**

- Cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickinson).
- Tubes à fond rond en polypropylène de 4,5 mL (Becton-Dickinson).
- Centrifugeuse GR 4-12 (Jouan).

#### **Réactifs**

Les réactifs ont été fournis par la société Biocytex afin de constituer une trousse standardisée (nommée WB-QFC) qui comprend :

- L'anticorps anti-CD11b (clone Bear1, Beckman Coulter et clone 2LMP19C, Dako).
- Le contrôle isotypique IgG1 (clone PMPO5, Serotec).
- L'anticorps de révélation, fragments F(ab')<sub>2</sub> de chèvre anti-souris, couplé au FITC (clone DDAF, Silenus).
- Les billes de calibration (billes de polystyrène de 9 µm de diamètre, représentant 3 populations coatées en IgG de souris selon 3 densités différentes, croissantes et connues) (système fabriqué par Biocytex, selon un brevet Byocytex).
- La solution de lyse des globules rouges.

### **II-3- MODE OPERATOIRE**

#### **Prélèvement sanguin**

Le sang veineux a été collecté dans des tubes contenant l'anticoagulant EDTA (tubes Vacuteiner®, Becton Dickinson). Cinquante trois témoins sains, ne présentant aucun symptôme infectieux et 9 adultes souffrant d'infection ont été inclus dans notre étude. Les critères clinico-biologiques des patients infectés sont présentés dans le *tableau n°III-5-1*. Pour ces patients, les échantillons veineux ont été prélevés le jour

de leur admission et avant toute administration thérapeutique. Ces conditions strictes de recueil, absolument nécessaires pour notre étude, expliquent le faible échantillonnage de la population de malades, la plupart des patients admis à l'hôpital ont déjà reçu une antibiothérapie de première intention prescrite lors d'une consultation de ville. Le délai, entre le prélèvement et l'analyse, doit être raccourci au maximum afin de limiter l'activation artéfactuelle des PNN *in vitro* (en pratique délai inférieur à 15 min).

### **Immunomarquage**

- Vingt cinq  $\mu\text{L}$  de sang total sont incubés durant 10 min, à température ambiante, avec 25  $\mu\text{L}$  d'anticorps (soit IgG1, soit anti-CD11b) (concentration finale saturante à 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- Rajouter 25  $\mu\text{L}$  d'anticorps secondaire et incuber 10 min, à température ambiante, à l'obscurité.
- Rajouter 2 mL de solution de lyse des globules rouges et incuber 10 min, à température ambiante, à l'obscurité.
- Pour chaque série d'analyse, est ajouté un tube de billes de calibration.

### **Préparation des billes de calibration**

Les mêmes étapes d'immunomarquage sont réalisées à partir de 25  $\mu\text{L}$  de suspension de billes; le flacon de billes aura préalablement été bien agité afin de resuspendre les billes sédimentées et de les homogénéiser.

### **Etude de l'influence de la concentration en PNN**

Deux échantillons veineux provenant de patients traités par facteur de croissance (G-CSF, granulocyte-colony-stimulating factor) et ayant pour concentration en PNN  $45 \times 10^9/\text{L}$  et  $37,9 \times 10^9/\text{L}$  respectivement, ont été utilisés. Ces prélèvements sont divisés en 2 aliquotes, le premier étant centrifugé à 3 500 g durant 10 min afin d'obtenir du plasma, le deuxième étant dilué au  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$  et  $\frac{1}{10}$  avec le plasma autologue.

### **Comparaison à la technique d'immunomarquage indirecte avec lavages**

Cette procédure est celle utilisée dans la partie "Méthodologie générale", proposée par la trousse QIFI (Bikoue A, 1996).

### **Analyse des cellules et des billes par cytométrie en flux (Figure n° III-5-1)**

- Analyse des billes de calibration :

- 1- Définir la population des billes sur l'histogramme biparamétrique taille /structure par une fenêtre électronique (A).
- 2- Mesurer l'IMF géométrique de chaque population de billes sur l'histogramme de fluorescence approprié et construire la droite de calibration, reliant l'IMF géométrique et le nombre de sites occupés par l'anticorps pour chaque population de billes (indiqué sur la trousse).

- Analyse des PNN :

- 3- Définir la population des PNN sur l'histogramme biparamétrique taille /structure par une fenêtre électronique (E).
- 4- Mesurer l'IMF géométrique de cette population définie sur l'histogramme de fluorescence approprié et se reporter sur la droite de calibration pour convertir cette valeur de l'IMF géométrique en nombre de sites occupés par l'anticorps.

### **II-4- EXPRESSION DES RESULTATS**

Les résultats sont exprimés en nombre de sites occupés par l'anticorps (antibody binding capacity (ABC), ou capacité liante de l'anticorps (CLA), ce nombre étant considéré proportionnel au nombre de sites du récepteur analysé.

### **II-5- ANALYSE STATISTIQUE**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type et les comparaisons sont réalisées à l'aide de test impair de student. Les différences sont considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ .

### III- RESULTATS

#### III-1- INFLUENCE DU MODE DE CONSERVATION DU PRELEVEMENT SANGUIN

Deux échantillons veineux provenant de sujets sains ont été conservés durant 90 min, 3 h, 6h et 24 h après le prélèvement selon 3 modes de conservation : à température ambiante, immédiatement à 2-8°C et à 2-8°C après 30 min à température ambiante (afin de reproduire un éventuel délai d'acheminement du tube). Dans tous les cas, l'immunomarquage a ensuite été réalisé à température ambiante.

*Figure n° III-5-2 :*

La conservation à température ambiante durant 3 heures est associée à une augmentation de l'expression de CD11b de 10% (par rapport à la valeur trouvée à 90 min) pour l'échantillon n°1 et de 6% pour l'échantillon n°2. Les deux autres modes de conservation entraînent une augmentation de plus de 26%.

La conservation à température ambiante durant 6 heures est associée à une augmentation de l'expression de CD11b de 20% (par rapport à la valeur trouvée à 90 min) pour l'échantillon n°1 et de 23% pour l'échantillon n°2.

La conservation à température ambiante durant 24 heures est associée à une augmentation importante de l'expression de CD11b d'un facteur 2 (par rapport à la valeur trouvée à 90 min) pour l'échantillon n°1 et d'un facteur 6 pour l'échantillon n°2.

La conservation, selon les deux autres modes, est associée à des variations similaires mais d'ordre plus important.

#### III-2- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SANGUINE EN PNN

La quantification de CD11b a été réalisée à la surface de PNN provenant de patients traités par facteur de croissance. Différentes dilutions ont été réalisées à l'aide du plasma autologue, la dilution au 1/10 correspondant à une concentration physiologique en PNN ( $4,5$  et  $3,8 \times 10^9/L$ ). Comme le montre la *figure n° III-5-3*, aucune variation dans la mesure de l'expression de CD11b n'est notée en fonction de la concentration en PNN, attestant que la concentration utilisée de  $2,5 \mu g/mL$  en Ac primaire anti-CD11b pour le clone Bear 1 est saturante dans les conditions

d'hyperleucocytose à PNN. Ce test est donc applicable en cas de pathologie infectieuse avec polynucléose.

### **III-3- INFLUENCE DE LA FIXATION ASPÉCIFIQUE**

Les mesures de quantification de CD11b avec et sans fixation aspécifique ont été comparées pour 30 échantillons sanguins. Cette fixation aspécifique correspond à l'IMF liée à la fixation de l'IgG1, de même classe et de même isotype que l'anticorps anti-CD11b, par son fragment Fab. Les résultats montrent une valeur moyenne de  $26,84 \times 10^3$  CLA alors qu'elle est de  $26,13 \times 10^3$  CLA en retranchant la valeur du contrôle isotypique, soit une fixation aspécifique inférieure à 5%. Afin de simplifier la procédure, le contrôle isotypique a été retiré de la trousse.

### **III-4- COMPARAISON DE DEUX CLONES D'ANTICORPS ANTI-CD11B**

La quantification de CD11b a été réalisée pour 18 échantillons sanguins, à l'aide des deux clones anti-CD11b, Bear 1 et LMP19C. Les résultats (*figure n° III-5-4*) ne montrent pas de différence significative ( $p = 0,18$ ) entre le clone Bear 1 (IMF moyenne =  $20,11 \pm 8,17 \times 10^3$  CLA) et le clone LMP19C (IMF moyenne =  $20,77 \pm 8,92 \times 10^3$  CLA).

### **III-5- COMPARAISON ENTRE LES PROCÉDURES D'IMMUNOMARQUAGE INDIRECT SANS LAVAGE (TROUSSE WB-QFC) ET AVEC LAVAGE (TROUSSE QIFI)**

Les deux procédures ont été testées pour 14 échantillons sanguins, à l'aide de l'anticorps anti-CD38 (l'expression de CD38 n'étant pas variable avec l'état d'activation cellulaire) et de l'anticorps anti-CD11b (clone Bear 1). La *figure n° III-5-5* ne montre aucune différence significative ( $p = 0,14$ ) pour l'expression de CD38 (valeur moyenne pour la procédure sans lavage =  $2,41 \pm 0,53 \times 10^3$  CLA ; valeur moyenne pour la procédure avec lavage =  $2,49 \pm 0,43 \times 10^3$  CLA). Une différence significative est, par contre, trouvée pour l'expression quantitative de CD11b (valeur moyenne pour la procédure sans lavage =  $28,09 \pm 7,47 \times 10^3$  CLA ; valeur moyenne pour la procédure avec lavage =  $33,16 \pm 8,50 \times 10^3$  CLA).

### III-6- CONTROLE DE QUALITE INTERNE

La trousse WB-QFC a été testée pour la quantification de CD11b sur un échantillon de sang total stabilisé (IMMUNOTrol<sup>®</sup>, Beckman Coulter) dans deux centres différents (laboratoire Biocytex et le nôtre). Les valeurs obtenues à l'aide du clone Bear 1 sont reproductibles (moyenne =  $7,83 \pm 0,73 \times 10^3$  CLA avec des valeurs allant de  $7,31$  à  $8,35 \times 10^3$  CLA). Cependant ces valeurs sont plus faibles que celles trouvées à partir de sang frais.

### III-7- QUANTIFICATION DE CD11B A LA SURFACE DE PNN DE TEMOINS ET DE PATIENTS INFECTES

Comme l'illustre la *figure n°III-5-6*, les valeurs de CD11b sont plus importantes pour les patients infectés ( $n = 9$ ;  $45,29 \pm 21,91 \times 10^3$  CLA par rapport aux témoins ( $n = 18$  ;  $22,01 \pm 8,21 \times 10^3$  CLA). Le patient n°8 ayant une valeur comprise dans celle des témoins, présente en fait une infection par le virus VIH asymptomatique (*tableau n° III-5-1*). Il est à noter que le patient qui présente une méningo-encéphalite herpétique (n°3) montre une augmentation de l'expression de CD11b ( $37,33 \times 10^3$  CLA) alors que la vitesse de sédimentation (vs) et la PCR sont encore comprises dans les valeurs de référence ( $< 6$  mm/H et  $< 5$  mg/L respectivement). Par ailleurs, l'expression de CD11b peut être élevée en l'absence même de phase septicémique comme le montre deux cas d'infections localisées, pneumonie à *Staphylococcus aureus* (cas n°6) et *Pseudomonas aeruginosa* (cas n°9), avec hémocultures négatives et CD11b augmenté.

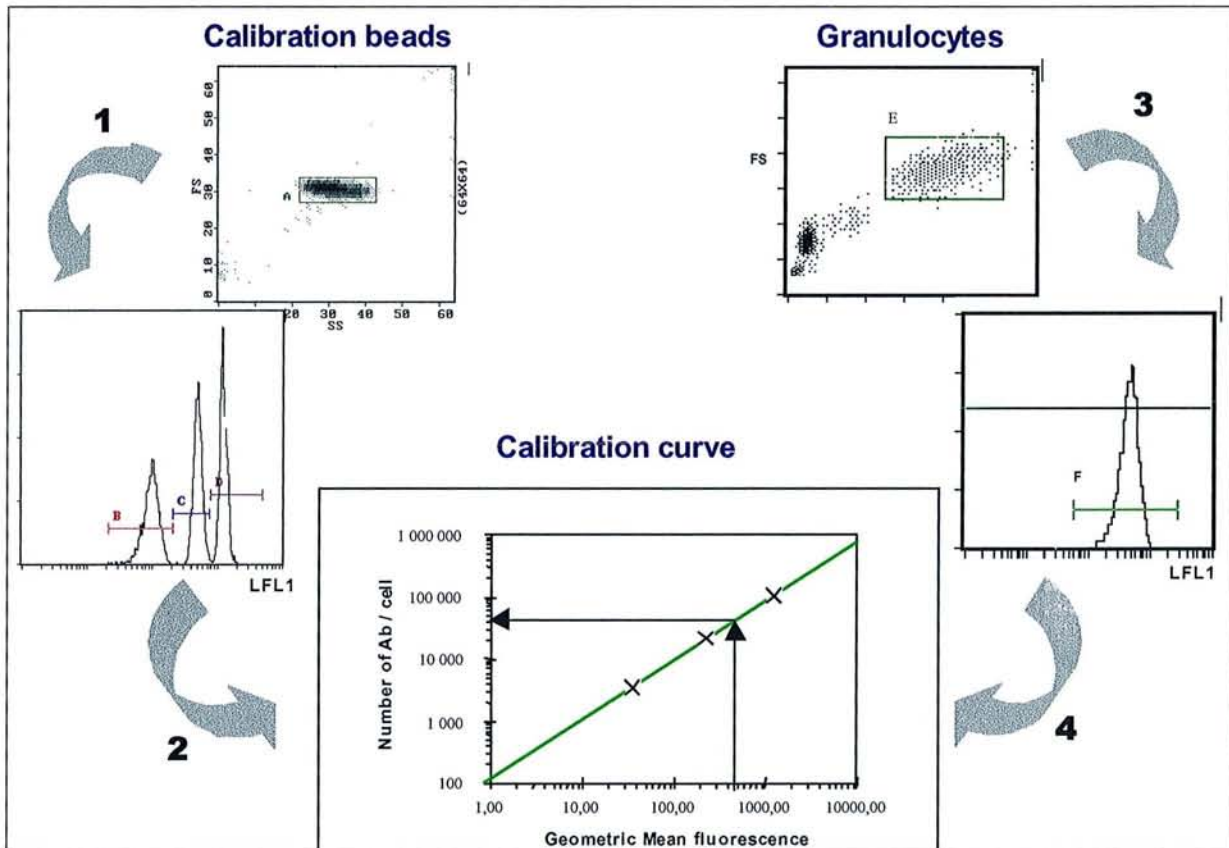


Figure n°III-5-1 : Méthodologie de la quantification de l'expression de CD11b à la surface des PNN par CMF, à l'aide de la trousse (WB-QFC, Biocytex).



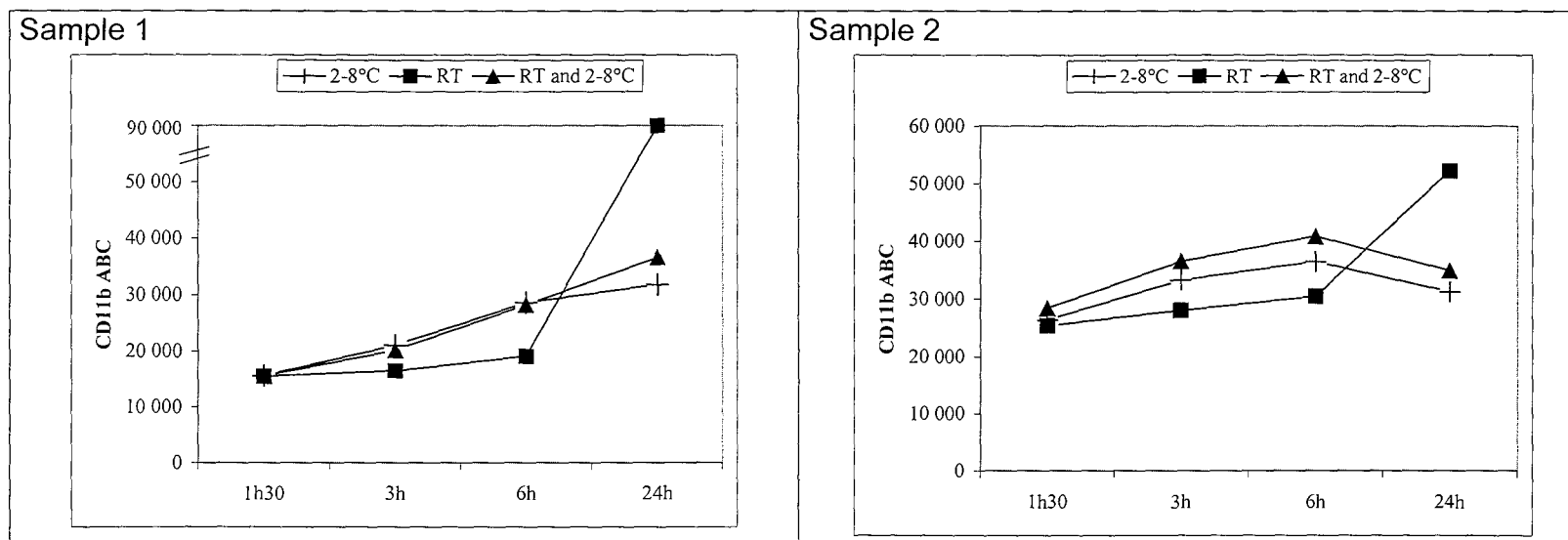


Figure n°III-5-2 : Influence des modalités de conservation de l'échantillon sanguin sur l'expression quantitative de CD11b à la surface des PNN, mesurée à l'aide de la trousse (WB-QFC, Biocytex).

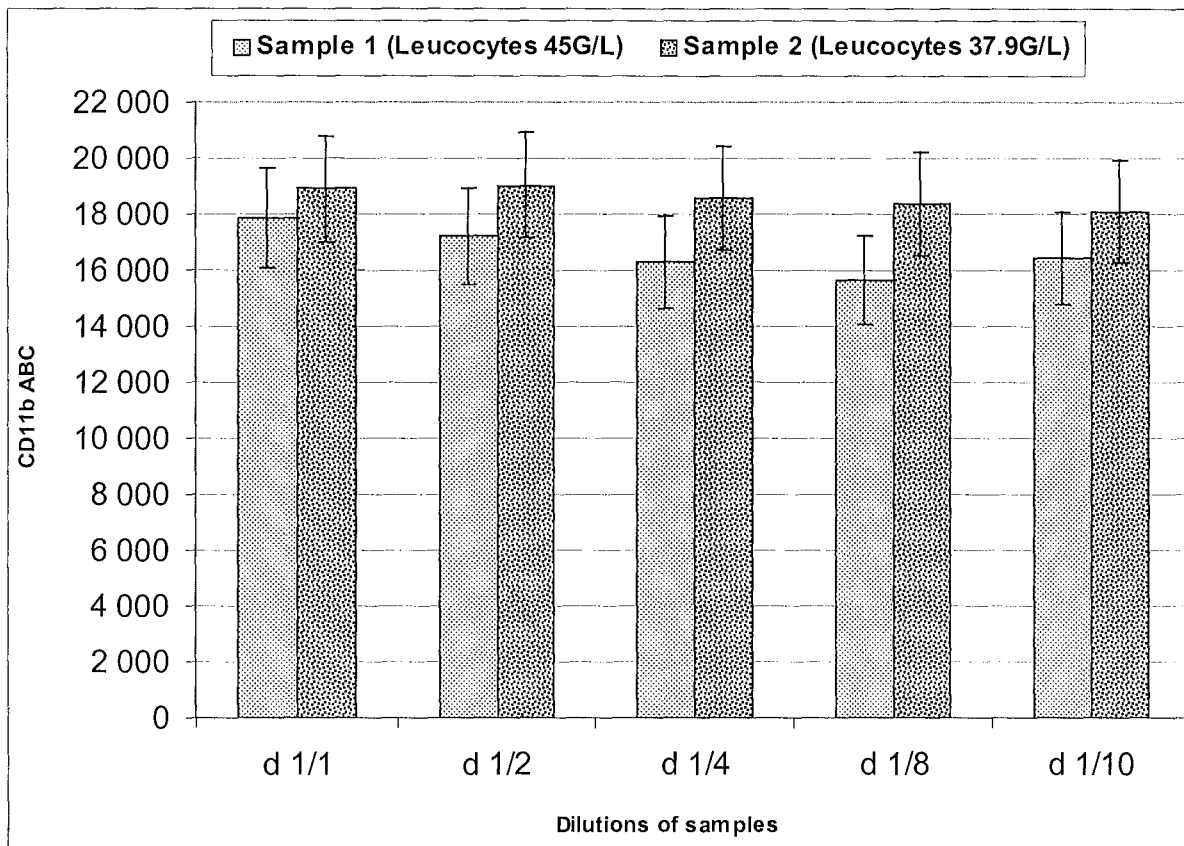


Figure n°III-5-3 : Influence de la concentration en PNN de l'échantillon sanguin sur l'expression quantitative de CD11b à la surface des PNN, mesurée à l'aide de la trousse (WB-QFC, clone Bear 1, Biocytex).

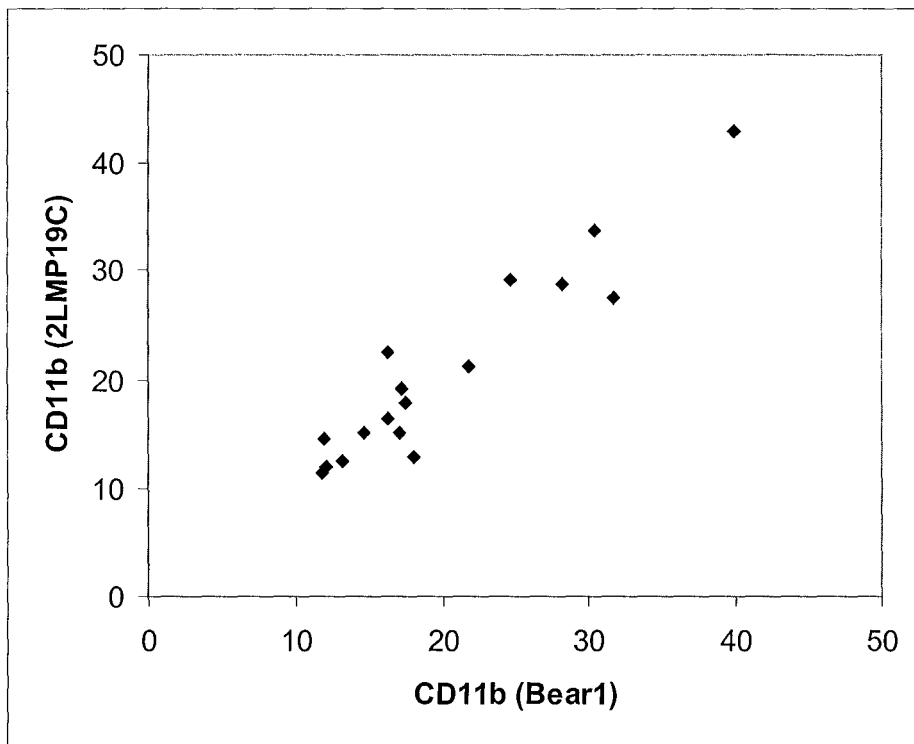


Figure n°III-5-4 : Quantification de l'expression de CD11b à la surface des PNN, selon la trousse (WB-QFC, Biocytex), à l'aide de deux clones d'anticorps anti-CD11b différents.

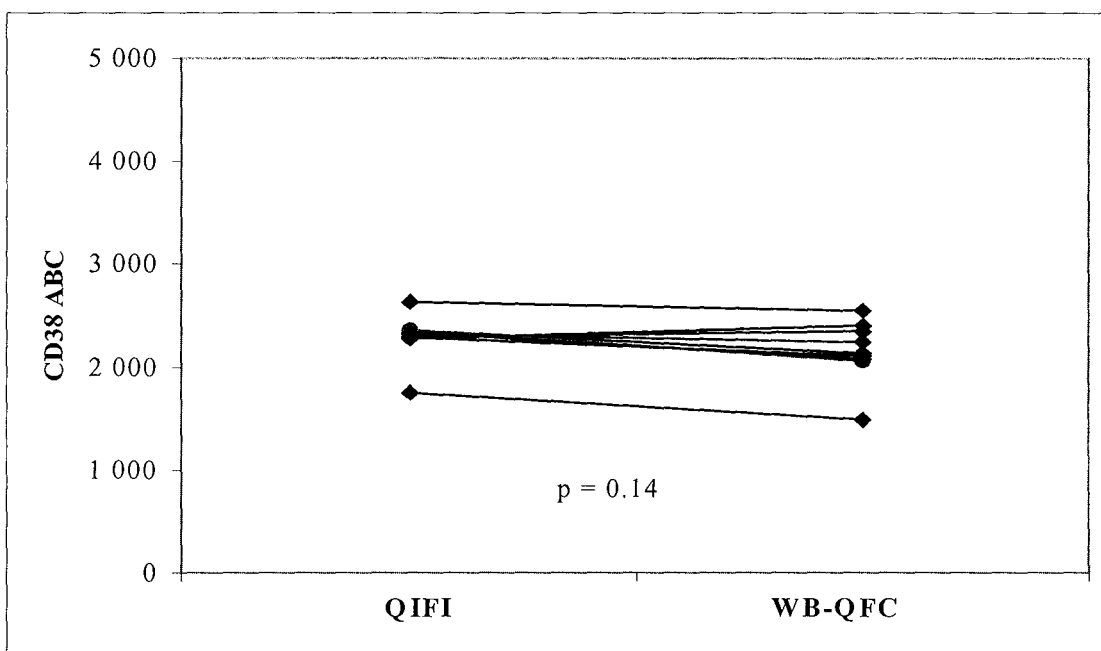
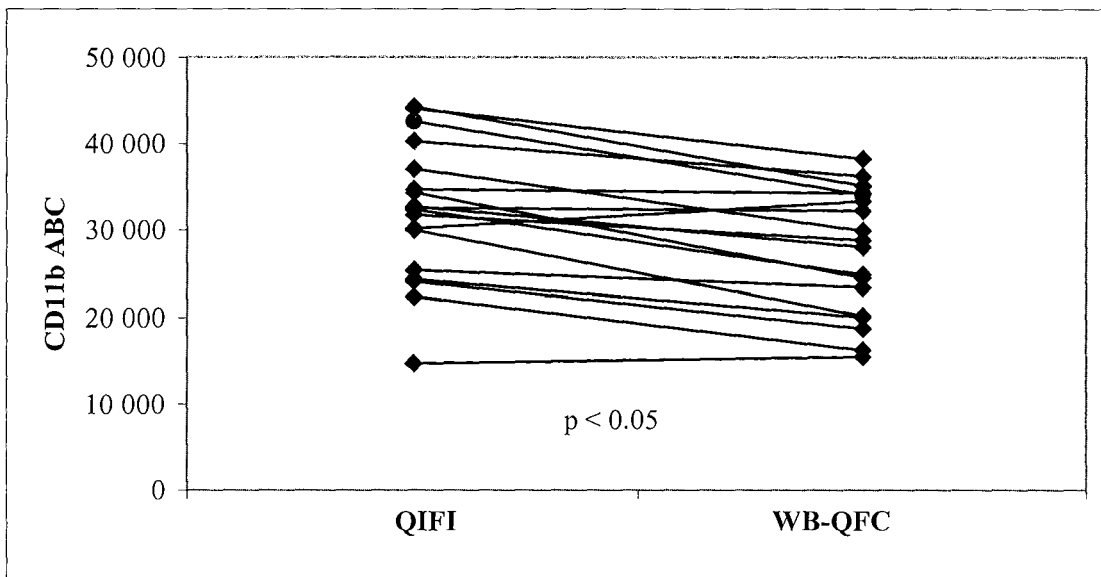


Figure n°III-5-5 : Comparaison des deux techniques de quantification antigénique indirecte, sans lavage (WB-QFC, Biocytex) et avec lavage (QIFI, Dako), pour l'expression de CD38 et de CD11b.

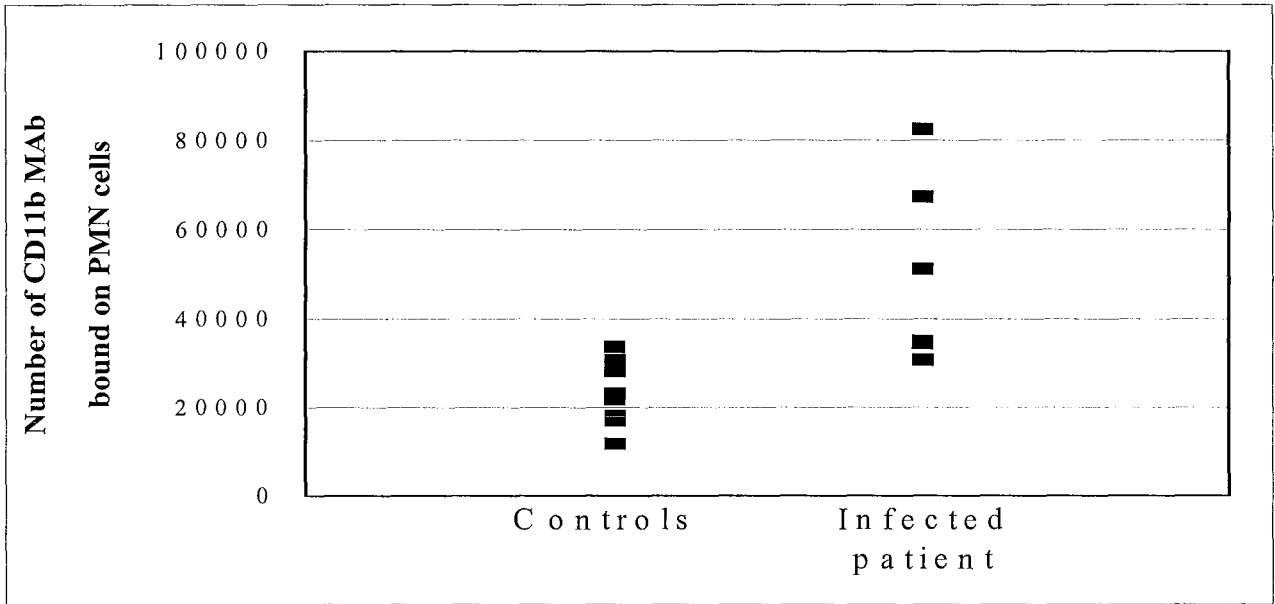


Figure n°III-5-6 : Comparaison des valeurs de l'expression de CD11b pour des patients infectés par rapport à des témoins sains.

| Cases | Pathology   | PMN count<br>(G/L) | Erythrocyte<br>sedimentation rate<br>(mm,<br>first hour) | CRP<br>(mg/L) | Blood / broncho-alveolar<br>liquid (BAL) analysis | CD11b quantitation<br>(x 10 <sup>3</sup> ABC) |
|-------|---|--------------------|--|---------------|---|---|
| 1     | Aspergillus septicemia<br>post renal transplantation                  | 8.640              | 21   | 6.2           | Antigenic reaction positive                       | 79.440  |
| 2     | Septicemia <i>Streptococcus bovis</i> post<br>valvuloplasty infection | 12.390             | 22   | 72.3          | Blood culture positive                            | 80.090  |
| 3     | Meningo-encephalitis<br>to <i>Herpes viridae</i>                      | 12.340             | 6  | < 5           | Herpetic serology positive                        | 37.330  |
| 4     | Aortic endocarditis<br><i>Streptococcus agalactiae</i>                | 2.790              | 40   | 239.0         | Blood culture positive                            | 36.060  |
| 5     | Septicemia<br><i>Streptococcus mitis</i>                              | 2.260              | 16   | 39.4          | Blood culture positive                            | 53.430  |
| 6     | Pneumopathy<br>to <i>Staphylococcus Aureus</i>                        | 13.570             | 119  | 251.7         | Blood culture negative<br>BAL culture positive    | 36.050  |
| 7     | Pneumonia<br><i>Chlamydiae psittaci</i>                               | 3.420              | 30   | 79.7          | Chlamydiae serology<br>positive                   | 37.790  |
| 8     | Human Immunodeficiency Virus<br>(HIV) infection                       | 1.790              | 6  | < 5           | HIV positive serology                             | 14.300  |
| 9     | Pneumonia<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i>                            | 4.890              | 48   | 40.9          | Blood culture negative<br>BAL culture positive    | 34.090  |

Tableau n°III-5-1 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant une pathologie infectieuse et expression quantitative de CD11b à la surface des PNN (trousse WB-QFC, Biocytex).

## IV- DISCUSSION

Le but de ce travail a été de mettre au point un outil d'utilisation facile, standardisé et reproductible de quantification de CD11b membranaire, puisque sa variation d'expression est un bon témoin d'activation du PNN. Il a été montré, par de nombreuses études dans des domaines variés, que la technique de CMF est tout a fait adaptée à l'étude de l'expression d'antigènes membranaires, donnant des informations sur l'état fonctionnel cellulaire (Lavabre-Bertrant T, 1994; Farahat N, 1995, Denny TN, 1996; Ginaldi L, 1996; Liu Z, 1996; Poncelet P, 1996). Cependant, les tests développés par CMF sont encore peu standardisés, ce qui a réduit leur intérêt clinique (Barnett D, 1998 & 2000; Gratama JW, 1998, Lenkei R, 1998; Smith KB, 1999). De plus, l'expression de CD11b est très sensible aux conditions d'analyses pré et analytiques. En effet, de très nombreux facteurs sont connus pour influencer le comportement des PNN, leur état d'activation et par conséquent le niveau d'expression de CD11b :

- Au niveau du recueil sanguin et de la conservation de l'échantillon :
  - Le type d'anticoagulant utilisé pour le recueil du sang (Repo H, 1995; Conklyn MJ, 1996).
  - Les conditions de conservation de l'échantillon et le délai d'analyse après le recueil sanguin.
- Au niveau de la procédure d'immuno-marquage :
  - Le mode de préparation de l'échantillon (analyse en sang total ou après isolement cellulaire).
  - La procédure d'immuno-marquage (Gratama JW, 1998; Lenkei R, 1998).
  - Le nombre de lavages (Smith KB, 1999).
  - La vitesse de centrifugation (Kuijpers TW, 1991).
  - La procédure de lyse des globules rouges (Barnett D, 1998; Styrt B, 1998).
  - Les temps et la température d'incubation.
  - Le pH des solutions utilisées.
  - L'origine et la concentration des anticorps utilisés.
  - Le type de fluorochrome et le rapport fluorochrome/protéine.

- Au niveau de la procédure d'analyse cytométrique :

- L'utilisation d'une analyse mono- ou multi-paramétrée.
- La prise en compte pour l'IMF de la moyenne ou de la médiane, d'autant plus si la distribution de l'expression de l'antigène n'est pas gaussienne (Barnett D, 1998).

L'addition de tous ces facteurs explique la divergence des résultats trouvés pour un même marqueur et souligne l'intérêt d'une technique standardisée, du prélèvement au rendu des résultats, pour assurer la reproductibilité des mesures et permettre leur exploration dans des domaines cliniques (Lavabre-Bertrand T, 1994; Farahat N, 1995).

Nous allons discuter les paramètres étudiés dans notre travail et ainsi argumenter les choix de notre procédure.

### ***Paramètres pré-analytiques***

Il a été décrit que les ***variations de température*** pouvait stimuler les PNN, entraînant une augmentation de l'expression de CD11b, consécutive à la translocation à la membrane de cet antigène depuis les granules intracytoplasmiques (Forsyth KD, 1990; Macey MG, 1992; Youssef PP, 1995; Latger-Cannard V, 2000). Certains auteurs préconisent de réaliser l'ensemble de la procédure de conservation et d'immunomarquage dans de la glace (Repo H, 1993 & 1995; Fearon DT, 1983). D'autres auteurs recommandent d'éviter tout changement de température durant la procédure en conservant l'échantillon à température constante, du prélèvement à l'analyse cytométrique (Barnett D, 1998). Notre étude (*figure n°III-5-2*) montre bien que la conservation au froid (2-8°C) immédiatement après le prélèvement ou après 30 min à température ambiante est associée à une augmentation de l'expression de CD11b plus importante que lorsque l'échantillon sanguin est conservé à température ambiante. La condition de conservation à température ambiante est celle qui entraîne le moins d'élévation artéfactuelle de l'expression de CD11b. Afin de simplifier la procédure de réalisation de notre test, nous préconisons de réaliser toutes les étapes de la procédure à température ambiante ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ).



De plus, comme l'illustre la *figure n°III-5-2*, l'expression de CD11b augmente progressivement après 1h30 de conservation. Il nous semble donc nécessaire d'analyser le prélèvement rapidement après le recueil, **le délai prélèvement-marquage** devant être minimisé au maximum à une heure, ce qui a été réalisé pour l'exploration des témoins et des patients.

Il a été rapporté que la **concentration cellulaire** présente dans l'échantillon sanguin pouvait influencer la fixation des anticorps et par conséquent l'intensité de fluorescence (Smith KB, 1999). En effet, pour que l'ensemble des récepteurs étudiés à la surface des cellules ciblées soit reconnu par l'anticorps spécifique, il faut que ce dernier soit en concentration saturante par rapport à la concentration cellulaire. Comme l'illustre la *figure n°III-5-3*, aucune variation significative des valeurs de quantification de l'expression de CD11b n'est notée en fonction de la concentration leucocytaire des échantillons sanguins. Ces résultats montrent que la concentration d'anticorps utilisée dans la trousse est saturante en cas de polynucléose et permet de valider son utilisation clinique dans les états pathologiques avec hyperleucocytose à PNN jusqu'à  $45 \times 10^3/L$ ..

### **Paramètres analytiques**

Il a été démontré que le **mode de préparation** des PNN pouvait influencer leur état d'activation et ainsi l'expression membranaire de CD11b (Gratama JW, 1998; Lenkei R, 1998). L'analyse des PNN en sang total est plus physiologique qu'après une phase d'isolement ; de plus les étapes de centrifugation sont susceptibles d'activer les PNN (Kuijpers TW, 1991). Pour ces raisons, la trousse développée permet une quantification de CD11b, à partir de sang total et sans aucune phase de lavage. Comme cette trousse propose un immuno-marquage indirect, l'excès d'anticorps anti-CD11b n'est pas retiré avant que l'anticorps secondaire (de souris anti-Ig humaines marqué au FITC) soit ajouté. Smith KB et al. (1999) ont montré une diminution de l'intensité de fluorescence en l'absence d'étapes de lavage. Ce fait est probablement dû à un excès d'anticorps primaire qui, par un phénomène d'encombrement stérique, empêche l'anticorps secondaire de venir saturer les Ig. Dans notre étude (*figure n°III-5-5*), aucune différence significative entre les deux procédures (sans lavage, WB-QFC et avec lavage, QIFI) n'est notée

pour l'antigène CD38, récepteur dont l'expression n'est pas sensible à l'état d'activation cellulaire. Ce résultat démontre bien que dans nos conditions de réalisation du test, l'absence de lavage n'inhibe pas la fixation de l'anticorps secondaire et donc n'entraîne pas d'altération de l'expression du récepteur étudié.

Par contre, l'expression de CD11b est significativement plus élevée avec la procédure avec lavage par rapport à celle de notre trousse sans lavage. Ceci démontre bien que les étapes de lavage avec centrifugation activent les PNN, influençant artéfactuellement l'expression de CD11b. Le choix de notre trousse avec immunomarquage sans étape de lavage est plus adapté à la quantification de récepteurs comme CD11b, dont l'expression est influencée par l'état d'activation cellulaire.

La trousse WB-QFC utilise un **marquage en simple couleur** (utilisation d'un simple fluorochrome), ce qui évite les éventuelles interactions liées à l'utilisation du multimarquage (Barnett D, 1998). En effet, il a été rapporté que des multimarquages à l'aide d'anticorps différents pouvaient empêcher la saturation des sites antigéniques par encombrement stérique, si les récepteurs étudiés étaient trop proches. De plus, la présence de plusieurs fluorochromes situés à proximité favorise le phénomène de "**transfert d'énergie par résonance**". Ces arguments montrent que, l'analyse en simple couleur utilisée dans notre test, assure une meilleure reproductibilité.

Les **deux clones d'anticorps anti-CD11b** (Bear 1 et 2LMP19C) ont été utilisés en conditions saturantes par rapport à la concentration cellulaire. Dans ces conditions, il a été établi qu'une molécule d'anticorps se liait à son antigène de façon monovalente (Poncelet P, 1996). Ainsi, la capacité de liaison de l'anticorps monoclonal est considérée équivalente au nombre de sites antigéniques disponibles. Cependant, il faut garder à l'esprit, que même en conditions saturantes, l'expression antigénique peut varier si l'anticorps se fixe à des épitopes répétés ou bien localisés dans des sites cryptiques qui ne peuvent être saturés que par des anticorps de forte affinité (Lenkei R, 1998; Bikoue A, 1996). Ainsi, lors de la réalisation d'études multicentriques, il est préférable d'utiliser une seule procédure, développée avec un seul clone d'anticorps, en particulier lorsque l'antigène étudié est fonction de l'état fonctionnel cellulaire. La standardisation de notre trousse assure la reproductibilité

des mesures nécessaire à des études inter-laboratoires. Dans notre étude, les résultats de quantification de CD11b étaient similaires avec les deux clones d'anticorps utilisés (*figure n°III-5-4*), suggérant que les deux anticorps se fixent au récepteur CD11b avec la même valence et la même affinité.

La valeur de la capacité de liaison de l'anticorps peut être également influencée par le choix des **résultats statistiques** d'analyse des graphes de distribution de fluorescence : soit la médiane, soit la moyenne représentée respectivement par l'IMF arithmétique ou géométrique. Ces données seront similaires pour une distribution gaussienne mais différent en cas de distribution hétérogène (Barnett D, 1998). La littérature recommande d'utiliser la moyenne géométrique qui prend en compte l'hétérogénéité de distribution du paramètre étudié. Cette indication fait partie intégrante du protocole analytique de standardisation de quantification de CD11b et est mentionnée dans la fiche technique de la trousse. Dans notre étude, la distribution de l'expression de CD11b semble être homogène aussi bien pour les témoins que pour les patients mais nous avons utilisé la moyenne géométrique afin de prendre en compte des différences mineures d'état d'activation du PNN.

Les résultats de quantification de CD11b à l'aide de la trousse d'immunomarquage indirect avec lavage (QIFI) sont plus élevés par rapport à ceux trouvés dans la littérature avec la même méthodologie (Bikoue A, 1996) (moyenne =  $45,00 \pm 20 \times 10^3$  CLA, CV = 44% pour l'étude d'A. Bikoue contre  $33,16 \pm 8,50 \times 10^3$  CLA, CV = 26%). La comparaison du protocole analytique montre que les anticorps sont similaires mais que le mode de préparation des cellules, la température, les temps d'incubation et l'étape finale de fixation diffèrent, ce qui contribue aux divergences rencontrées. Ces données renforcent la nécessité d'un protocole méthodologique standardisé pour assurer la reproductibilité des mesures multicentriques.

### **Contrôle de qualité**

Un contrôle de qualité interne et externe, à l'aide de sang stabilisé, est conseillé pour le contrôle des immunophénotypes (Barnett D, 1996 et 1998 et 2000, Peloquin RG, 1994). La quantification de CD11b à la surface des PNN par deux équipes différentes montrent des résultats similaires, ce qui permet de valider ce contrôle de qualité. La présence de valeurs plus basses, par rapport à celles trouvées pour du sang frais, s'explique probablement par une altération de la membrane des PNN de type plissement, entraînant la formation d'antigènes cryptiques.

### **Application clinique**

Cette trousse standardisée nous a permis de confirmer l'augmentation d'expression de CD11b à la surface de PNN provenant de patients infectés (moyenne =  $45,29 \pm 21,91 \times 10^3$  CLA) par rapport aux sujets sains (moyenne =  $22,01 \pm 8,21 \times 10^3$  CLA) (*figure n°III-5-6*).

L'augmentation du niveau d'expression de CD11b peut donc être considérée comme un marqueur spécifique d'infection, puisque aucune valeur élevée n'a été notée pour les témoins sains.

La variation de CD11b semble être un marqueur précoce d'infection puisque le patient atteint de méningo-encéphalite à *Herpes viridae* (*tableau n°III-5-1*, patient n°3) présente une élévation de l'expression de CD11b alors que la vs et la PCR sont comprises dans les valeurs de références.

De plus, une augmentation de CD11b a été observée, dans deux cas d'infection localisée, pour des patients ayant présenté une pneumonie sans septicémie (hémocultures négatives) (*tableau n°III-5-1*, patients n°6 et 9). Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature qui rapporte une augmentation de l'expression de CD11b chez des patients présentant des pneumopathies communes (Wang S, 1998) ou des bronchiolites à VRS (virus du syncytium respiratoire) (Glynn P, 1999).

En conclusion, les conditions expérimentales que nous avons définies pour notre trousse de quantification de l'expression membranaire de CD11b permettent d'éliminer les variations liées aux facteurs méthodologiques. Cette trousse standardisée permet des études multicentriques et longitudinales. La quantification de l'expression de CD11b à la surface des PNN à l'aide de la trousse (WB-QFC) représente un test de réalisation facile, rapide, nécessitant très peu de sang (25 µL). Dans ces conditions, la mesure du niveau d'expression de CD11b pourrait être proposée comme un nouveau marqueur de l'activation des PNN, dans la recherche diagnostique d'un état infectieux. Ce marqueur présente un intérêt particulier chez les nouveaux-nés pour lesquels les marqueurs inflammatoires sont souvent pris en défaut et la quantité de sang est limitée. Un travail de validation de cette trousse chez les nouveaux-nés suspects d'infection est en projet avec le Dr O. Fenneteau (Service d'Hématologie Pédiatrique, Pr N. Schlegel, l'hôpital Robert Debré, Paris).

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## QUATRIÈME PARTIE : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les récepteurs d'adhérence constituent les acteurs essentiels de l'interaction leucocyte-cellule endothéliale. Leur fonctionnalité implique des variations quantitatives du niveau de leur expression ainsi que des redistributions spatiales. Ce travail a permis, d'une part, de mettre au point une double approche méthodologique pour explorer ces deux phénomènes et d'autre part, d'appliquer la cytométrie en flux quantitative dans plusieurs domaines d'application clinique.

Dans la première partie méthodologique, nous avons élaboré un protocole de mesure quantitative, par cytométrie en flux, de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface des polynucléaires neutrophiles. Cette première phase du travail nous a permis d'appréhender l'importance de l'influence des paramètres pré-analytiques sur cette mesure, ce qui nous a conduit, par conséquent, à développer un protocole de mesure standardisé. A l'aide de ce dernier, nous avons établi les valeurs de références pour des témoins (sujets sains), à l'état basal et après stimulation leucocytaire par un agoniste de la réaction inflammatoire ( $TNF\alpha$ ).

L'utilisation de la microscopie à sectionnement optique à fluorescence 3D nous a permis de connaître la distribution spatiale de ces récepteurs. Le regroupement en "clusters" des  $\beta_2$  intégrines, trouvé dans notre étude lors de l'activation leucocytaire, est corrélé aux résultats de la littérature et correspond à un remaniement du cytosquelette dans le but de renforcer la liaison de ce récepteur à son ligand endothélial. Par contre, l'hétérogénéité de distribution observée à l'état basal est d'interprétation plus délicate. La topographie en couronne et polarisée pour certains polynucléaires neutrophiles correspond à un phénotype d'activation, ce qui suggère la possibilité d'un début d'activation artéfactuelle, *in vitro*, lors du prélèvement et/ou du marquage de ces cellules. Ces résultats remettent en cause la pertinence de l'analyse biologique dans la caractérisation des états "basal" et "activé" et soulignent la nécessité de prendre en compte avec précision l'ensemble des paramètres pré-analytiques et analytiques lors de l'interprétation des résultats. Nous n'avons pas, au cours de ce travail et par manque de temps, appliqué la microscopie à sectionnement optique à fluorescence 3D dans les domaines pathologiques. Cependant, elle représente une approche méthodologique intéressante pour

caractériser les anomalies de redistribution spatiale des récepteurs d'adhérence, ce qui pourrait définir un nouveau "LAD" syndrome. La possibilité d'analyser en parallèle d'autres paramètres comme les protéines du cytosquelette, le flux calcique ou des protéines de la transduction sont des perspectives que nous envisageons pour des patients présentant un tableau d'infections récurrentes, restant inexplicé.

La pathologie des récepteurs d'adhérence leucocytaires est représentée, soit par un défaut d'expression, soit par une surexpression des  $\beta_2$  intégrines associée à une diminution d'expression de la L-sélectine, ce qui correspond à un état d'activation leucocytaire. Nous avons pu, au cours de ce travail, nous impliquer dans ces deux types d'anomalies.

La seule pathologie déficitaire en récepteurs d'adhérence est illustrée par les "LAD" syndrome qui restent une entité rare. La mise en place de la recherche systématique d'un déficit quantitatif d'expression de ces récepteurs chez les enfants présentant un tableau infectieux chronique non expliqué, nous a permis de mettre en évidence un déficit portant à la fois sur l'expression de  $\beta_2$  intégrines CD11b/CD18 et de la sélectine CD62L, chez un patient atteint de glycogénose Ib. Ce résultat, à notre connaissance rapporté pour la première fois, contribue à expliquer, en association avec les autres anomalies fonctionnelles leucocytaires, la survenue des complications infectieuses. L'aspect régressif de ce déficit après traitement par facteur de croissance permet également de comprendre l'efficacité de cette thérapie sur l'évolution favorable du tableau infectieux. Ces résultats nouveaux nous incitent à poursuivre l'exploration d'autres cas de glycogénose Ib ainsi que d'autres pathologies caractérisées par la survenue d'infections récurrentes.

Les pathologies associées à un phénotype d'activation leucocytaire, sont plus nombreuses et diversifiées (pathologie inflammatoire, infectieuse, vasculaire...).

Nous nous sommes intéressés aux fonctions des monocytes chez des patients atteints de cirrhose alcoolique, maladie caractérisée par une fibrose du foie précédée d'une phase d'hépatite. Notre étude a permis de mettre en évidence, chez ces patients, un phénotype d'activation pour les monocytes circulants avec une diminution du ratio d'activation pour l'expression de CD11b/CD18. Ces résultats,



rapportés pour la première fois pour les monocytes, sont cohérents avec ceux de la littérature qui ont montré une activation des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes et des cellules endothéliales. Ces données illustrent que la pathogenèse de l'hépatite puis de la cirrhose alcoolique est probablement liée à un processus inflammatoire en réponse à l'alcool et/ou à ses métabolites. La diminution du potentiel réactif des monocytes contribue à expliquer la susceptibilité de ces patients à présenter des complications infectieuses. D'ailleurs, il est également montré, dans notre série de patients, que les sujets ayant une complication infectieuse présentent une augmentation statistiquement significative des  $\beta_2$  intégrines associée à une diminution de celle de la L-sélectine, par rapport aux patients non infectés. Ces résultats sont cliniquement intéressants puisque ces paramètres peuvent être considérés comme des marqueurs infectieux sensibles, chez des patients présentant habituellement une symptomatologie a minima et peu spécifique en cas d'infection. La quantification de l'expression de CD11b à la surface des leucocytes selon un protocole standardisé pourrait être proposé comme un marqueur de surveillance systématique dans l'évolution de cette maladie, afin de pouvoir dépister précocement la survenue d'une complication infectieuse.

L'analyse de l'exposition des phospholipides membranaires anioniques par cytométrie en flux, à l'aide de l'annexine V, a montré une augmentation de leur expression à l'état basal, ce qui conforte la présence d'un phénotype d'activation. La diminution du ratio d'activation de l'expression de ces phospholipides, observée chez ces patients par rapport aux témoins, témoigne d'une anomalie de régulation par les transporteurs spécifiques de ces lipides et pourrait évoquer un défaut d'apoptose des monocytes. Ces premières données, à notre connaissance jamais rapportées dans la littérature, méritent d'être complétées par l'étude de l'exposition des phospholipides anioniques des autres cellules inflammatoires ainsi que par l'exploration des molécules impliquées dans les différentes phases d'initiation, d'exécution et de dégradation protéolytique et nucléaire de l'apoptose comme le Fas-ligand, les membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bad) ou bien les caspases, protéases impliquées dans la dégradation de l'ADN.

Enfin, nous avons utilisé la méthodologie de quantification de l'expression des récepteurs d'adhérence dans un autre domaine d'application clinique, représenté par l'évaluation d'hémoglobines modifiées sur le comportement des polynucléaires neutrophiles. Nous avons ainsi montré que ces nouveaux transporteurs d'oxygène n'entraînaient pas, *in vitro*, de variation de l'expression de ces récepteurs, ce qui témoigne de l'absence d'activation leucocytaire. Cette étude nous a donc permis de montrer que cette méthodologie était tout à fait adaptée à l'exploration du phénotype leucocytaire, en terme de marqueur d'activation. Ces résultats encourageants nous ont incités à poursuivre cette investigation *in vivo*, chez le cobaye (étude en cours). Par ailleurs, la méthodologie de quantification antigénique comme moyen d'étude de l'activation cellulaire est également applicable à d'autres cellules comme les plaquettes. Ainsi, nous avons quantifié l'expression de récepteurs comme CD62-P, GPIIbIIIa, GPIb à la surface plaquettaire, dans les mêmes conditions analytiques que l'étude sur les leucocytes, pour mesurer l'influence des hémoglobines modifiées sur le comportement et la fonctionnalité des plaquettes (étude en cours).

L'ensemble des applications cliniques rapportées dans ce mémoire montrent que la quantification de l'expression des récepteurs d'adhérence représente une méthodologie utile pour connaître le phénotype d'activation leucocytaire. Cette méthodologie, d'utilisation facile et rapide pour un laboratoire d'hématologie doté d'un cytomètre en flux, fournit des résultats reproductibles à condition d'utiliser un protocole standardisé au niveau des paramètres pré-analytiques et analytiques. Or, cette condition est rarement appliquée lors d'études multicentriques, chaque laboratoire utilisant "son protocole" habituel. Et de nombreuses références de la littérature ont rapporté l'influence de ces facteurs pré-analytiques et analytiques. Après avoir fait une revue bibliographique de ces facteurs, le but du cinquième chapitre a été d'élaborer, en collaboration avec une société commerciale, une trousse de quantification de l'expression de CD11b afin de standardiser au maximum sa mesure et de pouvoir réaliser des comparaisons inter-laboratoires et/ou longitudinales. Son application dans le domaine de la pathologie infectieuse a permis de valider son utilisation en terme de sensibilité, spécificité et facilité d'utilisation. Les perspectives d'application de cette trousse sont nombreuses, dans toutes les situations impliquant une variation de CD11b, soit la pathologie inflammatoire,

infectieuse, cardio-vasculaire, diabétique... L'intérêt de la quantification de CD11b comme marqueur précoce d'infection chez le nouveau-né a été rapporté par certains auteurs et nous envisageons, en collaboration avec le laboratoire d'hématologie de l'hôpital Robert Debré, de mener prochainement cette étude.

En conclusion, ce travail nous a permis de pratiquer cette nouvelle application de la cytométrie en flux que représente la quantification antigénique à l'aide d'un calibrant standardisé, d'en connaître les intérêts et les limites, à travers une approche fondamentale puis une application clinique dans des domaines diversifiés. Ce travail a constitué la première étape d'une utilisation plus large de la cytométrie quantitative. En effet, ce travail se poursuit par l'application de cette méthodologie pour d'autres cellules comme les plaquettes (Toussaint M, en cours de rédaction) et les cellules progénitrices CD34+ dans le domaine de la greffe de moelle (Gigant C, 2001).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## BIBLIOGRAPHIE

(selon ordre alphabétique)

1. Adams DH, Burra P, Hubscher SG, Elias E, Newman W. Endothelial activation and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. *Hepatology*, 1994, 19: 588-94.
2. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines : leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, 1997, 349 : 490-5.
3. Adams DH. Leukocyte adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*, 1994, 29: 249-60.
4. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (CD31) : a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 1991, 114 :1049-56.
5. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. La structure de la membrane. Dans : *L'essentiel de la Biologie Cellulaire*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1999: 347-70.
6. Alexander RW. Inflammation and coronary disease. *N Engl J Med*, 1994, 331, 468-9.
7. Ambruso DR, McCabe ERB, Anderson D, Beaudet A, Ballas LM, Brandt IK, Brown B, Coleman R, Dunger DB, Falletta JM, Friedman HS, Haymond MW, Keating JP, Kinney TR, Leonard JV, Mahoney DH, Matalon R, Roe TF, Simmons P, Slonim AE. Infectious and bleeding complications in patients with glycogenosis Ib. *Am J Dis Child*, 1985, 139 : 691-7.
8. Anderson D, Mace ML, Brinkley BR, Martin RR, Smith CW. Recurrent infections in glycogenosis type Ib : abnormal neutrophil mobility related to impaired redistribution of adhesion sites. *J Infect Dis*, 1981, 143 : 447-59.
9. Anderson DC, Springer TA. Leucocyte adhesion deficiency : an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med*, 1987, 38 : 175-93.
10. Annabi B, Hiraiwa H, Mansfield BC, Lei KJ, Ubagai T, Polymeropoulos MH, Moses SW, Parvari R, HersHKovitz E, Mandel H, Fryman M, Chou JY. The gene for glycogen-storage disease type b maps to chromosome 11q23. *Am J Hum Genet*, 1998, 62: 400-5.

11. Arnaout A, Spits H, Terhorst C, Pitt J, Todd RF. Deficiency of a leukocyte surface glycoprotein (LFA-1) in two patients with Mo1 deficiency. *J Clin Invest*, 1984, 74: 1291-1300.
12. Arnaout A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 1990, 75 : 1037-50.
13. Barden A, Graham D, Beilin LJ, Ritchie J, Baker R, Walters BN, Michael CA. Neutrophil CD11b expression and neutrophil activation in pre-eclampsia. *Clin Sci*, 1997, 92 : 37-44.
14. Barnard JW, Biro MG, Siu KL, Ohno S, Carozza MA, Moyle M, Soule HR, Malik AB. Neutrophil inhibitory factor prevents neutrophil-dependent lung injury. *J Immunol*, 1995, 155 : 4879-81.
15. Barnett D, Granger V, Mayr P, Storie I, Wilson GA, Reilly JT. Evaluation of a novel stable whole blood quality control material for lymphocyte subset analysis: results from the UK NEQAS Immune Monitoring Scheme. *Cytometry*, 1996, 26 : 216-22.
16. Barnett D, Granger V, Reilly JT. The United Kingdom External Quality Assurance Schemes (UK NEQAS) for leukemia Phenotyping. *Brit J Haematol*, (Abstract) 1994, 86 : 83.
17. Barnett D, Storie I, Granger V, Whitby L, Reilly JT, Brough S, Garner S, Lawry J, Richards S, Bell AE, Shenton BK. Standardization of lymphocyte antibody binding capacity – a multi-center study. *Clin Lab Haem*, 2000, 22 : 89-96.
18. Barnett D, Storie I, Wilson GA, Granger V, Reilly JT. Determination of leukocyte antibody binding capacity (ABC) : the need for standardization. *Clin Lab Haem*, 1998, 20 : 155-64.
19. Barraud H. Influence de la fluidité des membranes monocytaires sur la réponse à la vaccination contre l'hépatite B chez les cirrhotiques alcooliques. Thèse de Docteur en médecine, Nancy, 16 octobre 2000.
20. Bashan N, Hagai Y, Potashnik R. Impaired carbohydrate metabolism of polymorphonuclear leukocytes in glycogen storage disease Ib. *J Clin Invest*, 1988, 81 : 1317-22.
21. Bashan N, Potashnik R, Peist A, Peleg N, Moran A, Moses SW. Deficient glucose phosphorylation as a possible common denominator and its relation to abnormal leucocyte function, in glycogen storage disease type Ib patients. *Eur J Pediatr*, 1993, 152 : 44-48.

22. Bassé F, Gaffet P, Rendu F, Benvenüe A. Translocation of spin-labeled phospholipids through plasma membrane during thrombin and ionophore A23187-induced platelet activation. *Biochemistry*, 1993, 32: 2337-44.
23. Bastiaanse EM, Hold KM, Van der Laarse A. The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc Res*, 1997, 35 : 384-6.
24. Beaudet AL, Anderson D, Michels V, Arion WJ, Lange AJ. Neutropenia and impaired neutrophil migration in type Ib glycogen storage disease. *J Pediatr*, 1980 97 : 906-10.
25. Beauge F. Physico-chemical membrane alterations during ethanol intoxication. *Alcohol Alcohol*, 1991, S1: 233-9.
26. Becker DJ, Lowe JB. Leukocyte adhesion deficiency type II. *Bioch Biophysica Acta*, 1999, 1455 : 193-204.
27. Benedetti A, Birarelli AM, Brunelli E, Curatola G, Ferretti G, Del Prete U, Jezequel AM, Orlandi F. Modification of lipid composition of erythrocytes membranes in chronic alcoholism. *Pharmacol Res Comm*, 1987, 19 : 651-62.
28. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M, Zwaal RF. Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distribution and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. *Lupus*, 1998b, 7 : 126-31.
29. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M, Zwaal RF. Transmembrane phospholipid distribution in blood cells : control mechanisms and pathophysiological significance. *Biol Chem*, 1998a, 379 : 973-86.
30. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest*, 1985, 76 : 2003-11.
31. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression : normal adult values. *Cytometry*, 1996, 26 : 137-47.
32. Blanchard M, Favier MJ, Rouland N, Besancon F. Ascitic fluid from alcoholic cirrhosis patients does not enhance chemotaxis of polynuclear neutrophils. *Ann Gastroenterol Hepatol*, 1989, 25 : 47-50.

33. Blusse van Oud A, Janssens AR, Leijh PC, van Furth R. Functions of granulocytes and monocytes in primary biliary and alcoholic cirrhosis. *Clin Exp Immunol*, 1985, 62 : 724-31.
34. Bodnar A, Jenei A, Bene L, Damjanovich S, Matko J. Modification of membrane cholesterol level affects expression and clustering of class I HLA molecules at the surface of JY human lymphoblasts. *Immunol Lett*, 1996, 54 : 221-6.
35. Bonioli E, Bellini C, Di Stefano A, Costa A, Canini S, Patrone F. Normal polymorphonuclear neutrophil function in a case of glycogen storage disease type Ib. *Eur J Pediatr*, 1990, 149 : 665-8.
36. Bretscher M. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol*, 1972, 236 : 11-2.
37. Brockhausen I. Clinical aspects of glycoprotein biosynthesis. *Crit Rev Cl Lab Sci*, 1993, 30 : 65-151.
38. Bronowicki JP, Weber-Larivaille F, Gut JP, Doffoel M, Vetter D. Comparaison de l'immunogénicité de la vaccination et de la séroconversion contre le virus de l'hépatite B chez les cirrhotiques alcooliques. *Gastroenterol Clin Biol*, 1997, 21 : 848-53.
39. Bunting M, Harris ES, McIntyre T, Prescott SM, Zimmerman GA. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving  $\beta_2$  integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol*, 2002, 9 : 30-5.
40. Caimi G, Ferrara F, Montana M, Meli F, Canino B, Carollo C, Presti RL. Acute ischemic stroke : polymorphonuclear leukocyte membrane fluidity and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration at baseline and after chemotactic activation. *Stroke*, 2000, 31 : 1578-82.
41. Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, Newsholme EA. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J*, 1990, 269 : 807-14.
42. Calderwood S, Kilpatrick L, Douglas SD, Freedman M, Smith-Whitley K, Rolland M, Kurtzberg J. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor therapy for patients with neutropenia and/or neutrophil dysfunction secondary to glycogen storage disease type 1. *Blood*, 2001, 97: 376-82.



43. Cardin R, D'Errico A, Fiorentino M, Cecchetto A, Naccarato R, Farinati F. Hepatocyte proliferation and apoptosis in relation to oxidative damage in alcohol-related liver disease. *Alcohol Alcohol*, 2002, 37 : 43-48.
44. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 1994, 84: 2068-3101.
45. Carratelli CR, Nuzzo I, bentivoglio C, Galdiero M. CD11a/CD18 and CD11b/CD18 modulation by lipoteichoic acid, N-acetyl-muramyl-alpha-alanyl-D-isoglutamine, muramic acid and protein A from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1996, 16 : 309-15.
46. Casey CA, Nanji A, Ceberdaum AI, Adachi M, Takahashi T. Alcoholic liver disease and apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001, 25 : 49-53.
47. Cavaillon JM. Tumor necrosis factor et lymphotoxines. Dans "Les cytokines" Cavaillon JM. Ed Masson, 1996 : 301-18.
48. Conklyn MJ, Neote K, Showell HJ. Chemokin-dependent regulation of CD11b on specific leukocyte subpopulations in human whole blood : effect of anticoagulant on rantes and MIP-1 beta stimulation. *Cytokine*, 1996; 8: 762-6.
49. Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism and damage to the immune system. A review. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998, 22 : 1927-42.
50. Cooper GM. La surface de la cellule. Dans : *La cellule, une approche moléculaire*. DeBoeck Université, Paris, 1999 : 467-76.
51. Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation : a flow cytometric study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood*, 1993, 81 : 2554-65.
52. Dave JR, Witorsch RJ. Modulation of prolactin binding sites in vitro by membrane fluidizers. Differential effects on plasma membrane and golgi fractions of male and female liver in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 134 : 1122-8.
53. De Chatelet LR, Mulukin D, Mac Call CE. The generation of superoxide anion by various types of phagocytes. *Infect Dis*, 1975, 131 : 443-6.
54. De Clerck LS, De Gendt CM, Bridts CH, Van Osselaer N, Stevens WJ. Expression of neutrophil activation markers and neutrophil adhesion to chondrocytes in rheumatoid arthritis patients : relationship with disease activity. *Res Immunol*, 1995, 146 : 81-7.

55. De Prost D, Sampol J. Cellules sanguines et hémostasie. Dans : Manuel d'hémostasie. Ed par Sampol J. Paris : Elsevier 1995 : 93-106.
56. De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Gritti D, Angoli L, Specchia G. Clinical and angiographic correlates of leukocyte activation in unstable angina. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 26 : 1146-50.
57. Dedhar S, Hanningan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8 : 657-69.
58. Degos F, Duhamel G, Brechot C, Nalpas B, Courouce AM, Tron F, Berthelot P. Hepatitis B vaccination in chronic alcoholics. *J Hepatol*, 1986, 2 : 402-9.
59. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet. Exploration des différentes étapes du fonctionnement des polynucléaires neutrophiles chez les patients diabétiques. *J Mal Vascul*, 1995, 20 : 107-12.
60. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Sun J, Nakada MT, Sullivan KE. Loss of endothelial surface expression of E-selectin in a patient with recurrent infections. *Blood*, 1999, 94 : 884-94.
61. Denny TN, Stein D, Mui T, Scolpino A, Holland B. Quantitative determination of surface antibody binding capacities of immune subsets present in peripheral blood of healthy adult donors. *Cytometry*, 1996, 26 : 265-74.
62. Devaux PF, Zachowski A. Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chem Phys Lipids*, 1994, 73: 107-20.
63. Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, 1991, 30 : 1163-72.
64. Di Rocco M, Borrone C, Dallegri F, Frumento G, Patrone F. Neutropenia and impaired neutrophil function in glycogenosis type Ib. *J Inherited Metab Dis*, 1984, 7: 151-4.
65. Diamond MS, Springer TA. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol*, 1994, 4 : 506-17.
66. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 and its regulation by glycosylation. *Cell*, 1991, 65 : 961-6.
67. Dignat-George F, Poncelet P. Quantification d'antigènes de surface par cytométrie en flux. *Re Fr Lab*, 1996, 287 : 83-110.

68. Dolis D, Moreau C, Zachowski A, Devaux PF. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophys Chem*, 1997, 68 : 221-31.
69. Donadieu J, Bader-Meunier B, Bertrand Y, Lachaux A, Labrune Ph, Gougerot-Pocidal MA, Odièvre M, Gibeaud P, Yver A, Tchernia G, Griscelli C, Dommergues JP. Recombinant human G-CSF (Lenograstim) for infections complications in glycogen storage disease type Ib. Report of 7 cases. *Nouv Rev Fr Hematol*, 1994, 35 : 529-34.
70. Dumas D, Muller S, Padilla JJ, Latger V, Woodard S, Carré MC, Blondel W, Baros F, Viriot ML, Stoltz JF. New trends in optical bioengineering : Applications to cell biology. *Recent Res Devel Optical Engg*, 1999, 2 : 295-315.
71. Elbim C, Prevot MH, Bouscarat F, Franzini E, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA. Impairment of polymorphonuclear neutrophil function in HIV-infected patients. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, 25 : 66-70.
72. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *Jama*, 1987, 257 : 2318-24.
73. Esfahani M, Surbo L, Lund-Katz S, De Place DM, Manigliar R, Alexander JK, Philips MC. Effects of cholesterol and lipoproteins on endocytosis by a monocyte-like cell line. *Bioch Bioph Act*, 1986, 889 : 287-300.
74. Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM. Of Man and Mouse : Leucocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood*, 1999a, 94 : 3281-8.
75. Etzioni A, Tonetti M. Leukocyte adhesion deficiency II-from A to almost Z. *Immun Rev*, 2000, 178 : 138-47.
76. Etzioni A. Loss of endothelial surface expression of E-selectin – a third LAD syndrome. *Blood*, 1999b, 94 : 3956.
77. Etzioni A., Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML, Paulson JC, Gershoni BR. Brief report: recurrent severe infections caused by a novel adhesion deficiency. *N Engl J Med*, 1992, 327 : 1789-92.
78. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL, Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions : evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the  $\beta_2$  integrin CD11b/CD18. *Blood*, 1996, 11 : 4183-94.

79. Farahat N, Lens D, Zomas A, Morilla R, Matutes E, Catovsky D. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukaemic B-cell precursors. *Brit J Haematol*, 1995, 91 : 640-6.
80. Fearon DT, Collins LA. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. *J Immunol*, 1983, 130 : 370-5.
81. Feliu E, Gougerot MA, Hakim J, Cramer E, Auclair C, Rueff B, Boivin P. Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest*, 1977, 7: 571-7.
82. Fischer A, Lisowska GB, Anderson DC, Springer TA. Leucocyte adhesion deficiency: molecular basis and functional consequences. *Immunodeficiency Rev*, 1988, 1 : 39-54.
83. Fischer D, Paraf A. L'hypergammaglobulinémie des cirrheses. *Gastroenterol Clin Biol*, 1980, 4 : 474-85.
84. Forsyth KD, Levinsky RJ. Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Methods*, 1990, 128 : 159-65.
85. Furie MB, Tancinco M, Smith CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemottractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood*, 1991, 78 : 2089-97.
86. Gaffet P, Bettache N, Bienvenüe A. Transverse redistribution of phospholipids during human platelet activation : evidence for a vectorial outflux specific to aminophospholipids. *Biochemistry*, 1995, 34 : 6762-9.
87. Galdiero F, Carratelli CR, Bentivoglio C, Capasso C, Cioffi S, Folgore A, Gorga F, Ianniello R, Mattera S, Nuzzo I. Correlation between modification of membrane phospholipids and some biological activity of lymphocytes, neutrophils and macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1991, 13 : 623-42.
88. Gearing AJH. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-Selectin, ICAM-1 and VCAM-1 : Pathological Significance. *Ann NY Acad. Sci*, 1992, 667 : 321-4.
89. Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E, Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 185 : 1124-9.

90. Gigant C, Latger-Cannard V, Bensoussan D, Feugier P, Stoltz JF. Quantitative expression of adhesion molecules on G-CSF mobilized peripheral blood, bone marrow and cord blood CD34+ cells. *J Hemato Stem Cell Res*, 2001, 10 : 807-14.
91. Gilsanz F, Diez E, Gomez-Tabera C, Martinez Del Pozo A. Chronic ethanol abuse and membrane fluidity changes in liver disease. *Drug Alcohol Depend*, 1992, 29 : 237-43.
92. Gimpl G, Burger K, Fahrenholz F. Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry*, 1997, 36 : 10959-74.
93. Ginaldi L, Matutes E, Farahat N, De Martinis M, Morilla R, Catovsky D. Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies : a quantitative study by flow cytometry. *Brit J Haematol*, 1996, 93 : 921-7.
94. Giron-Gonzales JA, Alvarez-Mon M, Merendez-Caro JL, Manzano L, Abreu L, Yebra M, Durantez-Martinez A. T lymphocytes from alcoholic cirrhotic patients show normal interleukine 2 production but a defective proliferative response to polyclonal mitogens. *Am J Gastroenterol*, 1994, 89 : 767-73.
95. Gitzelmann R, Bosshard NU. Defective neutrophil and monocytes functions in glycogen storage disease type Ib : a literature review. *Eur J Pediatr*, 1993, 152 : 33-8.
96. Glynn P, Coakley R, Kilgallen., O'Neill S. Neutrophil CD11b and soluble ICAM-1 and E-selectin in community acquired pneumonia. *Eur Respi J*, 1999, 13 : 1380-5.
97. Gomez F, Ruiz P, Schreiber AD. Impaired function of macrophage receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis. *N Engl J Med*, 1994, 331 : 1122-8.
98. Gorczynski RM, Wojcik D. Use of MoAbs to block leukocyte adherence to endothelium inhibite allograft rejection. *J Immunol*, 1997, 152 : 2011-9.
99. Gratama JW, D'Hautcourt JL, Mamndy F, Rothe G, Barnett D, Janossy G, Papa S, Schmitz G, Lenkei R. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity : problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry*, 1998, 33 : 166-78.
100. Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, Tedder TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes and their precursor. *J Immunol*, 1990, 145 : 576-84.

101. Hamblin A, Taylor M, Bernhagen J, Shakoor Z, Mayall S, Noble G, McCarthy D. A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leukocyte integrins. *J Immunol Meth.* 1992, 146 : 219-28.
102. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 1995, 91 : 1872-85.
103. Harlan JM. Leukocyte adhesion deficiency syndrome: insights into the molecular basis of leukocyte emigration. *Clin Immunol Immunopath*, 1993, 67 : 16-24.
104. Harris ES, Shigeoka AO, Li W, Adams RH, Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Lorant DE. A novel syndrome of variant leukocyte adhesion deficiency involving defects in adhesion mediated by  $\beta_1$  and  $\beta_2$  integrins. *Blood*, 2001, 97 : 767-76.
105. Haydon G, Lalor PF, Hubscher SG, Adams DH. Lymphocyte recruitment to the liver in alcoholic liver disease. *Alcohol*, 2002, 27 : 29-36.
106. Hermanowski-Vosatka A, Van Strijp JAG, Swiggard WJ, Wright SD. Integrin modulating factor-1 : a lipid that alters the function of leukocyte integrins. *Cell*, 1992, 68 : 341-52.
107. Heron D, Shinitzky M, Hershkowitz M, Samuel D. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 7463.
108. Heron D, Shinitzky M, Samuel D. Alleviation of drug withdrawal symptoms by treatment with a potent mixture of natural lipids. *Eur J Pharmacol*, 1982, 83 : 253-61.
109. Heshka JT, Jones PJ. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. *Life Sci*, 2001, 69 : 987-1003.
110. Hibbs ML, Stacker SA, Springer TA. Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science*, 1991, 251 : 1611-13.
111. Higazi AR, Barghouti II, Ayesk SK, Mayer M, Matzner Y. Inhibition of neutrophil activation by fibrinogen. *Inflammation*, 1994, 18 : 525-35.
112. Higushi H, Kurose I, Kato S, Miura S, Ishii H. Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996, 20 : 340-6.
113. Hirschberg CB, Robbins PW, Abeijon C. Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67 : 49-69.

114. Hoek JB, Rubin E. Alcohol and membrane-associated signal transduction. *Alcohol Alcohol*, 1990, 25 : 143-56.
115. Hogg N, Bates PA. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biology*, 2000, 19 : 211-22.
116. Hogg N, Stewart MP, Scarth SL, Newton R, Shaw JM, Law A, Klein N. A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional  $\beta_2$  integrine Mac-1 and LFA-1. *J Clin Invest*, 1999, 103 : 97-106.
117. Höglund M, Hakansson L, Venge P. Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. *Eur J Haematol*, 1997, 58: 195-202.
118. Holdstock G, Leslie B, Hill S, Tanner A, Wright R. Monocyte function in cirrhosis. *J Clin Pathol*, 1982, 35 : 972-9.
119. Hong F, Kim WH, Tian Z, Jaruga B, Ishac E, Shen X, Gao B. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of bcl-2 and bcl-xL proteins. *Oncogene*, 2002, 21: 32-43.
120. Huang AJ, Manning JE, Bandak TM, Rateau MC, Hanser KR, Silverstein SC. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J Cell Biol*, 1993, 120 :1371-7.
121. Hughes PE, Pfaff M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol*, 1998, 9 : 359-64.
122. Hynes RO. Integrins : versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992, 69 : 11-25.
123. Iber FL. Patients with cirrhosis and liver failure are at risk for bacterial and fungus infection. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94 : 201-3.
124. Ismaili A, Meddings JB, Ratnams S, Sherman PM. Modulation of host cell membrane fluidity : a novel mechanism for preventing bacterial adhesion. *Am J Physiol*, 1999, 277 : 201-8.
125. Jaeschke H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol*, 2002, 27 : 23-7.
126. Jalan R. Les actualités en gastroentérologie – Compte rendu de congrès de "l'American Association for the Study of Liver Diseases- Dallas, 9-13 novembre 2001. Supplément février 2002.

127. Jung TM, Dailey MO. Rapid modulation of homing receptors induced by activators of protein kinase C : receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol*, 1990, 144 : 3130-6.
128. Kakimoto H, Imai Y, Kawata S, Inada M, Ito T, Matsuazawa Y. Altered lipid composition and differential changes in activities of membrane-bound enzymes of erythrocytes in hepatic cirrhosis. *Metabolism*, 1995, 44 : 825-32.
129. Karsan A, Cornejo CJ, Winn RK, Schwartz BR, Way W, Lannir N, Gershoni-Baruch R, Etzioni A, Ochs HD. Leukocyte adhesion deficiency Type II is a generalized defect of de novo GDP-fucose biosynthesis. Endothelial cell fucosylation is not required for neutrophil rolling on human nonlymphoid endothelium. *J Clin Invest*, 1998, 101 : 2438-45.
130. Kassirer M, Zeltser D, Prochorov V, Schoenman G, Frimerman A, Keren G, Shapira I, Miller H, Roth A, Arber N, Eldor A, Berliner S. Increased expression of the CD11b/CD18 antigen on the surface of peripheral white blood cells in patients with ischemic heart disease : further evidence for smoldering inflammation in patients with atherosclerosis. *Am Heart J*, 1999, 138: 555-9.
131. Kerst JM, de Haas M, van der Schoot E, Slaper-Cortenbach ICM, Kleijer M, von dem Borne AEGK, van Oers RHJ. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers : induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. *Blood*, 1993, 82 : 3265-72.
132. Klausner RD, Bhalla DK, Dargsten P, Hoover RL, Karnovsky MJ. Model for capping derived from inhibition of surface receptor capping by free fatty acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 7 : 437-41.
133. Klava A, Windsor AC, Ramsden CW, Guillou PJ. Enhanced polymorphonuclear leukocyte adhesion after surgical injury. *Eur J Surg*, 1997, 163: 747-52.
134. Körner C, Linnebank M, Koch HG, Harms E, von Figura K, Marquardt T. Decreased availability of GDP-L-fucose in a patient with LADII with normal GDP-D-mannose dehydratase and FX protein activities. *J Leukoc Biol*, 1999, 66 : 95-8.
135. Kowen N, Clark M, Cody C, Stanley CA, Baker L, Douglas SD. Impaired chemotaxis and neutrophil function in glycogenosis type Ib. *Pediatric Res*, 1986, 20 : 438-42.



- 136.Kozubski W, Swiderek M, Kloszewska I, Watala C, Gwozdziński K. Platelet membrane fluidity and receptor exposition in patients with Alzheimer's disease. *Neurol Neurochir Pol*, 1999, 33 : 1275-84.
- 137.Kuijpers TW, Tool A., van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJ, Roos D, Verhoeven AJ. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood*, 1991 ; 78 : 1105-11.
- 138.Kuijpers TW, van Lier RAW, Hamann D, de Boer M, Thung LY, Weening RS, Verhoeven AJ, Roos D. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional  $\beta_2$  integrins. *J Clin Invest*, 1997, 100 : 1725-33.
- 139.Kure S, Hou DC, Suzuki Y, Yamagishi A, Hiratsuka M, Fukuda T, Sugie H, Kondo N, Matsubara Y, Narisawa K. Glycogen storage disease type Ib without neutropenia. *J Pediatr*, 2000, 137: 253-6.
- 140.Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Disher D, Ernst JD, Lubin BH. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood*, 1996, 87 : 1179-87.
- 141.La Droitte P, Lamboeuf Y, De Saint Blanquat G. Membrane fatty acid changes and ethanol tolerance in rat and mouse. *Life Sci*, 1984, 35 : 1221-9.
- 142.Lachaux A, Boillot O, Stamm D, Canterino I, Dumontete C, Regnier F, Floret D, Hermier M. Treatment with lenograstim (glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor) and orthopedic liver transplantation for glycogen storage disease type Ib. *J Pediatr*, 1993, 123 : 1005-8.
- 143.Laharrague P, Corberand J, Fillola G, Gleizes B, Gyrard E, Fontanilles AM. Effect of ethanol on human polynuclear neutrophils. In vivo and in vitro study. *Ann Med Interne*, 1985, 136 : 210-2.
- 144.Lange AJ, Arion WJ, Beaudet AL. Type Ib glycogen storage disease is caused by a defect in the glucose-6-phosphate translocase of the microsomal glucose-6-phosphatase system. *J Biol Chem*, 1980, 255 : 8381-4.
- 145.Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1 dependent pathway. *Cell*, 1993, 73 : 1423-30.

146. Latger V, Dumas D, Lecompte T, Potron G., Stoltz JF. Pathologie vasculaire et activation cellulaire : exploration du phénotype cellulaire adhérent par cytométrie quantitative. *J Mal Vascul*, 1999, 24 : 11-8.
147. Latger V, Regnault V, Dumas D, Virion JM, Schooneman JF, Stoltz JF, Lecompte T. Utilisation d'un calibrateur pour quantifier les récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile par cytométrie en flux. *Ann Biol Clin*, 2000, 58 : 337-43.
148. Latger-Cannard V, Regnault V, Dumas D, Nguyen P, Lecompte T, Stoltz JF. Mesure des récepteurs d'adhérence du polynucléaire neutrophile : influence des paramètres pré-analytiques. *J Mal Vascul*, 2000, 25 : 181-6.
149. Latger-Cannard V, Dumas D, Bensoussan D, Stoltz JF. Spatial distribution of the  $\beta_2$  integrin (CD11b/CD18) and L-selectin (CD62L) adherence receptors on human neutrophils by Conventional Optical Scanning Microscopy (COSM). *Biorheology*, 2002. (impression en cours)
150. Latger-Cannard V, Marchand-Arvier M, Vidailhet M, Donadieu J, Vigneron JC, Bordigoni P and the "Registre Français des Neutropénies Chroniques". Neutrophil adherence receptors expression deficiency regressing with G-CSF therapy in a case of glycogen storage disease type Ib. *Eur J Pediatr*, 2002, 161: 87-93.
151. Lavabre-Bertrand T, Janossy G, Ivory K, Teters R, Secker-Walker L, Porwit-MacDonald A. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. CD10 expression. *Cytometry*, 1994, 18 : 209-17.
152. Le Bouteiller P, Mishal Z, Lemonnier FA, Kourilsky FM. Quantification by flow cytometry of HLA Class I molecules at the surface of murine cells transformed by cloned HLA genes. *J Immunol Meth*, 1983, 61 : 301-15.
153. Le Moine O, Marchant A, De Groote D, Azar C, Goldman M, Deviere J. Role of defective monocyte interleukin 10 release in TNF $\alpha$  overproduction in alcoholic cirrhosis. *Hepatology*, 1995, 22 : 1436-9.
154. Leavey PJ, Sellings KS, Thurman G, Elzi D, Hiester A, Silliman CC, Zerbe G, Cohen JJ, Ambruso DR. In vivo treatment with granulocyte colony-stimulating factor results in divergent effects of neutrophil functions measured in vitro. *Blood*, 1998, 11: 4366-74.
155. Lenkei R, Andersson B. Determination of the antibody binding capacity of lymphocyte membrane antigens by flow cytometry in 58 blood donors. *J Immun Meth*, 1995, 183 : 267-77.

156. Lenkei R, Gratama JW, Rothe G, Schmitz G, D'Hautcourt JL, Arekans A, Mandy F, Marti G. Performance of calibration standards for antigen quantification with flow cytometry. *Cytometry*, 1998, 33 : 188-96.
157. Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood*, 1991, 12 : 2553-5.
158. Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Rackow EC. Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14 and IL-2R expression. *Chest*, 1993, 104 : 847-53.
159. Lin RY, Astiz ME, Saxon., Saha DC, Rackow EC. Relationships between plasma cytokine concentrations and leukocyte functional antigen expression in patients with sepsis. *Crit Care Med*, 1994, 22 : 1595-1602.
160. Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hultin P, Schmid I, Matud J, Detels R, Giorgi JV. Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ cells is a marker of poor diagnosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. *Cytometry*, 1996, 26 : 1-7.
161. Lo SK, Lee S, Ramos RA, Lobb R, Rosa M, Chi-Rosso G, Wright SD. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18) on human neutrophils. *J Exp Med*, 1991, 173 : 1493-500.
162. Lobb RR. Integrin- immunoglobulin superfamily interactions in endothelial leukocyte adhesion. In "Adhesion . Its Rôle in Inflammatory Disease.". Ed Harlan JM, Liu DY, 1992 : 1-13.
163. Lübke T, Marquardt T, von Figura K, Körner C. A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the Golgi. *J Biol Chem*, 1999, 274: 25986-9.
164. Luna-Casado L, Diez-Riuz A, Gutierrez-Gea F, Santos-Perez JL, Rico-Irles J, Wachter H, Fuchs D. Increased peripheral mononuclear cells expression of adhesion molecules in alcoholic cirrhosis ; its relation to immune activation. *J Hepatol*, 1997, 27 : 477-83.
165. Luscinskas FW, Cybulsky MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone MA. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion

- molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 1991, 146 : 1617-25.
- 166.Macey MG, Jiang XP, Veys P, McCarthy D, Newland AC. Expression of functional antigens on neutrophils. Effects of preparation. *J Immun Meth*, 1992, 149 : 37-42.
- 167.Macey MG, Wilton JM, Carbon R, Edmonds S, Perry JD, McCarthy D. Leukocyte activation and function-associated antigens in inflammatory disease. *Agents Actions*, 1993, 38 : 39-40.
- 168.Maekawa K, Futami S, Nishida M, Terada T, Inagawa H, Suzuki S, Ono K. Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b. *J Trauma*, 1998, 44 : 460-8.
- 169.Marquardt T, Brune T, Lühn K, Zimmer KP, Körner C, Fabritz L, van der Werft N, Vormoor J, Freeze HH, Louwen F, Biermann B, Harms E, von Figura K, Vestweber D, Koch HG. Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr*, 1999, 134 : 681-8.
- 170.Martinez-Olmos MA, Lopez-Sanroman A, Martin-Vaquero P, Molina-Perez E., Barcena R, Vicente E, Candela A, Palardo-Sanchez LF. Liver transplantation for Type Ib glycogenosis with reversal of cyclic neutropenia. *Clin Nutr*, 2001, 20 : 375-7.
- 171.Matern D, Starzl TE, Arnaout W, Barnard J, Bynon JS, Dhawan A, Hug G, Lachaux A, Smit GP, Chen YT. Liver transplantation for glycogen storage disease type I, III, and IV. *Eur J Pediatr*, 1999, 158 : 43-8.
- 172.Mazzone A, Cusa C, Mazzucchelli I, Vezzoli M, Ottini E, Pacifici R, Zuccaro P, Falcone C. Increased production of inflammatory cytokines in patients with silent myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38 : 1895-901.
- 173.Mazzone A, De Servi S, Mazzucchelli I, Fossati G, Gritti D, Canale C, Cusa C, Ricevuti G. Increased expression of CD11b/CD18 on phagocytes in ischaemic disease: a bridge between inflammation and coagulation. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27: 648-52.
- 174.Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation*, 1993, 88 : 358-63.

175. Mc Gregor JL. Rôle de la P sélectine (CD62L) dans les interactions des cellules endothéliales et des plaquettes activées avec les leucocytes. *Hématologie* 1995, 2 : 83-7.
176. McCarthy D, Taylor M, Bernhagen J, Perry J, Hamblin A. Leukocyte integrin and CR1 expression on peripheral blood leukocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1992, 51 : 307-12.
177. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*, 1999, 19 : 205-19.
178. McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol*, 2002, 27 : 53-61.
179. Mellembakken JR, Aukrust P, Olafsen MK, Ueland T, Hestdal K, Videm V. Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension*, 2002, 39 : 155-60.
180. Michiels C, Arnould T, Remacle J. Rôle clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuses. *Med Sci*, 1994, 10 : 845-853.
181. Mikszta JA, Waltenbaugh C, Kim BS. Impaired antigen presentation by splenocytes of ethanol-consuming C57 BL/6 mice. *Alcohol*, 1995, 12 : 265-71.
182. Minana JB, Gomez-Cambronero L, Lloret A, Pallardo FV, Del Olmo J, Escudero A, Rodrigo JM, Pelliin A, Vina JR, Vina J, Sastre J. Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand : a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*, 2002, 35 : 1205-14.
183. Nanji AA. Apoptosis and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*, 1998, 18 : 187-90.
184. Narisawa K, Igarashi Y, Otomo H, Tada K. A new variant of glycogen storage disease type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978, 83 : 1360-4.
185. Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol*, 2001, 34 : 330-3.
186. Navasa M, Fernandez J, Rodes J. Bacterial infections in liver cirrhosis. *Ital J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 31 : 616-25.
187. Nelson RD, Quie PG, Simmons RL. Chemotaxis under agarose : a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human

- polymorphopolynuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol*, 1975, 115 : 1650-6.
- 188.Noble JM, Thomas TH, Ford GA. Effect of age on plasma membrane asymmetry and membrane fluidity in human leukocytes and platelets. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1999, 54 : 601-6.
- 189.Nourshargh S. Interactions between granulocytes and endothelium. In *Immunological Aspects of the Vascular Endothelium*. Ed by C.O.S Savage, JD Pearson. Cambridge Reviews in Clinical Immunology 1995.
- 190.Nucci M, Abuchowski A. Le sang artificiel. *Pour la science*, 1998, 246: 74-9.
- 191.Nupponen I, Andersson S, Jarvenpaa AL, Kautiainen H, Repo H. Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics*, 2001, 108 : E12.
- 192.Ohsaka A, Saionji K, Sato N, Mori T, Ishimoto K, Inamatsu T. Granulocyte colony-stimulating factor down regulates the surface expression of the human leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils in vivo and in vitro. *Br J Haematol*, 1993, 84: 574-80.
- 193.Oonishi T, Uyesaka N. A new standard fluorescence microsphere for quantitative flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1985, 84 : 143-54.
- 194.Owen J, Bruckdorfer R, Day R, McIntyre N. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J Lipid Res*, 1982, 23 : 124-131.
- 195.Palmer S, Hamblin AS. Increased CD11/CD18 expression on the peripheral blood leukocytes of patients with HIV disease : relationship to disease severity. *Clin Exp Immunol*, 1993, 93 : 344-9.
- 196.Paragh G, Kovacs E, Seres I, Keresztes T, Balogh Z, Szabo J, Teichmann F, Foris G. Altered signal pathway in granulocytes from patients with hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, 1999, 40 : 1728-33.
- 197.Pardi R. "Inside-out" and "outside-in" mechanisms in leukocyte adhesion. *FCI* 1994, 2 :136-46.
- 198.Parlesak A, Schafer C, Schuz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol*, 2000, 32 : 742-7.

199. Paulson JC. Sélectin/Carbohydrate-mediated adhesion of leukocytes. In "Adhesion . Its Rôle in Inflammatory Disease.". Ed Harlan JM, Liu DY, 1992 : 19-37.
200. Peloquin RG, Fay SP, Henderson LO, Meredith NK, Powell JP, Vogt RF Evaluation of Ortho Absolute Control : a stable whole blood quality control material for immunophenotyping. Cytometry, 1994, 18 : 176 [Abstract].
201. Peterson SW, Angelico M, Masella R, Foster K, Gandin C, Cantafora A. Altered insulin receptor processing and membrane lipid composition in erythrocytes of cirrhotic patients. Ital J Gastroenterol, 1992, 24 : 65-71.
202. Phillips ML, Schwartz BR, Etzioni A, Bayer R, Ochs HD, Paulson JC, Harlan JM. Neutrophil adhesion in leucocyte adhesion deficiency syndrome type II. J Clin Invest, 1995, 96 : 2898-2906.
203. Piva E, De Toni S, Bovo C, Bordugo A, Burlina AB, Plebani M. NADPH oxydase activity and chemotaxis by neutrophils in two patients with glycogen storage disease type Ib treated with recombinant human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. Haematologica, 1996, 81 : 148-51.
204. Poncelet P, Carayon P. Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. J Immunol Methods, 1985, 85 : 65-74.
205. Poncelet P, George F, Papa S, Lanza F. Quantification of hemopoietic cell antigens in flow cytometry. Eur J Histochem, 1996, 40 : 15-32.
206. Ponvert C. Les cytokines. Sem Hôp Paris 1995 ; 71 : n°11-12, 355-63.
207. Price TH, Ochs HD, Gershoni-Baruch R, Harlan JM, Etzioni A. *In vivo* neutrophil studies in a patient with leucocyte adhesion deficiency type II. Blood, 1995, 84 : 1635-9.
208. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. Hepatology, 1986, 6 : 252-62.
209. Rajkovic IA, Yousif-Kadaru AG, Wyke RJ, Williams R. Polymorphonuclear leukocyte locomotion and aggregation in patients with alcoholic liver disease. Clin Exp Immunol, 1984, 58 : 654-62.
210. Reinhardt PH, Elliot J, Kubes P. Neutrophils can adhere via  $\alpha_4\beta_1$ -integrin under flow conditions. Blood, 1997, 89 : 3837-46.

- 211.Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M. Anticoagulant selection influences flow cytometry determination of CD11b upregulation in vivo and ex vivo. *J Immunol Methods*, 1995, 185 : 65-79.
- 212.Repo H, Jansson SE, Leirisalo-Repo M. Flow cytometric determination of CD11b upregulation in vivo. *J Immunol Methods*, 1993, 164 : 193-202.
- 213.Reuss-Borst MA, Ning Y, Klein G, Muller CA. The vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) is expressed on a subset of lymphoid and myeloid leukaemias. *Brit J Haematol*, 1995, 89 : 299-305.
- 214.Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol*, 2000, 32 : 142-53.
- 215.Roos D, Meischl C, de Boer M, Simsek S, Weening RS, Sanal O, Tezcan I, Güngör T, Law SK. Genetic analysis of patients with leukocyte adhesion deficiency : genomic sequencing reveals otherwise undetectable mutations. *Exp Hematol*, 2002, 30 : 252-61.
- 216.Rosa H, Silverio AO, Perini RF, Arruda CB. Bacterial infections in cirrhotic patients and its relationship with alcohol. *Am J Gastroenterol*, 2000, 85 : 1290-3.
- 217.Roselle G, Mendenhall C, Chedid A, Moritz T, Gartside P. The veterans affairs cooperative study groups 119 and 275. Alcohol modulation of immune function: clinical and experimental data. *Alcohol Clin Exp Res*, 1995, 19 : 551-4.
- 218.Royer C. Les interactions cellulaires lors de la réponse immunitaire spécifique. *La gazette de la Transfusion*, 1997, 137 : 47-67.
- 219.Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Losche W. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*, 2002, 17: 263-8.
- 220.Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med*, 2000, 108 : 567-74.
- 221.Santos-Perez JL, Diez-Riuz A, Luna-Casado L, Soto-Mas JA, Wachter H, Fuchs D, Guitterez-Gea F. T cell activation, expression of adhesion molecules and response to ethanol in alcoholic cirrhosis. *Immunol Letters*, 1996, 50 : 179-83.
- 222.Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectine is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol*, 1992, 119 : 229-35.
- 223.Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinskas FW, Gimbrone MA, McIntyre BW, Boehner BS. IL-4



- induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol*, 1992, 148 : 1086-92.
- 224.Schroten H, Roesler J, Breidenbach T, Wendel U, Eisner J, Schweitzer S, Zeidler C, Burdach S, Lohmann-Matthes M, Wahn V, Welte K. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors for treatment of neutropenia in glycogen storage disease type Ib. *J Pediatr*, 1991, 119 : 748-54.
- 225.Schwartz A, Fernandez-Repollet E. Development of clinical standards for flow cytometry. *Annals of New York Academic Science*, 1993, 677 : 28-39.
- 226.Shakoor Z, Hamblin A. Increased CD11/CD18 expression on peripheral blood leukocytes of patients with sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*, 1992, 90 : 99-105.
- 227.Shaw JM, Al-Shamkhani A, Boxer LA, Buckley CD, Dodds AW, Klein N, Nolan SM, Roberts I, Roos D, Scarth SL, Simmons DL, Tan SM, Law SK. Characterization of four CD18 mutants in leukocyte adhesion deficient (LAD) patients with differential capacities to support expression and function of the CD11/CD18 integrins. *Clin Exp Immunol*, 2001, 126 : 311-8.
- 228.Shinitzky M. *Physiology of membrane fluidity*. Boca Raton: CRC PRESS, 1984.
- 229.Shiraishi K, Matsuzaki S, Ishida H, Nakazawa H. Impaired erythrocyte deformability and membrane fluidity in alcoholic liver disease : participation in disturbed hepatic microcirculation. *Alcohol alcohol*, 1993, 28 : 59-64.
- 230.Simmons D, Makgoba MW, Seed B. ICAM-1, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature*, 1988, 331 : 624-8.
- 231.Sims PJ, Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost*, 2001, 86 : 266-75.
- 232.Smith CV, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalo MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Anderson DC. Recognition of an endothelial determinant for CD-18 dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest*, 1988, 83 : 1746-56.
- 233.Smith CW. Transendothelial migration. In "Adhesion ; its Role in Inflammatory Disease". Ed by Harlan JM, Liu DY, 1992 : 83-115.
- 234.Smith KB, Ellis SA. Standardization of a procedure for quantifying surface antigens by indirect immunofluorescence. *J Immun Meth*, 1999, 228 : 29-36.

- 235.Sooksawate T, Simmonds MA. Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABA(A) receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *Neuropharmacology*, 2001b, 40 : 178-84.
- 236.Sooksawate T, Simmonds MA. Influence of membrane cholesterol on modulation of the GABA(A) receptor by neuroactives steroids and other potentiators. *Br J Pharmacol*, 2001a, 134 : 1303-11.
- 237.Spertini O, Kansas GS, Munro JM. Regulation of leukocyte migration by activation of the leucocyte adhesion molecule-1 selectin. *Nature*, 1991, 349 : 691-4.
- 238.Spiekermann K, Roesler J, Emmendoerffer A, Elsner J, Welte K. Functional features of neutrophils induced by G-CSF and GM-CSF treatment : differential effects and clinical implications. *Leukemia*, 1997, 11 : 466-78.
- 239.Spinozzi F, Agea E, Basotti G, Belia S, Rondoni F, Broccucci L, Solinas A, Gerli R, Bertotto A. Ethanol-specific impairment of T lymphocyte activation is caused by transitory block in signal transduction pathways. *Gastroenterology*, 1993, 105 : 1490-1501.
- 240.Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature*, 1989, 339 : 61-5.
- 241.Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*, 1988, 52 : 925-30.
- 242.Stelzer G. Analysis of leukocyte function by flow cytometry techniques. *Cytometry*, 1988, 9 : 52-9.
- 243.Sturla L, Etzioni A, Bisso A, Zanardi D, De Flora G, Silengo L, De Flora A, Tonetti M. Defective intracellular activity of GDP-D-mannose-4-6-dehydratase in leukocyte adhesion type II syndrome. *FEBS Lett*, 1998, 429 : 274-8.
- 244.Styrt B, Schwartz MA, Klempner MS. Calcium release associated with discharge of specific granule contents from human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 154 : 1308-13.
- 245.Szabo G, Verma B, Catalano D. Selective inhibition of antigen-specific T lymphocyte proliferation by acute ethanol exposure : the role of impaired monocyte antigen presentation capacity and mediator production. *J Leukoc Biol*, 1993, 54 : 534-44.

- 246.Szabo G. Monocytes, alcohol use and altered immunity. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998, 22 : 216-9.
- 247.Taieb J, Mathurin P, Elbim C, Cluzel P, Arce-Vicioso M, Bernard B, Opolon P, Gougerot-Pocidal MA, Poynard T, Chollet-Martin S. Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis : effects of corticosteroids. *J Hepatol*, 2000, 32 : 579-86.
- 248.Tait J, Smith C, Wood BL. Measurement of phosphatidylserine exposure in leukocytes and platelets by whole-blood flow cytometry with annexin V. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 1999, 25: 271-8.
- 249.Takahashi T, So-Wan T, Kamimura T, Asakura H. Infiltrating polymorphonuclear leukocytes and apoptotic bodies derived from hepatocytes but not from ballooning hepatocytes containing Mallory bodies show nuclear DNA fragmentation in alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000, 24 : 68-73.
- 250.Taraboletti G, Perin L, Bottazzi B, Mantovani A, Giavazzi R, Salmona M. Membrane fluidity affects tumor-cell motility, invasion and lung-colonizing potential. *Int J Cancer*, 1989, 44 : 707-13.
- 251.Thomas C, Le Deist DF, Cavazzana CM, Benkerrou M, Haddad E, Blache S, Hartmann W, Friedrich W, Fischer A. Results of allogeneic bone marrow transplantation in patients with leukocyte adhesion deficiency. *Blood*, 1995, 86 : 1629-35.
- 252.Thornhill MH, Kyan-Aung U, Haskard DO. IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils. *J Immunol*, 1990, 144 : 3160-5.
- 253.Todd RF, Arnaout MA, Rosin RE, Crowley CA, Peters WA, Babior BM. Subcellular location of the large subunit of Mol (Mola ; formerly gp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion. *J Clin Invest*, 1984, 74 : 1280-90.
- 254.Tomonaga A, Hirota M, Snyderman R. Effect of membrane fluidizers on the number and affinity of chemotactic factor receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *Microbiol Immunol*, 1983, 27 : 961-72.
- 255.Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scoot syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood*, 1996, 84 : 1409-15.

256. Toussaint M, Latger-Cannard V, Caron A, Lecompte T, Stoltz JF, Vigneron C, Menu P. Effect of three hemoglobin-based oxygen-carrying solutions on neutrophil activation in vitro : quantitative measurement of the expression of adherence receptors. *Transfusion*, 2001, 41 : 226-231.
257. Tracy PB, Eide LL, Mann KG. Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations. *J Biol Chem*, 1985, 260 : 2119-24.
258. Tracy PB. Regulation of thrombin generation at cell surfaces. *Semin Thromb Haemost*, 1988, 14 : 227-33.
259. Van Epps DE, Strickland RG, Williams RC. Inhibitors of leukocyte chemotaxis in alcoholic liver disease. *Am J Med*, 1975, 59 : 200-7.
260. Vedder NB, Harlan JM. Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J Clin Invest*, 1988, 81 : 676-82.
261. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Chen YT, de Barsey T, de Lonley P, Dionisi-Vici C, Fenske CD, Lee PJ, Leonard JV, Maire I, McConkie-Rosell A, Schweitzer S, Vikkula M, Schaffingen EV. A gene on chromosome 11q23 coding for a putative glucose 6-phosphatase translocase is mutated in glycogen storage disease type Ib and type Ic. *Am J Hum Genet*, 1998, 63 : 976-83.
262. Verhoeven AJ, Visser G, Zwieten RV, Gruszczynska B, Tien Poll-The DW, Smit GPA. A convenient diagnostic function test of peripheral blood neutrophils in glycogen storage disease type Ib. *Pediatr Res*, 1999, 45 : 881-5.
263. Visser G, Rake JP, Fernandes J, Labrune P, Leonard JV, Moses S, Ullrich K, Smit PA. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I. *J Pediatr*, 2000, 137 : 187-91.
264. Von Andrian UH, Berger EM, Ramezani L, Chambers JD, Ochs HD, Harlan JM, Paulson JC, Etzioni A, Arfors KE. *In vivo* behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes. *J Clin Invest*, 1993, 91 : 2893-7.
265. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Polymorphonuclear leukocyte activation. An early marker of the postsurgical sepsis response. *Arch Surg*, 1993, 128 : 390-5.

266. Waltenbauch C, Petreson JD. Ethanol impairs the induction of delayed hypersensitivity in C57BL/6 mice. *Alcohol*, 1997, 14 : 149-53.
267. Wang S, Smith P, Lovejoy M, Bowden J, Alpers J, Forsyth KD. Shedding of L-selectin and PECAM-1 and upregulation of Mac-1 and ICAM-1 on neutrophils in RSV bronchiolitis. *Lung Cell Mol Physiol*, 1998, 275 : 983-9.
268. Weirich E, Rabin RL, Maldonado Y, Benitz W, Modler S, Herzenberg LA. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *J Pediatr*, 1998, 132 : 445-51.
269. Williamson P, Bevers EM, Smeets EF, Comfurius P, Schlegel RA, Zwaal RFA. Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry*, 1995, 34 : 10448-55.
270. Wolach B, Ben Dor M, Chomsky O, Gavrieli R, Shinitzky M. Improved chemotactic ability of neonatal polymorphonuclear cells induced by mild membrane rigidification. *J Leukoc Biol*, 1992, 51 : 324-8.
271. Wong K, Qiu Y, Hyun W, Nixon R, VanCleave J, Sanchez-Salazar J, Prusiner SB, DeArmond SJ. Decreased receptor-mediated calcium response in prion-infected cells correlates with decreased membrane fluidity and IP3 release. *Neurology*, 1996, 47 : 741-50.
272. Yasui K, Masuda M, Matsuoka T, Yamazaki M, Akabane T, Hasui M, Kobayashi Y, Murata K. Abnormal membrane fluidity as a cause of impaired functional dynamics of chemoattractants receptors on neonatal polymorphonuclear leukocytes: lack of modulation of the receptors by a membrane fluidizer. *Pediatr Res*, 1988, 24 : 442-6.
273. Yasui K, Masuda M, Tsuno T, Matsuoka T, Komiyama A, Akabane T, Murata K. An increased in polymorphonuclear leukocyte chemotaxis accompanied by a change in the membrane fluidity with age during childhood. *Clin Exp Immunol*, 1990, 81 : 156-9.
274. Yong K, Addison IE, Johnson B, Webster AD, Linch DC. Role of leucocyte integrins in phagocyte responses to granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): in vitro and in vivo studies on leucocyte adhesion deficiency neutrophils. *Br J Haematol*, 1991, 77 : 150-7.
275. Yong K, Linch DC. Differential effects of granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors on neutrophil adhesion in vitro and in vivo. *Eur J Haematol*, 1992, 49 : 251-9.

276. Youssef PP, Mantzioris BX, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ, Smiyh MD. Effects of ex vivo manipulation on the expression of cell adhesion molecules on neutrophils. *J Immunol Methods*, 1995, 186 : 217-24.
277. Yuli I, Tomonaga A, Synderman R. Chemoattractant receptor functions in human polymorphonuclear leukocytes are divergently altered by membrane fluidizers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79 : 5906-10.
278. Yuo A, Kitagawa S, Ohsaka A, Ohta M, Miyazono K, Okabe T, Urabe A, Saito M, Saito M, Takaku F. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as an activator of human granulocytes : potentiation of responses triggered by receptor-mediated agonists and stimulation of C3bi receptor expression and adherence. *Blood*, 1989, 74 : 2144-9.
279. Zimmerman ML, Daleke DL. Regulation of a candidate aminophospholipid-transporting ATPase by lipid. *Biochemistry*, 1993, 32 : 12257-63.
280. Zioli M, Tepper M, Lohez M, Arcangeli G, Ganne N, Christidis C, Trinchet JC, Beaugrand M, Guillet JG, Guettier C. Clinical and biological relevance of hepatocytes apoptosis in alcoholic hepatitis. *J Hepatol*, 2001, 34 : 254-60.
281. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Mechanism and function of changes in membrane phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochem Soc Trans*, 1993, 21 : 248-53.
282. Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 1997, 89 : 1121-32.

## ANNEXES

## **CELLSCAN**

### **MICROSCOPIE CONVENTIONNELLE A SECTION OPTIQUE ET DECONVOLUTION 3D-ITERATIVE**

#### **I.) Présentation générale :**

Pour toute demande de conseils relatifs à l'utilisation pratique du Cellscan, il est considéré que chaque utilisateur a parcouru les notices d'utilisation du Cellscan, CellView et EPR server, disponibles auprès du responsable.

##### **I.a) Introduction**

Un microscope optique conventionnel associé à un dispositif de déplacement axial nanométrique et à de puissants algorithmes de restauration et de reconstruction d'images permet de visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions. L'objet est illuminé en entier (lampe), à la différence de l'approche confocale (laser).

Cette technique a été développée pour contourner les problèmes liés à l'utilisation de la microscopie confocale soit :

- une vitesse de balayage du laser insuffisante pour suivre des cinétiques rapides (ex: Ca<sup>2+</sup>)
- une concentration du faisceau laser en un point de focalisation entraînant une photodégradation du marqueur sonde.
- un faible rendement quantique des capteurs : 0,1 à 0,35 pour un photomultiplicateur et 0,6 à 0,8 pour des caméras de type SIT ou CCD.

##### **I.b) Principe**

Cette technique utilise un microscope optique conventionnel Olympus IX-70 inversé associé à un module d'acquisition et à un module de traitement.

Le système Cellscan est compatible avec tout type de microscopes (modèle et marque). Un système de déplacement piezoélectrique est intercalé entre l'objectif et la tourelle porte-objectifs.

- Piézo-électrique: Physik Instrumente (PI), type P-721.1, plage :  $\pm 50 \mu\text{m}$ ; pas minimum :  $0,25 \mu\text{m}$  ( $0,125 \mu\text{m}$  dans certains cas).  
Pas minimum avant asservissement : 100 nm.
- Obturateur Unblitz Electronic, Vincent Associates (temps acquisition minimum : 0,1 s).
- Tourelle porte-filtres.
- Micro-ordinateur Pentium DELL OPtiGX pro 200 MHz, 320 Mo RAM, Disque dur.
- Lecteurs Iomega ZIP (100 Mo) et JAZZ (1 et 2 Go) et Graveur CD.
- Système d'exploitation : Microsoft Windows 95.
- Logiciel d'acquisition par coupes sériées Cellview.

Une série d'images 2D est acquise en déplaçant le plan focal à travers l'objet et chacune des images 2D contient des informations de son plan focal (partie "nette") et de tous les autres plans (partie "floue").

La partie "nette" de l'image correspond aux informations relatives au plan focal, le "flou" dans l'image provient des informations de tous les autres plans.

Ces informations peuvent être séparées par traitement d'image afin d'estimer la vraie structure 3D de l'objet étudié.

#### **II.) Etapes**

La procédure suit 3 étapes :

##### **II.a) acquisition de coupes 2-D (module d'acquisition)**



Le découpage optique consiste à déplacer le plan focal à travers l'échantillon, grâce à un système de déplacement en z (piezo-électrique, figure 1) contrôlé par ordinateur. Des images sont acquises à chaque position le long de l'axe optique (figure 2).



Figure 1 : Système de nanodéplacement piézo monté sur l'objectif 2D par sectionnement optique au point dans l'axe optique).

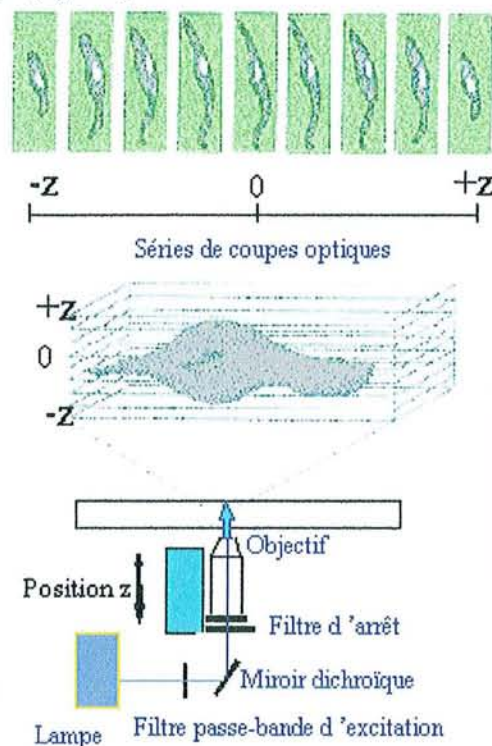
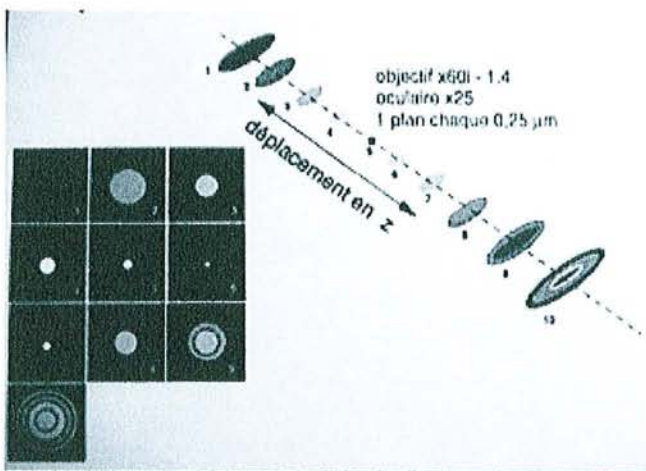


Figure 2 : Acquisition des coupes dérivées (déplacement du plan de mise au point).

**II.b) Déflouage des coupes 2-D (module de traitement)**

En microscopie optique, chaque image contient des informations des plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation. Il a été déterminé qu'environ 1% à 2% de l'information provenait effectivement de ce plan. Afin de supprimer l'information hors plan de focalisation, il est nécessaire de bien connaître les propriétés optiques de formation d'images (Figure 4) en mesurant ou calculant la fonction de transfert optique (ou point spread function, PSF) du système complet (microscope/détecteur). Le volume de données est traité informatiquement par des algorithmes de déconvolution, fondés sur l'équation classique de formation optique des images en utilisant la fonction de transfert préalablement déterminée (voir restauration d'images).



microsphère

Exemple de Disques d'Airy d'une

Figure 4: Représentation des clichés de diffraction (disque d'Airy) dans l'axe z.

### II.c) Restauration d'images

Le traitement d'image concerne la manipulation et l'analyse d'image (restauration, reconstruction et réhaussement ; numérisation et compression ; description et reconnaissance de formes). Le but de la restauration d'image est de retrouver la scène originelle à partir d'observations dégradées (Figure 5). Ces techniques sont orientées vers la modélisation des phénomènes de dégradation (défocalisation, bruit) et l'application de procédures inverses afin d'obtenir une approximation de la scène originelle. Les différentes approches de restauration dépendent de l'hypothèse particulière faite à propos du modèle de dégradation et de formation de l'image (modèle linéaire ou non linéaire avec un bruit additif ou dépendant du signal). Les origines mathématiques de la restauration d'image sont intimement liées au domaine des équations intégrales car le principe physique d'un modèle linéaire de formation d'image peut se décrire par une intégrale de convolution. Le problème qui est à la base de la restauration d'image est de construire une estimée de l'objet observé en utilisant l'image de la PSF.

$$g = h \otimes f + n$$

$g$  : image formée à travers le système ,  $h$  : PSF,  $\otimes$  : symbole de convolution ,  $f$  : objet réel et  $n$  : sources de bruit.

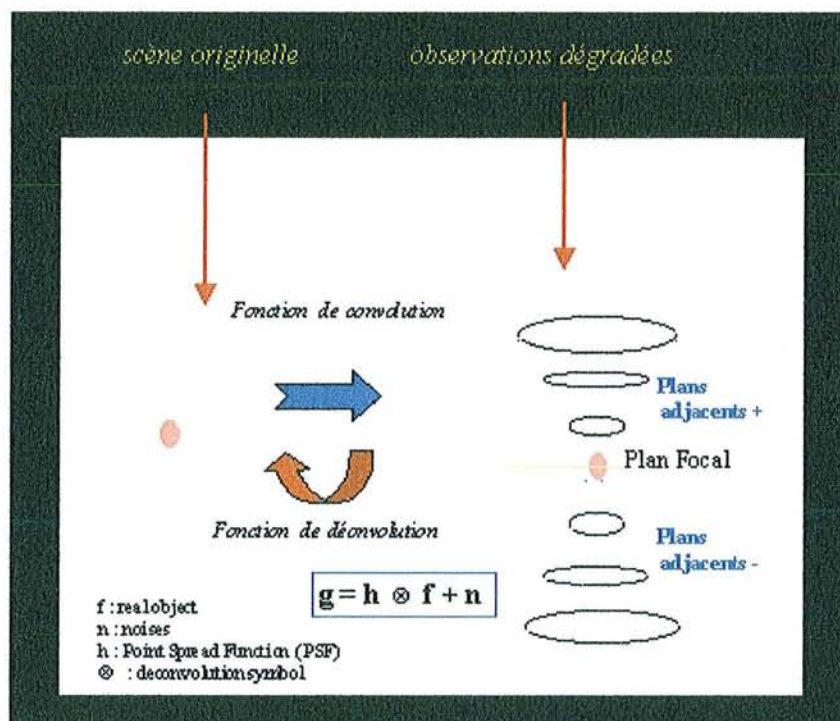


Figure 5 : Restauration d'image par déconvolution 3D itérative.

### Fonction de transfert optique

La fonction de transfert optique décrit comment une source ponctuelle est déformée lorsqu'elle est imagée par un système optique. La source ponctuelle est en général transformée en une tâche diffuse qui est due à la limite de diffraction du système (voir annexe). Elle dépend de plusieurs paramètres (ouverture numérique de l'objectif, optiques, alignement de la source d'excitation, indice de réfraction du milieu intra-échantillon et du milieu à immersion, longueur d'onde d'émission...).

La réponse en fréquence, ou fonction de transfert optique (OTF) est fréquemment utilisée pour caractériser un système optique. L'OTF 3D est la transformée de Fourier en trois dimensions de la PSF.

### Mesure de la fonction de transfert

La PSF est généralement mesurée à partir de billes fluorescentes dont le diamètre est inférieur à la limite de résolution du système.



Images en coupes s riees en microscopie de fluorescence. On fait l'acquisition d'un ensemble d'images 2D en déplaçant le plan focal jusqu'à ce que l'on ait travers  tout l'objet. La modélisation de la chaîne d'acquisition complète permettra de traiter ces images afin d'obtenir une estimée 3D de l'objet.

### **Conditons non-standard**

Les principes énoncés ci-dessus sont valables dans des conditions d'utilisation dites standard. Les conditions deviennent non-standard dès que l'un des paramètres ( paisseur et indice de l'huile ou de la lamelle, position de l'objet) est modifié :

- l'épaisseur des lamelles peut varier de 0,13   0,19 mm d'une série à l'autre. L'indice de réfraction des lamelles change selon le type de verre utilisé dans leur fabrication.

- L'indice de réfraction de l'huile utilisée (pour immersion) varie avec la température.

- Pour l'étude des spécimens biologiques, souvent épais (> 5  $\mu\text{m}$ ), comparés à la profondeur de champ du microscope (0,4  $\mu\text{m}$  environ à 530 nm), l'indice de réfraction est variable (plus proche de l'eau  $n=1,33$ , que de l'huile à immersion  $n=1,516$ ).

Le chemin optique des rayons traversants un tel système est diff rent de celui emprunté par les rayons correspondant à un système standard. De plus, une onde provenant d'une source ponctuelle positionnée à une certaine profondeur dans le spécimen n'est plus sphérique et l'image 3D comportera alors des aberrations sphériques.

### **Précautions à prendre lors des mesures**

Une source de lumière d'excitation stable est essentielle à la mesure de spécimens fluorescents. Pour une lampe à vapeur de mercure, le temps de préchauffage est d'une trentaine de minutes environ avant que les conditions optimales d'utilisation ne soient atteintes. Les variations à court terme sont dues aux papillotements de l'arc au niveau des électrodes qui peuvent alors produire un "papillotement" de la lumière. Ce phénomène est amplifié lors du vieillissement de la lampe (après 200 heures d'utilisation).

L'homogénéité de l'éclairage du champ de mesure (en terme d'intensité et de longueur d'onde) est également à vérifier. Celle-ci dépend de l'alignement optique du système d'illumination, du degré de focalisation de la lentille de projection vers le plan image de sortie -pupille de sortie dans un microscope à épifluorescence). Le centrage de la lampe et l'ajustement de la lentille du collecteur sont réalisés en observant l'image projetée sur une feuille blanche placée dans le chemin de la lumière après la lentille de projection.

Toute lumière extérieure parasite est à supprimer, et les manipulations s'effectue à l'obscurité ou en cherchant à minimiser certains éclairages (lumière des moniteurs, voyants de contrôle...).

Une table anti-vibration est recommandée pour éviter les vibrations mécaniques.

Le spécimen doit de préférence être repéré sous une lumière de longueur d'onde plus grande pour limiter le fading. On peut aussi utiliser la lecture par contraste de phase ( clairage en lumière blanche au dessus de la préparation).

La mesure de l'intensité de fluorescence du standard de référence doit, en toute rigueur, être réalisée sous les mêmes conditions que le spécimen :

- taille du standard de référence
- spectre d'excitation et d'émission de fluorescence
- pas de fading pendant la mesure
- quantité de fluorophore connue avec précision

### **Erreurs de mesure**

- Le photobleaching qui caractérise la perte de fluorescence du spécimen pendant l'excitation.
- La température
- Les poussières fluorescentes sur l'optique du microscope
- Le quenching de concentration ou "effet de peau"
- Le transfert d'énergie

- Une répartition non-uniforme de la sonde dans le champ de mesure
- Le bruit de fond (courant d'obscurité de la caméra, bruit électronique dans le système de mesures, lumière parasite d'excitation, lumière parasite due à des fuites dans le système optique, autofluorescence de l'optique, autofluorescence du spécimen).

### **Documents et logiciels archivés**

Logiciels disponibles mais versions antérieures (pouvant présenter des fonctionnalités intéressantes non reprises dans les versions ultérieures)

Trois versions de CellView sont disponibles :

**Ver.2.1** : Première version. Logiciel sobre, complet et sans problèmes particuliers si ce n'est l'impossibilité d'acquérir un ensemble de plans dont la taille image totale dépasse 16 MB.

**Ver 2.1.3.** : Interface légèrement différente de la version 2.1. La gestion des curseurs pose des problèmes (piézo : 0.01  $\mu\text{m}$ , intégration : 0.01 s pour des limites inférieures respectivement de 0.25  $\mu\text{m}$  et 0.1 s). Même limitation au niveau de la taille image que la version précédente.

**Ver 2.5.** Il s'agit d'une version bêta qui permet l'acquisition d'une image sans restriction du nombre de plans. La taille mémoire (RAM) et la capacité du disque de stockage restent des limites à ne pas dépasser (25 MB).

Il est recommandé d'utiliser la version 2.1.30 sauf avis contraire. Ces trois versions fonctionnent avec le logiciel EPR.

### **Configuration logicielle :**

Avant toute expérience, s'assurer que les paramètres du fichier de configuration sont conformes aux paramètres de l'objectif (ex: x100, N.A: 0,95) et figurent bien sur l'interface CellView.

### **Calibration logicielle :**

Toute modification matérielle en particulier un changement d'objectif doit être suivie par une nouvelle calibration. La correspondance pixel /  $\mu\text{m}$  est une constante (pour chaque objectif) et tient compte du binning (ex: 0.24  $\mu\text{m}$ /pixel en binning 2 pour un objectif 100/0.95 et 0.12  $\mu\text{m}$ /pixel en binning 1). Cette correspondance est utilisée lors de la reconstruction du volume.

### **Mode d'utilisation 2D ou 3D :**

3 modes d'utilisation du CellScan sont disponibles : 2D, Enhanced-2D et 3D.

Les deux premiers modes s'utilisent en fixant le temps d'intégration de la caméra ( $> 0.1$  s), les répétitions et les délais entre chaque série, et ceci pour chaque filtre (cinétique ou marquage multiple). Le mode Enhanced-2D produit une déconvolution rapide à partir du plan focal et quatre plans adjacents (2 inférieurs et 2 supérieurs). Ce mode nécessite un fichier PSF.

En mode 3-D; les curseurs répétitions et délais ne sont pas actifs (pas de cinétique).

### **Déconvolution EPR**

Sur le principe des acquisitions par "coupes optiques", le système CellScan met en œuvre une étape de déconvolution numérique à l'aide d'algorithmes. Cellscan fait appel à une technologie de pointe en matière de corrections d'image : l'E.P.R ("Exhaustive Photon Reassignment" ou restitution quantitative des photons issus d'un point source à leur plan d'origine. Elle consiste en une minimisation au sens des moindres carrés avec contraintes, qui conduit à une déconvolution 3D itérative. Cette méthode de restauration d'image est née de la collaboration du Pr.Fay (University of Massachusetts Medical Center) et d'un industriel CSPI-Scanalytics, IPLAB actuellement. Cet algorithme est un des premiers mis sur le marché et donne de bons résultats à condition de ne pas sortir de son domaine de validité. Il est très utilisé en restauration d'images de fluorescence. L'algorithme nécessite la connaissance préalable de la PSF du système, mesurée en plusieurs points du champ à l'aide de sources ponctuelles calibrées afin d'évaluer les déformations spécifiques (aberration) du système complet. Cette fonction décrit la façon dont le système optique déforme le signal d'un

objet ponctuel qui a son origine au-dessus ou au-dessous du plan de netteté. Pour chaque image, les photons "défocalisés" sont évalués et ré-insérés à leur point d'origine. Dans la méthode de l'E.P.R, les propriétés de distorsion et de profondeur de champ du microscope sont analysées et réversées mathématiquement afin d'obtenir des images plus nettes et plus contrastées.

Principe : on cherche à minimiser la fonction suivante :

avec les contraintes d'un espace convexe:

La qualité du déflouage (déconvolution des plans 2D à l'aide de l'algorithme EPR) dépend directement des paramètres : convergence (10-5 recommandé), itération (entre 20 et 100), lissage (15) et essentiellement de la qualité du fichier PSF.

### **PSF**

La PSF (réponse impulsionnelle) caractérise la fonction de transfert du microscope pour des conditions expérimentales particulières, propres à chaque expérience (incrément entre chaque plan, O.N, milieu de montage, objectif, filtres, sondes fluorescentes, longueurs d'ondes...). On utilise des billes fluorescentes en latex dont la longueur d'onde d'émission est la même que celle des spécimens biologiques à étudier. La taille des billes doit être inférieure à la limite de résolution du microscope.

Théoriquement, elles devraient être aussi petites que possible et posséder l'intensité la plus forte possible (quasi Dirac). Dans la littérature, on adopte communément le compromis suivant : le diamètre de la bille ( $D_{\text{bille}}$ ) doit être inférieur ou égal à la moitié du diamètre du premier disque d'Airy ou encore  $D_{\text{bille}} = 0,61 (\lambda/NA)$ .

Une fois le diamètre de la bille déterminé en fonction de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique ( $D_{\text{bille}} \approx 0,25 \mu\text{m}$  pour  $\lambda=530 \text{ nm}$  et  $NA=1,25$ ), la préparation de billes (suffisamment diluée) est placée sur la lame (ou entre lame et lamelles, comme le spécimen). L'acquisition des données s'effectue selon la procédure détaillée en annexe. On fait l'acquisition de la PSF du bas vers le haut de la bille afin de minimiser l'influence du bleaching. La normalisation permet d'avoir la même quantité d'énergie lumineuse dans chacun des plans et de compenser un éventuel bleaching du signal et/ou le papillotement de la source d'excitation.

Bien que certaines règles aient été établies de manière à obtenir des fichiers PSF de bonne qualité (cf.annexe), seule la pratique et l'expérience permettent d'estimer la validité de tels fichiers (en coupe XZ ou YZ).

### Profondeur de champ et échantillonnage 3D

La profondeur de champ d'un objectif peut être exprimée selon :

$$D = \lambda / (4n \sin^2(a/2)) \text{ avec } a = \sin^{-1} (NA/n)$$

La profondeur de champ représente la distance physique le long de l'axe optique à travers laquelle le spécimen biologique fluorescent observé se trouve focalisé. Il s'agit du déplacement possible selon l'axe z d'un point de l'objet avant que l'image ne change (voir annexe). Pour un objectif x100,  $NA=1,25$  et  $n=1,515$ , pour  $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $D = 0,4 \mu\text{m}$ . Certains auteurs considèrent qu'il n'est pas utile d'échantillonner selon l'axe z avec un pas inférieur à la profondeur de champ. Mais d'autres affirment cependant qu'une infinité de plans selon z est nécessaire pour arriver à une reconstruction correcte de l'objet.

Avec les caractéristiques de l'objectif ci-dessus, à 530 nm, le pas d'échantillonnage théorique est de  $dz = 0,248 \mu\text{m}$  et  $dx = dy = 0,09 \mu\text{m}$ . En pratique,  $dz = 0,125 \mu\text{m}$  (ou  $0,25 \mu\text{m}$ ) et  $dx = dy = 0,06 \mu\text{m}$  pour l'utilisation de la caméra en binning 1. Ces valeurs respectent, pour cet objectif, les conditions énoncées dans le théorème de Shannon appliqué au microscope. En binning 2,  $dz = 0,25 \mu\text{m}$  et  $dx = dy = 0,12 \mu\text{m}$ , ce qui reste satisfaisant.

Organigramme de la procédure d'acquisition d'une image 2D  
avec le système CELLscan

**Capteur :**

Deux détecteurs CCD Kodak sont disponibles, présentant des capacités de refroidissement (-20 °C pour la Caméra KUV1400 de Princeton Inc ; +10°C pour la caméra Sensys de Photometrics) et de performances différentes.

1) Sensys, Photometrics

2) Kodak KAF-1400UV

Format : 1317 (H) x 1035 (V) ; 8,98 x 7,04 mm ; 6,8x6,8 µm pixels.

Capacité : 45000 électrons/puits.

Spectre : 190-1080 nm

Grade 0.

Température : -40°C (air),

Temps de lecture : 1,4 s à 1MHz.

Contrôleur : ST138

Caméra CCD refroidie (Princeton Instruments), très sensible (10<sup>-7</sup> lux) pour la détection de signaux de fluorescence faible. Il est donc nécessaire d'accumuler (intégrer) le signal pendant des temps relativement long, ce qui engendre une élévation de température au niveau du capteur. Il est donc nécessaire de refroidir le capteur CCD (par circulation d'air, 3 étages Peltier), ce qui améliore considérablement le rapport signal/bruit.

La caméra Princeton, dédiée au bas niveau de lumière, est intégrée par défaut dans CellView. La configuration du fichier CellScan.cfg doit être la suivante :

```
...
5 0.00
6 0.00
206
0 1
10
A00
0 800
```

Utilisation de la Caméra Princeton et de Winview :

Winview correspond au logiciel d'acquisition et de traitement dédié à la caméra Princeton.

Les paramètres sont les suivants (à ne modifier sous aucun prétexte)

```
Controller : ST138  Detector : Kodak 1035x1317
Rate : 1MHz  Shutter type : Small
Type : Slow  Readout Mode : Full Frame
Resolution : 12 Bits  Interface Type : High Speed ISA
Bit Adjust : NONE  I/O Adress : A00H
  IL : IRQ 10
```

CellView et Winview ne peuvent fonctionner en même temps. Quitter l'application en cours. Pour utiliser Winview, déconnecter le câble du contrôleur ST138 (hors tension) du connecteur J5 et NORM 2/SHUTTER MON. Dans tous les cas, ce câble doit être remplacé en fin d'expériences.

**Références**

Jean Claude Châtain. "Amélioration du contraste et de la netteté des images en microscopie par fluorescence avec la Déconvolution Vidéo Microscopie". Spectra Analyse, 172, (1993).

W.A. Carrington. "Image restoration in 3D microscopy with limited data" SPIE Bioimaging and Two-Dimensional Spectroscopy, 1205, 72-83, (1990).

Alain Chomik. "Déconvolution 3D orientée vers la reconstruction d'objets biologiques observés en microscopie optique de fluorescence". Spécialité E.E.A. Thèse de Doctorat. Laboratoire Lab.El. Mulhouse.

F.S Fay. "Three-Dimensional molecular distribution in single cells analysed using the digital imaging microscope". J. Microsc. (oxford), Part II, 2, 153, 133-149, (1989).

Marie-Pierre Gramain. "Techniques de Visualisation tri-dimensionnelle en microscopie". Centre Alexis Vautrin. Vandoeuvre-lès-Nancy.

[Retour](#)

Nom : **Mme LATGER épouse CANNARD**  
Prénom : **Véronique**



**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1**

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : **BIOINGÉNIERIE**

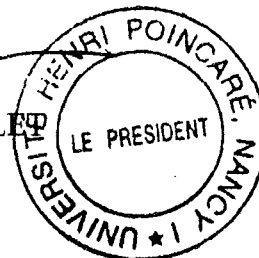
VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

n° 740

Nancy, le 5 décembre 2002

Le Président de l'Université

C. BURLES





## RESUME

IMPLICATION DE LA CYTOMETRIE EN FLUX QUANTITATIVE ET DE LA MICROSCOPIE A SECTIONNEMENT OPTIQUE 3D A FLUORESCENCE DANS L'EXPLORATION DES RECEPTEURS D'ADHERENCE LEUCOCYTAIRES.  
APPLICATIONS A DIFFERENTS DOMAINES PATHOLOGIQUES.

Les récepteurs d'adhérence constituent les acteurs essentiels de l'interaction leucocyte-cellule endothéliale. Leur fonctionnalité implique des variations quantitatives du niveau de leur expression ainsi que des redistributions spatiales. Ce travail a eu pour but d'explorer le comportement de ces récepteurs pour des leucocytes de sujets sains et pathologiques à l'aide d'une double approche méthodologique.

Dans la première partie méthodologique, nous avons mis au point un protocole standardisé de mesure, par cytométrie en flux quantitative, de l'expression des  $\beta_2$  intégrines CD11a,b,c/CD18 et de la L-sélectine, à la surface des polynucléaires neutrophiles. Ceci nous a permis d'appréhender l'importance de l'influence des paramètres pré-analytiques sur cette mesure et d'établir les valeurs de références pour des témoins. L'utilisation de la microscopie à sectionnement optique à fluorescence 3D nous a permis de connaître la distribution spatiale de ces récepteurs, avec une distribution hétérogène à l'état basal et un regroupement en "clusters" après stimulation par le TNF $\alpha$ .

Dans une deuxième partie, nous avons utilisé la cytométrie en flux quantitative, pour explorer ces récepteurs d'adhérence leucocytaires dans différents domaines pathologiques impliquant, soit un défaut d'expression, soit un état d'activation leucocytaire (surexpression de l'expression  $\beta_2$  intégrines associée à une diminution de la L-sélectine).

Nous avons ainsi trouvé un déficit, portant à la fois sur l'expression de  $\beta_2$  intégrines CD11b/CD18 et sur la sélectine CD62L, et régressif sous G-CSF, chez un patient atteint de glycogénose Ib. Ce résultat, rapporté à notre connaissance pour la première fois, contribue à expliquer, en association avec les autres anomalies fonctionnelles leucocytaires, la survenue des complications infectieuses ainsi que l'efficacité de la thérapie par facteurs de croissances.

Ensuite, notre étude sur les monocytes de patients atteints de cirrhose alcoolique nous a permis de mettre en évidence un phénotype d'activation pour les monocytes circulants avec une diminution du ratio d'activation pour CD11b/CD18. Ces données illustrent que la pathogenèse de cette maladie est probablement liée à un processus inflammatoire en réponse à l'alcool et/ou à ses métabolites. La diminution du potentiel réactif des monocytes contribue à expliquer la susceptibilité de ces patients à présenter des complications infectieuses.

La quantification de l'expression des récepteurs d'adhérence à la surface de polynucléaires neutrophiles incubés en présence d'hémoglobines modifiées a montré que ces nouveaux transporteurs d'oxygène n'entraînaient pas, *in vitro*, d'activation leucocytaire. Cette étude nous a donc permis de montrer que cette méthodologie était tout à fait adaptée à l'exploration du phénotype leucocytaire, en terme de marqueur d'activation.

Enfin, nous avons élaboré, en collaboration avec une société commerciale, une trousse de quantification de l'expression de CD11b afin de standardiser au maximum sa mesure et de pouvoir réaliser des comparaisons inter-laboratoires et/ou longitudinales. Son application dans le domaine de la pathologie infectieuse a permis de valider son utilisation en terme de sensibilité, spécificité et facilité d'utilisation.

L'ensemble de ces études nous a permis de connaître les intérêts et limites de la quantification antigénique à l'aide d'un calibrant standardisé et d'envisager élargir son application pour d'autres types cellulaires et d'autres domaines d'applications.

**Mots clés** : récepteurs d'adhérence, intégrines, sélectine, leucocyte, polynucléaire neutrophile, monocyte, cytométrie en flux, quantification, microscopie fluorescence 3D, glycogénose Ib, cirrhose alcoolique, transporteurs d'oxygène, maladies infectieuses.

---

**Spécialité** : Génie Biologique et Médical

**Angiohématologie-Hémorhéologie**

Equipe LEMTA-UMR CNRS 7563 et équipe FR W0070 CNRS-UHR-INPL-CHU  
Faculté de Médecine de Nancy, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy