



HAL
open science

Mécanisme d'adhérence des leucocytes aux fibres synthétiques. Application à la filtration sanguine

Laurent Barbe

► **To cite this version:**

Laurent Barbe. Mécanisme d'adhérence des leucocytes aux fibres synthétiques. Application à la filtration sanguine. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2001. Français. NNT: . tel-00002228

HAL Id: tel-00002228

<https://theses.hal.science/tel-00002228>

Submitted on 6 Jan 2003

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

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

UNIVERSITE PARIS 7 – DENIS DIDEROT
U.F.R. DE PHYSIQUE

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline : Biomécanique

présentée et soutenue publiquement

par

Laurent BARBE

Le 14 décembre 2001

Titre

**MECANISMES D'ADHERENCE DES LEUCOCYTES
AUX FIBRES SYNTHETIQUES.
APPLICATION A LA FILTRATION DU SANG**

Directeur de thèse :
Pr. Jean-Luc Wautier

JURY

Christian ODDOU, professeur des Universités, Université Paris 12	Président
Philippe ROUGER, professeur des Universités, Université Paris 6	Rapporteur
Cécile LEGALLAIS, chargé de recherches CNRS, UTC, Compiègne	Rapporteur
Michel BOYNARD, maître de conférence, Université Paris 5	
Bernadette BOVAL, docteur en médecine, praticien hospitalier	

RESUME

INTRODUCTION. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'adhésion leucocytaire au cours de la filtration sanguine. Les filtres sont conçus pour associer des phénomènes de tamisage et d'interaction avec des fibres synthétiques pour retenir les leucocytes et laisser passer les érythrocytes.

MATERIEL ET METHODES. Afin de mieux étudier les mécanismes, nous avons réalisé deux modèles expérimentaux : le minifiltre et la chambre de perfusion. Les propriétés des leucocytes normaux et de lignée de cellules leucémiques ont été comparées en déterminant pour ces types cellulaires leur adhérence et le niveau d'expression des molécules d'adhérence par cytométrie en flux. Dans la chambre de perfusion, différents types de fibres ont été testés et l'adhésion des cellules analysée par vidéomicroscopie et analyse d'images.

RESULTATS. Dans le minifiltre, nous avons pu démontrer que les leucocytes et les cellules leucémiques HL60 étaient retenues dans le filtre secondairement à une interaction entre les intégrines (CD11/CD18) et les fibres contenues dans le filtre. Le système de chambre à perfusion a permis l'étude de l'adhésion de différents types cellulaires à des fibres synthétiques chimiquement différentes. Les lignées HL60 en particulier induites par la vitamine D3 et les THP1 qui expriment le CD11/CD18 adhèrent significativement plus à deux types de fibres (PET, PI).

CONCLUSION. La leucoréduction dans le filtre est en partie dépendante de l'adhérence aux fibres. L'adhérence est la conséquence d'une interaction entre les molécules d'adhésion leucocytaires et des molécules chimiques présentes sur les fibres. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour améliorer la performance et la sélectivité des filtres pour les produits sanguins.

MOTS-CLES

ADHESION – CELLULES – BIOMATERIAUX – INTEGRINES –
DELEUCOCYTATION

DISCIPLINE

BIOMECHANIQUE

ADRESSE DU LABORATOIRE

Laboratoire de Biologie Vasculaire et Cellulaire. JE 1557 Université Paris 7.
INTS, 3^e étage, 6 rue Alexandre Cabanel, 75739 Paris Cedex 15

ABSTRACT

INTRODUCTION. The objective of this work was to investigate the mechanisms responsible for leukocyte adhesion during blood filtration for leukoreduction. Human blood after collection is subjected to filtration to reduce the number of leukocytes present in the blood products. Blood filters are made of synthetic fibers and are designed to retain leukocytes and not erythrocytes.

MATERIAL AND METHODS. To precise the different factors involved in leukocyte retention, we have set up two different experimental models: a minifilter and a flow chamber. We have compared the properties of normal leukocytes to leukemic cell lines expressing differently adhesion molecules. In addition, we studied the expression of adhesion molecules by flow cytometry and analyzed adhesion in the flow chamber using a video camera linked to a computer for image analysis.

RESULTS. In the minifilter system we found that leukocyte or leukemic cell (HL60) retention was dependent upon integrin (CD11/CD18) interaction with the filter components as demonstrated by blocking experiments with specific monoclonal antibodies. The flow chamber allowed us to evaluate the adhesion to different fibers of leukocytes and leukemic cells. The HL60 and THP1 cell lines adhered more to two types of fibers (PET, PI) and this adhesion is related to integrin expression by these cells.

CONCLUSION. The leukoreduction in the filter is dependent upon leukocyte adhesion to fibers. The adhesion is mediated by specific cell adhesion molecules and specific molecules present on the fibers. These results indicate that a better knowledge of the mechanism of leukocyte adhesion to synthetic material may lead to new techniques for leukoreduction of blood products.

KEY WORDS

ADHESION – CELLS – BIOMATERIALS – INTEGRINS –
LEUKOREDUCTION

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mes parents ainsi que mes grands-parents qui m'ont soutenu, dans tous les sens du terme, pour que je concrétise ce travail. Mes remerciements s'adressent très vivement à Dorine qui a suivi ce petit périple au grès de mes humeurs et qui a su me soutenir aux moments opportuns. Un grand merci aussi à toute la tribu d'amis (ils se reconnaîtront) qui se sont intéressés à mon travail et qui m'ont diverti.

Ensuite, je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire : Jean-Luc Wautier pour m'avoir accueilli au sein du labo, pour m'avoir guidé et conseillé ; merci à Marie-Paule pour ses précieux conseils sans lesquels je n'aurais pas pu commencer ce travail. Merci également aux étudiants du labo (Catherine, Eric) ainsi qu'à ceux des labos voisins (Sophie, Lucile, Marc, Manlio) pour nos multiples échanges.

Je veux aussi remercier les différentes personnes que j'ai rencontrées tout au long de ces années et qui ont pu m'aider par leurs connaissances, leurs conseils. Cette liste n'est pas exhaustive mais je tiens à citer Bela et Nicole pour les lignées cellulaires ; bien sûr Bernadette pour la cytométrie, qui a toujours trouvé du temps à me consacrer ; l'équipe du labo photo de Saint-Louis pour leur disponibilité et plein d'autres personnes...

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	i
ABSTRACT	iii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
GLOSSAIRE	ix
Chapitre 1 Introduction	1
1. CARACTERES GENERAUX DU SANG	3
1.1 Les examens du sang	5
1.1.1 La numération formule sanguine	5
1.1.2 L'hématocrite	5
1.1.3 La numération globulaire	5
1.1.4 La formule sanguine	6
1.1.5 L'immunomarquage	7
1.1.6 La cytogénétique	7
1.2 Le globule rouge : un transporteur d'oxygène	7
1.2.1 La naissance du GR : l'érythropoïèse médullaire	7
1.2.2 Le globule rouge en fonction	11
1.3 Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes sont des cellules phagocytaires	12
1.3.1 La naissance des polynucléaires	12
1.3.2 Les monocytes	13
1.4 Les lymphocytes, cellules de l'immunité spécifique	14
1.4.1 Le lymphocyte B et l'immunité humorale.	14
1.4.2 Le lymphocyte T et l'immunité cellulaire	15
1.4.3 Certains lymphocytes ne sont ni T ni B, on les appelle "nuls".	16
1.4.4 Exemples de situations où les lymphocytes sont en action.	16
1.5 Les plaquettes	17
1.5.1 La thrombopoïèse	17
1.5.2 Structure de la plaquette	17
1.5.3 Fonctions des plaquettes	18
2. INDICATIONS CLINIQUES DE LA DELEUCOCYTATION	19
2.1 Allo-immunisation	19

2.2 Immunomodulation	19
2.3 Transmission de virus et bactéries	20
2.4 Déleucocytation et nouveau variant de Creutzfeldt-Jakob	21
2.5 Transfusion et réaction du greffon contre l'hôte	22
2.6 Réaction fébrile non hémolytique	22
3. HISTORIQUE DES TECHNIQUES DE DELEUCOCYTATION	24
3.1 La centrifugation inversée	24
3.2 Sédimentation	25
3.3 Congélation-décongélation	25
3.4 La filtration	26
4. LES MECANISMES DE LA FILTRATION	30
4.1 Tamisage	32
4.1.1 Influence de la taille des pores	32
4.1.2 Margination	34
4.2 Adhésion cellulaire	35
4.2.1 Propriétés chimiques de la surface	35
4.2.2 Charge de la surface	36
4.2.3 Mouillabilité de la surface	37
4.2.4 Morphologie de la surface	40
5. PARAMETRES INFLUENÇANT LA RETENTION LEUCOCYTAIRE	41
5.1 Composition du sang	41
5.2 Activation du complément	41
5.3 Adsorption des protéines	42
5.4 Effet de la température	45
5.5 Effet du stockage	45
5.6 Effet du débit	46
6. LES MOLECULES D'ADHESION	48
6.1 Les intégrines	49
6.1.1 Intégrine $\beta 2$	49
6.1.2 Intégrine $\beta 1$	52
6.2 Les sélectines	53
6.3 Les immunoglobulines	54
6.4 Les molécules d'adhésion des plaquettes	54
<i>Chapitre 1 Le modèle de minifiltre</i>	57
1. INTRODUCTION AU PREMIER ARTICLE	57
2 MATERIELS ET METHODES	59
2.1 Minifiltre	59
2.2 Mesure de temps de filtration	59
2.3 Numération des cellules du filtrat	60
3. PREMIER ARTICLE	62
3.1 Abstract	62

3.2 Introduction	64
3.3 Materials and methods	65
3.3.1 Leukocyte isolation and counting	65
3.3.2 HL60 culture and differentiation	66
3.3.3 Quantification of cell membrane molecules	67
3.3.4 Filtration on minifilter	68
3.3.5 Statistical Analysis	69
3.4 Results	70
3.4.1 Leukocyte reduction of whole blood by minifilters	70
3.4.2 Differentiation of HL60 cells	70
3.4.3 Quantification of leukocyte adhesion molecules	72
3.4.4 Quantification of cell size	74
3.4.5 HL60 filtration	74
3.4.6 HL60 and platelets filtration	76
3.5 Discussion	77
4. AUTRES RESULTATS DU MINIFILTRE	82
4.1 Effet de la température sur la déleucocytation	82
4.2 Effet de la température sur l'écoulement	83
4.3 Influence de l'hématocrite	84
4.4 Dynamique de filtration de différentes suspensions	85
4.4.1 Sang ou dérivés	85
4.4.2 Lignée cellulaire	87
4.4. Temps de filtration et déleucocytation	90
Chapitre 3 Le modèle de chambre d'écoulement	92
1. INTRODUCTION AU SECOND ARTICLE	92
2. MATERIELS ET METHODES	94
3. SECOND ARTICLE	97
3.1 Abstract	97
3.2 Introduction	99
3.3 Materials and methods	100
3.3.1 Blood cells and cell lines	100
3.3.2 Quantification of cell membrane molecules	101
3.3.3 Measurement of cell adhesion to fibres	102
3.3.4 Statistical Analysis	107
3.4 Results	108
3.4.1 Adhesion to fibres of HL60 and leukocytes in whole blood	108
3.4.2 Effect of fibre placement on HL60 adhesion and fibre characteristics	108
3.4.3 Cell adhesion molecule expression	110
3.4.4 Adhesion of leukocyte cell lines to PET, PI and PVA fibres	112
3.5 Discussion	114
4. AUTRES RESULTATS DE LA CHAMBRE D'ECOULEMENT	119
4.1 Effet de la densité de fibres	119

4.2 Influence de l'orientation des fibres	120
4.3 Comparaison sang – lignée	122
4.4 Influences des constituants sanguins	123
Chapitre 4 Discussion	126
1. LES MOLECULES D'ADHESION	126
2. LES CONSTITUANTS SANGUINS	128
3. LES CONDITIONS D'ÉCOULEMENT	129
4. TEMPS DE PASSAGE	130
5. MATERIAUX	132
Chapitre 5 Perspectives	135
1. AMÉLIORATIONS DES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX	135
2. TRAVAUX EN COURS	137
2.1 Greffage des fibres	138
2.2 Modélisation de l'écoulement dans le filtre	144
Bibliographie	153
Annexe 1 Energie de surface	175
Annexe 2 Fabrication du minifiltre	177
Annexe 3 Procédé de numération des cellules	179
Annexe 4 Compléments de cytométrie	183
1. Lignée HL60	184
2. Lignée Molt-4	190
3. Lignée Jurkat	192
4. Lignée U937	194
5. Lignée THP-1	196

GLOSSAIRE

<i>Anticorps</i>	Protéines sériques particulière ayant la propriété de se combiner spécifiquement aux antigènes contre lesquels elles sont dirigées.
<i>Antigène</i>	Toute substance qui, apparaissant dans un organisme qui ne la possède pas, provoque chez lui l'apparition d'un anticorps spécifique.
<i>CD11a</i>	CD11a (ou LFA-1) est une molécule membranaire hétérodymérique largement exprimée sur les cellules d'origine hématopoïétique. CD11a comprend une chaîne alpha et une chaîne bêta, CD18. CD11a est le principal récepteur des cellules T, des cellules B et des granulocytes.
<i>CD11b</i>	CD11b (ou Mac-1) est une molécule membranaire hétérodymérique. CD11b comprend une chaîne alpha et une chaîne bêta, CD18. L'antigène, qui est une intégrine, est un récepteur du complément 3 et intervient dans les interactions cellule-cellule et cellule-substrat.
<i>CD11c</i>	CD11c (ou p150,95) est une molécule membranaire hétérodymérique exprimée sur les monocytes, les granulocytes, les cellules NK et certains lymphocytes. Sa chaîne alpha est l'antigène CD11c exprimée sur certaines cellules myéloïdes. La chaîne bêta est l'antigène CD18. Cette molécule joue un rôle important dans les interactions cellule-cellule et cellule-substrat.

<i>CD18</i>	Glycoprotéine liée de façon non covalente à des chaînes alpha spécifiques de la famille CD11.
<i>diapédèse</i>	Le polynucléaire adhère à la paroi vasculaire grâce à des molécules spécialisées et traverse l'endothélium des vaisseaux
<i>HL60</i>	Lignée cellulaire humaine de type promyelocytaire. Cette lignée se différencie spontanément ou par l'action d'agents tels que le PMA (pour Phorbol Myristic Acid), le DMSO (pour dimethylsulfoxyde), l'actinomycine D, l'acide rétinoïque, entre autres.
<i>JURKAT</i>	Lignée cellulaire humaine de type lymphoblastique T
<i>MOLT-4</i>	Lignée cellulaire humaine de type lymphoblastique T
<i>Réponse immunitaire</i>	Production d'anticorps suite à l'introduction d'antigènes dans l'organisme. - Elle est primaire lorsque l'antigène est introduit pour la première fois. Dans ce cas, elle ne se développe qu'après un temps de latence. - Elle est secondaire si le contact avec le même antigène a déjà eu lieu auparavant. L'organisme est donc déjà sensibilisé à cet antigène. Les anticorps apparaissent dans le sang très rapidement en plus grandes quantités et se maintiennent plus longtemps.
<i>THP-1</i>	Lignée cellulaire humaine de type monocytaire. La différenciation monocytaire peut être induite par le TPA (pour

phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)

U937

Lignée cellulaire humaine de type monocyttaire. Cette lignée peut être induite par les esters de phorbol, la vitamine D3, l'interféron gamma, le TNF (pour Tumor Necrosis Factor) et l'acide rétinoïque vers une différenciation terminale monocyttaire

Chapitre 1

INTRODUCTION

Les effets thérapeutiques du sang sont connus depuis des siècles, mais c'est probablement le médecin anglais Richard Lower qui en 1666 a été le premier à rapporter la transfusion de sang depuis un donneur animal vers un receveur animal (Lower, 1666). Jean-Baptiste Denis réalise la première transfusion chez l'homme en 1667. L'interdiction de la transfusion par la cour de Paris a fait oublier cette technique pendant plus de deux siècles. La transfusion moderne comme traitement ne fut établit qu'au début du XX^e siècle, après la découverte des groupes sanguins et des développements de l'anticoagulation du sang (Maluf, 1954). De nos jours, la transfusion sanguine est une technique de routine dans les hôpitaux.

Pendant plusieurs années où la transfusion était faite avec le sang total, la présence des leucocytes apparaissait comme normale et inévitable. Avec le développement de la "component therapy" (séparation des composants en concentré de globules rouges, plaquettes, plasma) au début des années soixante, il devint clair que les leucocytes allogéniques pouvaient être la cause de différentes complications graves chez le receveur (Meryman, 1989). Ainsi, les moyens de supprimer les leucocytes du sang avant la transfusion ont gagné un grand intérêt.

L'adhésion des leucocytes est un phénomène observé depuis que le microscope existe mais les mécanismes moléculaires ne sont identifiés que depuis une vingtaine

d'années. La transfusion sanguine a connu un réel développement dans la seconde moitié du XX^e siècle et ce n'est que dans la dernière décennie que l'on s'est réellement préoccupé d'éliminer les leucocytes des produits sanguins.

Nous envisagerons successivement les raisons ayant motivé la systématisation de la déleucocytation, l'évolution des techniques utilisées. Les mécanismes impliqués dans la déleucocytation par filtration seront abordés dans le chapitre 2 et 3 à travers deux articles et des résultats non publiés. Pour conclure, les perspectives de ce travail seront détaillées dans le dernier chapitre.

1. CARACTERES GENERAUX DU SANG

Le sang est un tissu vivant, constitué d'un liquide, le plasma, dans lequel se trouvent en suspension des cellules : les globules rouges (ou hématies), les globules blancs (ou leucocytes) et les plaquettes (tableau 1). Le sang irrigue tous les tissus et organes, et alimente donc directement ou indirectement donc, toutes les cellules de l'organisme.

Le sang représente en poids un peu moins de 10% de notre organisme (7,5%), soit environ 5L pour un adulte. Le sang est liquide et constitué d'eau, de protéines, d'oligo-éléments et de cellules circulantes que sont les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Le sang peut changer d'état et passer de l'état liquide à l'état solide : c'est la coagulation.

Le plasma contient de nombreuses protéines aux fonctions multiples, anti-infectieuses (anticorps), anti-hémorragiques (facteurs de coagulation), hormones, etc. ainsi que des médiateurs ou des produits de catabolisme (déchets).

Les globules rouges ont un rôle essentiel dans le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus, mais représentent aussi une protection contre les effets toxiques de l'oxydation.

Les globules blancs ont une fonction capitale dans la défense de l'organisme contre les agents infectieux, bactéries, virus, mais aussi contre les tumeurs.

Deux types principaux de globules blancs sont différenciés : les polynucléaires qui ont la propriété de digérer certains microbes et les lymphocytes à la base de la production d'anticorps ou de la formation de cellules tueuses.

Les plaquettes sont des fragments de cellules. Elles arrêtent le saignement en cas de brèche vasculaire en s'agrégeant les unes aux autres.

Les cellules du sang restent dans la circulation de quelques heures (globules blancs) à une centaine de jours (globules rouges), et sont renouvelées en permanence. Les cellules du sang sont produites dans la moelle des os par la multiplication et la différenciation de cellules souches.

Les leucocytes sortent des vaisseaux sanguins soit vers les tissus en cas d'infection, soit vers le système lymphatique (lymphocytes) qui draine les tissus, puis se reconnectent avec le système vasculaire.

Tableau 1. Concentration et propriétés physiques des cellules humaines du sang

Type cellulaire	Densité (g/cm ³)	Diamètre (µm)	Déformabilité ¹ (unités arbitraires)	Adhésion ²
Erythrocytes	1,090 - 1,110	5 - 7	••••	•
Plaquettes	1,054 - 1,062	2 - 4	•	••••
Granulocytes	1,080 - 1,084	10 - 15	•••	•••
Lymphocytes	1,060 - 1,072	5 - 8	••	••
Monocytes	1,055 - 1,062	12 - 18	••	••••

¹ Déformabilité relative des cellules définie par leurs capacités à traverser les pores de filtre Nucléopore (Bruil *et al*, 1995)

² Aptitude d'adhésion relative des cellules sur des surfaces solides, basée sur plusieurs rapports dans lesquels l'adhésion spécifique de cellules du sang est comparée. (Bruil *et al*, 1995)

1.1 Les examens du sang

1.1.1 La numération formule sanguine

L'examen de base est la numération formule sanguine à partir d'un faible volume de sang, de nouvelles générations d'automates sont capables de dénombrer les cellules du sang, d'établir le pourcentage de chaque catégorie de leucocytes et de calculer les principaux paramètres des cellules sanguines.

1.1.2 L'hématocrite

La notion la plus ancienne est celle de l'hématocrite qui est le rapport entre le volume des globules rouges par rapport au volume total du sang. Le volume des hématies était initialement mesuré dans un tube gradué après leur sédimentation. Il est aujourd'hui déterminé après centrifugation de tube capillaire : le rapport hématie volume total étant mesuré grâce à une réglette. L'hématocrite normal varie de 42 à 47%, il peut être diminué en cas d'anémie ou d'hémodilution, augmenté en cas de polyglobulie ou d'hémoconcentration. L'hématocrite comme l'hémoglobine, les globules rouges, les leucocytes ont des valeurs normales qui varient selon l'âge et le sexe du sujet.

1.1.3 La numération globulaire

Les hématies sont énumérées grâce à un compteur automatique. Les résultats sont exprimés par microlitre (μL) ou par litre.

- femme : 4.10^6 à $5,2.10^6$ de globules rouges / μL soit 4.10^{12} à $5,3.10^{12}/\text{L}$;
homme : $4,2.10^6$ à $5,5.10^6/\mu\text{L}$ soit 4.10^{12} à $5,5.10^{12}/\text{L}$
- Hémoglobine. Femme : 120-150g/L ; homme : 130-160g/L
- Leucocytes : 4000 à 10000/ μL soit 4.10^9 à $10.10^9/\text{L}$

- Plaquettes : 200000-450000/ μL soit $200 \cdot 10^6$ à $450 \cdot 10^6/\text{L}$

Les automates calculent le volume globulaire moyen ($85\text{-}95 \mu\text{m}^3$). La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine.

1.1.4 La formule sanguine

Il est très important d'examiner l'aspect morphologique des globules rouges et des plaquettes. En ce qui concerne les globules blancs, il faut surtout connaître le pourcentage relatif des différents types de leucocytes : c'est la formule sanguine. Cet examen s'effectue encore assez souvent à l'aide d'un frottis de sang étalé sur une lame de verre et coloré par des réactifs spécifiques (May-Grunwald-Giemsa). Les compteurs électroniques sont également capables de l'effectuer.

Pour la formule sanguine, l'essentiel est de compter d'une part les polynucléaires neutrophiles, dont le noyau est segmenté en plusieurs lobes, et d'autre part les lymphocytes et les monocytes.

Voici un exemple de formule sanguine normale chez l'adulte pour 100 éléments :

	Pourcentage	Pourcentage normal
Polynucléaires neutrophiles	61	60 à 65
Polynucléaires éosinophiles	2	1 à 3
Polynucléaires basophiles	1	0.5
Lymphocytes	30	20 à 40
Monocytes	6	5 à 10

Bien entendu, le frottis permet aussi d'examiner la forme et la taille des plaquettes ainsi que leur agrégation éventuelle, de même que la taille, la forme, l'intensité de coloration des globules rouges.

1.1.5 L'immunomarquage

L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de cluster de différenciation (CD) permet de mieux caractériser les cellules et d'identifier la lignée hématologique maligne. Ceci peut être fait sur des cellules en suspension grâce à la fluorocytométrie ou sur des cellules sur la lame à l'immunochimie.

1.1.6 La cytogénétique

Un nombre important d'anomalies génétiques a été mis en évidence dans les cellules hématopoïétique malignes. Grâce à des sondes spécifiques, ces anomalies peuvent être mises en évidence dans les leucémies et les lymphomes.

1.2 Le globule rouge : un transporteur d'oxygène

1.2.1 La naissance du GR : l'érythropoïèse médullaire

La formation du globule rouge à partir d'une cellule souche médullaire s'appelle l'érythropoïèse (figure 1).

La succession des transformations cellulaires que l'on observe dans les générations successives des cellules souches érythropoïétiques est caractérisée par deux événements fondamentaux :

- la charge de plus en plus grande en hémoglobine
- la perte du noyau

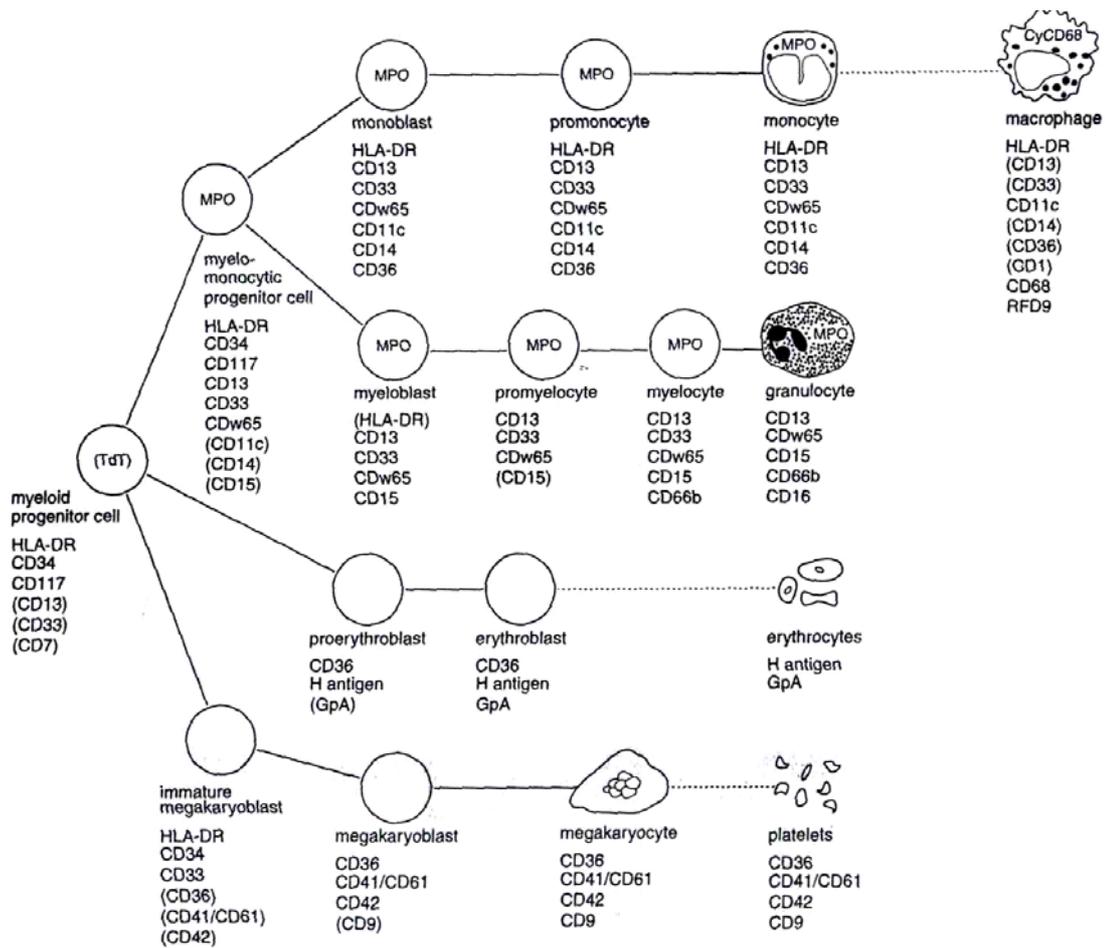


Figure 1. Schéma de la différenciation myéloïde. L'expression de différents antigènes est indiquée pour les différentes étapes de la différenciation (les antigènes entre parenthèses ne sont pas toujours exprimés) (TdT : enzyme *terminal deoxynucleotidyl transferase*) (van_Dongen *et al*, 1997)

La lignée érythroblastique qui va produire les globules rouges comprend ainsi successivement :

- des proérythroblastes, grandes cellules encore jeunes dont le cytoplasme se colore en bleu au Giemsa, ce qui signifie qu'elles sont le siège d'une synthèse protéique intense. Le noyau est grand et nucléolé, ce qui signifie qu'il est en pleine activité. Cette cellule qui va donner naissance à la lignée rouge

commence sa différenciation et va se diviser rapidement en donnant les érythroblastes.

- les érythroblastes se chargent en hémoglobine en même temps qu'ils se divisent et qu'ils diminuent de taille. Le cytoplasme est d'abord basophile (bleu) puis polychromatophile (bleu teinté de rouge) enfin acidophile (rouge). Ces modifications de coloration traduisent simplement le fait que le cytoplasme comporte de plus en plus d'hémoglobine.
- l'érythroblaste acidophile ne se divise plus. C'est à cette étape que se forme le globule rouge : après l'expulsion du noyau. Quand cette opération est achevée, la cellule est devenue un réticulocyte.
- le réticulocyte conserve encore quelques vestiges d'organites cellulaires (ribosomes , mitochondrie) qui assurent encore pour un temps limité les dernières synthèses d'hémoglobine.
- le globule rouge dans le sang.

Au total, un proérythroblaste aura donné 16 globules rouges et cette maturation n'aura duré que 7 jours.

Le globule rouge assure une fonction essentielle : la captation, le transport et le largage d'oxygène (figure 2). Sa vie n'excède pas 120 jours : le globule rouge vieilli, est alors inexorablement reconnu par les macrophages qui les éliminent de la circulation sanguine.

La transformation de la cellule souche en proérythroblaste est déclenchée par une hormone appelée érythropoïétine qui contrôle aussi probablement la synthèse de

CELLULE		DURÉE DE VIE DANS LE SANG	FONCTION
ÉRYTHROCYTE		120 JOURS	VÉHICULE DE L'OXYGÈNE
MONOCYTE		3 JOURS	DÉFENSE DE L'ORGANISME SURVEILLANCE IMMUNITAIRE, (PRÉCURSEUR DES MACROPHAGES)
NEUTROPHILE		7 HEURES	DÉFENSE DE L'ORGANISME
ÉOSINOPHILE		?	DÉFENSE DE L'ORGANISME CONTRE LES PARASITES ET LES ALLERGIES
BASOPHILE		?	INFLAMMATION ET ALLERGIE
PLAQUETTES		7-8 JOURS	COAGULATION DU SANG
LYMPHOCYTE T		?	IMMUNITÉ CELLULAIRE
LYMPHOCYTE B		?	ANTICORPS (PRÉCURSEUR DES PLASMOCYTES)

Figure 2. Fonctions et durée de vie des cellules dans le sang.

l'hémoglobine. C'est une substance d'origine rénale, avec un profacteur d'origine hépatique. La synthèse d'érythropoïétine est elle-même stimulée par le taux d'oxygénation tissulaire et elle peut être déprimée par des transfusions intensives de globules rouges.

L'érythropoïèse est un phénomène permanent, qui compense régulièrement la destruction normale des globules rouges vieillissants dans la moelle. C'est aussi un phénomène adaptatif qui répond par une hyperactivité à toute hémorragie ou à toute hémolyse pathologique (généralement effectuée dans la rate).

1.2.2 Le globule rouge en fonction

Le globule rouge doit passer dans des capillaires étroits, il faut qu'il soit déformable. Pour permettre l'échange d'oxygène, l'hémoglobine érythrocytaire doit être fonctionnelle.

Le globule rouge a une forme originale : c'est un disque biconcave de 5 à 7 μm de diamètre comportant une membrane souple et fluide de telle sorte que la cellule peut s'allonger et pénétrer dans les micro-capillaires dont le diamètre est plus petit que le sien. La membrane est constituée d'une double couche très fluide de phospholipides.

Les globules rouges que l'on va transfuser doit avoir une membrane intacte pour pouvoir transporter l'oxygène à toutes les cellules : c'est le rôle de l'ATP (adénosine-triphosphate) et de l'adénine. De même, pour que l'hémoglobine puisse larguer constamment son oxygène, il faut que le taux de 2,3-DPG soit correct : c'est le rôle de la solution CPD (Citrates, Phosphates, Dextrose).

1.3 Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes sont des cellules phagocytaires

1.3.1 La naissance des polynucléaires

La moelle osseuse fabrique les leucocytes polynucléaires au cours d'une série de divisions et de transformations, appelée granulopoïèse, caractérisée par deux évènements :

- l'apparition de granulations intracytoplasmiques qui sont des sacs d'enzymes de toutes sortes.
- la fragmentation du noyau caractérisant l'étape terminale aboutissant au "polynucléaire", terme qui signifie plusieurs noyaux. La première cellule ou cellule souche, cellule encore peu différenciée sans granulation, qui se transforme en myéloblaste (20 μm) contenant des premières granulations fines azurophiles (roses). Le stade suivant, le promyélocyte contient beaucoup plus de granulations. Le myélocyte (12-15 μm) qui lui succède est caractérisé par l'apparition de granulations spécifiques des lignées neutrophile, éosinophile ou basophile. Les divisions cellulaires s'arrêtent à ce niveau ; le myélocyte évolue vers le métamyélocyte (12-15 μm), le noyau perd son aspect normal et amorce sa lobulisation en "fer à cheval". Cette cellule donne naissance au polynucléaire au noyau très caractéristique, segmenté en plusieurs lobes, et qui passe dans le sang. Sa taille est alors de 10 à 15 μm .

La défense de l'organisme par les polynucléaires neutrophiles est permanente. Des bactéries sont présentes dans la flore intestinale, sur la peau, dans les cavités rhino-

pharyngées et respiratoires. Les polynucléaires jouent un rôle fondamental dans la lutte anti-infectieuse. Deux autres types de polynucléaires naissent dans la moelle : les polynucléaires éosinophiles et les polynucléaires basophiles.

Les polynucléaires éosinophiles ont un cytoplasme contenant de grosses granulations roses et révèlent au microscope électronique un cristal distinct du reste de granulations. Les polynucléaires éosinophiles sont augmentés en cas de parasitoses ou et d'allergies.

Les polynucléaires basophiles en très petit nombre dans le sang, sont caractérisés par de grosses granulations basophiles noirâtres. Ce sont des cellules riches en histamine et leur membrane contient des récepteurs pour les IgE . Lorsque l'antigène correspondant (allergène) se fixe alors sur le fragment opposé (fragment Fab) de l'IgE, le basophile se dégranule et libère son histamine et les médiateurs de l'hypersensibilité immédiate.

1.3.2 Les monocytes

Le monocyte issu de la moelle est la plus grande des cellules sanguines : son noyau est encoché mais non polylobé, son cytoplasme "ciel d'orage" contient de très fines granulations. Après 2 ou 3 jours dans le sang, il gagne les tissus et devient un macrophage à fonction phagocytaire moins spécifiquement bactérienne que celle des polynucléaires neutrophiles.

Il assure surtout des fonctions multiples dans l'immunité spécifique en coopération avec les lymphocytes. Par exemple, ce sont les macrophages qui "présentent" l'antigène aux lymphocytes.

1.4 Les lymphocytes, cellules de l'immunité spécifique

La moelle osseuse produit les cellules précurseurs des lymphocytes. Les lymphocytes T et B : les cellules qui vont devenir des lymphocytes proviennent également de la moelle osseuse. Mais certaines d'entre elles se différencient dans le thymus, d'où leur nom de lymphocytes T, puis elles passent dans le sang et dans les organes lymphoïdes périphériques : ganglions, rate, amygdales, follicules lymphoïdes de l'intestin.

Pour d'autres cellules appelées lymphocytes B, le séjour dans le thymus n'est pas nécessaire. On sait que chez les oiseaux, l'organe de maturation de ces lymphocytes est la Bourse de Fabricius (d'où leur nom de cellule B) organe lymphoïde situé dans le cloaque. On n'en connaît pas l'équivalent chez l'homme et on a un certain nombre de preuves que ces lymphocytes se différencient dans la moelle elle-même.

La greffe de moelle apportant les lymphocytes T et B restaure la capacité immunitaire.

1.4.1 Le lymphocyte B et l'immunité humorale.

Les lymphocytes B sont des cellules capables de former des anticorps, contre des substances étrangères spécifiques appelées antigènes.

Sous l'influence de l'antigène, avec l'aide du macrophage, dans certains cas, grâce à l'assistance de lymphocytes T (T auxiliaires), les lymphocytes B se multiplient et se spécialisent, ils fabriquent des anticorps. Les lymphocytes B peuvent devenir des plasmocytes.

Normalement le plasmocyte n'est pas présent dans le sang, mais reste dans les ganglions ou la moelle. L'anticorps diffuse dans le plasma et atteint les tissus et les organes.

1.4.2 Le lymphocyte T et l'immunité cellulaire

Le lymphocyte T activé par l'antigène présente une série de transformations qui aboutissent à une véritable cellule tueuse cytotoxique, capable de détruire les cellules étrangères par elle-même sans avoir besoin d'anticorps.

La première étape est une étape de reconnaissance du caractère étranger de la cellule concernée où interviennent les antigènes HLA-D. La seconde étape est l'étape de cytotoxicité elle-même, où interviennent les antigènes HLA-A, B ou C. C'est ainsi que le système HLA (Human Leukocyte Antigens) joue un rôle important dans le rejet des greffes, mais il n'est pas le seul.

Il y a en fait plusieurs catégories de lymphocytes T :

- le lymphocyte T cytotoxique est la cellule que nous venons de décrire.
- les lymphocytes T auxiliaires qui "assistent" le lymphocyte B pour la reconnaissance de l'antigène : c'est l'effet "Helper" ou "la coopération cellulaire"
- les lymphocytes T suppresseurs : à l'inverse des T auxiliaires, des lymphocytes T freinent la transformation des lymphocytes B. Ce sont les cellules dites T suppresseurs.

L'immunité résulte d'un équilibre entre les T auxiliaires et les T suppresseurs. Toute variation dans cet équilibre peut amener à des situations pathologiques qui définissent par exemple les maladies dites auto-immunes, où un individu devient capable de fabriquer des anticorps contre ses propres cellules, ou conduire à un déficit immunitaire.

1.4.3 Certains lymphocytes ne sont ni T ni B, on les appelle "nuls".

Les cellules K pour Killer sont capables de détruire toute cellule étrangère déjà sensibilisée par un anticorps.

Les cellules NK pour Natural Killer sont capables de détruire toute cellule étrangère, sans aucune participation d'anticorps.

1.4.4 Exemples de situations où les lymphocytes sont en action.

L'allo-immunisation par transfusion : lorsqu'un malade reçoit des transfusions répétées, il risque de s'immuniser contre les antigènes qu'il ne possède pas dans les systèmes de groupes sanguins, Rh, Kell, Duffy, Kidd. Ces globules rouges "étrangers" vont stimuler les lymphocytes B qui vont se transformer en plasmocytes et fabriquer un anticorps, anti-Kell par exemple. Il s'agit donc ici d'une réaction d'immunité humorale qui peut aboutir à un accident par hémolyse des globules transfusés. L'allo-immunisation anti-Rh par grossesses successives correspond aussi à ce mécanisme ; ici c'est la mère qui s'immunise contre l'antigène Rh des globules rouges du fœtus (antigène hérité de son père).

Le rejet des greffes représente au contraire le type même du mécanisme d'immunité cellulaire. Ici, ce ne sont plus des anticorps qui vont entrer en jeu. Ce sont les lymphocytes T cytotoxiques eux-mêmes qui vont venir détruire par simple contact les cellules étrangères de l'organe greffé. C'est donc une cellule qui détruit une autre cellule au préalable reconnue comme étrangère. De plus, les cellules K, NK et les macrophages vont venir en renfort pour cette destruction. Une cellule étrangère aurait donc peu de chance d'être tolérée, à moins qu'elle n'ait été soigneusement sélectionnée

par ses antigènes d'histocompatibilité (en particulier HLA) de façon à ce qu'elle ne soit pas reconnue comme étrangère.

1.5 Les plaquettes

1.5.1 La thrombopoïèse

Les cellules de la moelle qui donnent naissance aux plaquettes sont géantes et possèdent de multiples noyaux, d'où leur nom de mégacaryocytes. Elles produisent des plaquettes par fragmentation de leur cytoplasme. Les plaquettes ont une durée de vie limitée dans la circulation (8-10 jours) ; la production plaquettaire doit s'adapter en cas de destruction plaquettaire excessive. Un facteur de stimulation de la production est appelé thrombopoïétine ou facteur de croissance et de différenciation des mégacaryocytes. Ce facteur a été isolé, purifié, cloné et une forme reconstituante a été obtenue par génie génétique. Il fait l'objet d'essais thérapeutiques dans les thrombopénies (manque de plaquettes) provoquées par les chimiothérapies anticancéreuses.

Comme l'érythrocyte, la plaquette est donc une cellule sans noyau, vouée à une vie très courte.

La durée de vie des plaquettes dans le sang est d'une dizaine de jours. Elles vont être détruites dans la rate.

1.5.2 Structure de la plaquette

Les plaquettes sont donc de petits fragments de cytoplasme entourés d'une membrane analogue à celle de l'érythrocyte, mais la cellule est beaucoup plus petite : 2 à 4 μm de

diamètre. De plus, le cytoplasme contient de nombreuses formations cytoplasmiques liées à des fonctions multiples :

- des granules denses contenant de la sérotonine, de l'adrénaline, de l'ADP (adénosine-diphosphate), de l'ATP,
- des granules claires contenant du fibrinogène, le facteur plaquettaire, le facteur Willebrand,
- d'autres organites : microtubules qui maintiennent la forme de la cellule, micro filaments, lysosomes, granules de glycogène.

On voit donc que la plaquette est finalement une cellule beaucoup plus complexe que l'érythrocyte.

1.5.3 Fonctions des plaquettes

Le grand nombre et la variété d'éléments intra-cytoplasmiques laissent présager que la plaquette a des fonctions multiples, dont les principales sont en rapport avec différentes étapes de l'hémostase. Elles participent essentiellement à l'hémostase primaire c'est-à-dire à l'arrêt de tout saignement : les plaquettes adhèrent au collagène sous endothélial mis à nu et à la membrane basale des vaisseaux. Elles libèrent alors un certain nombre de leurs constituants (ADP, adrénaline, sérotonine, facteur plaquettaire). Sous l'influence de l'ADP, elles agrègent entre elles et cette agrégation devient vite irréversible, constituant un agrégat plaquettaire ; c'est le premier barrage qui permet l'arrêt du saignement. La cohésion du barrage et l'étanchéité sont renforcés par la formation d'un caillot de fibrine.

2. INDICATIONS CLINIQUES DE LA DELEUCOCYTATION

2.1 Allo-immunisation

L'allo-immunisation est définie par la formation d'anticorps soit contre les antigènes leucocytaires humains (HLA pour *Human Leukocyte Antigens*) de type 1 qui sont présents sur toutes les cellules nucléées et les plaquettes, soit contre des anticorps leucocytaires spécifiques autres que HLA. Les premiers résultats, datant de plus de trente ans, indiquent que $5 \cdot 10^5$ leucocytes sont suffisants pour induire la production d'anticorps anti-HL1 (Dausset *et al*, 1966). Il semble logique de dire que moins il y a de leucocytes dans les produits sanguins, moins il y a de risques d'immunisation. Cependant aucune étude n'a encore montré quel est le nombre minimal de leucocytes pour induire cette immunisation. Par ailleurs la réponse immunitaire aux antigènes leucocytaires ne semble pas seulement liée au nombre de leucocytes transfusés, mais aussi au passé du patient (multi-transfusion, grossesse, ...), à la nature de la maladie, à la conformité ou à la différence par rapport aux types HLA.

2.2 Immunomodulation

Il y a un nombre croissant de preuves, chez l'animal, chez l'homme ou dans des études *in-vitro*, qui montrent des conséquences de la transfusion aussi bien temporaires que durables dans les fonctions immunitaires du receveur (Williamson, 2000). Ces effets peuvent aller d'une réduction transitoire du rapport CD4/CD8 pour les lymphocytes T, à une diminution de la fonction des lymphocytes NK (pour *Natural Killer*). Il a été aussi avancé que les produits sanguins contaminés par des leucocytes réduisent la réponse immunitaire face à certains cancers (essentiellement le cancer du

colon) et facilitent ainsi le développement de métastases. Toutefois, les nombreuses études concernant les effets de la transfusion sur le cancer du colon ou d'autres cancers, aboutissent à des résultats partagés. La meilleure conclusion qui puisse être tirée est que la transfusion associée à la chirurgie du cancer doit être employée seulement après la considération prudente de ses bénéfices (Williamson, 2000).

D'un autre côté, l'immunomodulation peut avoir des effets bénéfiques comme la survie des allogreffes rénales, décrite il y a plus de 20 ans (Opelz *et al*, 1973). Suite à cette observation, les transfusions sanguines avant transplantation se sont généralisées pour d'autres organes. Les mécanismes exacts sont encore inconnus. Cependant ils impliquent que les leucocytes soient viables.

2.3 Transmission de virus et bactéries

La transmission de virus est liée à la transfusion de leucocytes, comme le cytomegalovirus (CMV), le virus Epstein-Barr (EBV), le VIH, ... La charge virale minimale suffisante pour causer l'infection après la transfusion dépend du type de virus, mais en général une déplétion " virale " de 6 log (99,9999%) semble nécessaire pour garantir la sécurité (Wagner *et al*, 1991 ; Dzik, 1995; Steneker *et al*, 1995). Pour l'instant, la prévention de l'infection virale n'est établie que pour le CMV même si la réduction de la charge virale par déleucocytation est techniquement possible pour l'HTLV (*Human T-cell leukemia virus*) et le VIH mais très peu d'informations cliniques sont disponibles.

La contamination bactérienne concerne surtout les plaquettes et semble être un problème relativement préoccupant, avec occasionnellement des décès par chocs

septiques. Seules trois études utilisant des méthodologies différentes ont estimé la fréquence de la contamination bactérienne de 4 à 10 pour 10000 unités (Williamson, 2000). Par ailleurs, un nombre non négligeable d'études a montré un possible effet préjudiciable à la déleucocytation du sang après son prélèvement. Dans ce cas, les granulocytes ne peuvent pas agir pour phagocyter les bactéries.

2.4 Déleucocytation et nouveau variant de Creutzfeldt-Jakob

La protéine prion normale est largement présente dans le sang humain, dont les lymphocytes T, les cellules NK, les monocytes (Durig *et al*, 2000) et les plaquettes, qui peuvent la relarguer après activation (Perini *et al*, 1996). Les plaquettes et le plasma apparaissent être la source principale (26,5% et 68,5% respectivement), avec seulement 3,2% pour les leucocytes et 1,8% pour les globules rouges (MacGregor *et al*, 1999). Il est maintenant connu que la maladie issue du nouveau variant est le résultat de la conversion de la protéine prion normale en une protéine prion insoluble qui s'accumule dans les tissus neurologiques. Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il n'y a pas de risques accrus entre la maladie classique de Creutzfeldt-Jakob et des transfusions de produits sanguins ou de plasma mélangé (Turner *et al*, 1998). Cependant, il apparaît prématuré de tirer les mêmes conclusions avec le nouveau variant de cette maladie. La transmission par transfusion sanguine est théoriquement possible (Williamson, 2000). Les données issues des études de Klein chez l'animal montrent que le transfert du prion depuis la périphérie vers le cerveau dépend de la présence de lymphocytes B (Klein *et al*,).

Néanmoins, une étude a conclu qu'une déleucocytation inférieure à 5.10^6 leucocytes / unité a le potentiel de réduire le nombre de cas de maladie du nouveau variant associée à la transfusion jusqu'à 36% (Report, 1999).

2.5 Transfusion et réaction du greffon contre l'hôte

La maladie de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD pour *Graft Versus Host Disease*) associée à la transfusion (TA-GVHD), qui est presque toujours mortelle, est causée par la prolifération de lymphocytes du donneur causant un dysfonctionnement de plusieurs organes. La seule méthode pour l'éviter est l'irradiation des produits par rayons gamma car certains cas ont été mis en évidence à partir de produits déleucocytés par filtration, indiquant que les lymphocytes T n'ont pas été suffisamment éliminés.

Une autre maladie, TRALI (pour *Transfusion Related Acute Lung Injury*), semble se produire par des interactions entre les anticorps leucocytaires du donneur et les granulocytes du receveur (Dykes *et al*, 2000; Popovsky, 2001). Il en résulte une agrégation des granulocytes et l'adhésion dans la circulation pulmonaire.

2.6 Réaction fébrile non hémolytique

Les réactions fébriles non hémolytiques sont les réactions les plus fréquentes à la transfusion. Le nombre de leucocytes nécessaire pour provoquer ces réactions n'est pas connu. Néanmoins, des observations ont montré que ces réactions se répétaient avec un temps de stockage des plaquettes plus long ; plusieurs études ont démontré que des interleukines (IL-1 β , IL-6, IL-8) et le TNF α augmentent pendant le stockage et que leurs niveaux corroborent les réactions fébriles (Muyllé *et al*, 1993). La

déleucocytation du sang avant stockage évite l'accumulation des cytokines, et permet aussi d'éviter les réactions fébriles liées à la transfusion.

3. HISTORIQUE DES TECHNIQUES DE DELEUCOCYTATION

Après la découverte de la relation entre les anticorps leucocytaires, la présence de leucocytes dans les produits sanguins et les réactions fébriles non hémolytiques, des essais ont été réalisés afin de réduire le nombre de leucocytes dans les préparations destinées à la transfusion (Dausset *et al*, 1966). Différentes méthodes sont détaillées par la suite mais à l'heure actuelle c'est la déleucocytation par filtration qui est la plus répandue.

3.1 La centrifugation inversée

La méthode de centrifugation inversée a été l'une des premières techniques de production de sang appauvri en leucocytes.

Quand les poches de sang sont centrifugées, les cellules du sang sédimentent selon leur taille et leur densité (Tableau 1).

Ainsi, après centrifugation, il apparaît une couche de plaquettes au-dessus d'une couche de leucocytes à l'interface du plasma et des globules rouges. Ces couches combinées avec quelques globules rouges et le plasma sont connues sous le nom de "buffy coat" (ou Couche LeucoPlaquettaire, CLP). La technique d'extraction de ces phases est réalisée manuellement, de façon semi-automatique ou par un automate (la plus répandue actuellement). Le buffy coat et le plasma sont transférés dans les poches satellites et le concentré globulaire est dirigé vers une poche contenant un anticoagulant. Après centrifugation d'un système triple poches, 70% du volume de globules rouges est drainé dans une poche satellite ; le système triple poches est recentrifugé ; 70 mL de plasma est ainsi transféré dans la poche contenant le sang

appauvri en leucocytes pour le resuspendre, le reste du plasma est envoyé dans la troisième poche, laissant le “buffy coat” dans la poche initiale. Environ 70% des leucocytes peuvent être ainsi éliminés mais avec une perte de 25 à 30% en globules rouges. Ce principe est quelquefois appliqué avant la phase de filtration. Le sang déleucocyté peut être conservé jusqu'à trois semaines à 4°C quand le CPDA1 a été utilisé comme anticoagulant.

3.2 Sédimentation

La sédimentation est un autre processus de déleucocytation ; les conditions de séparation peuvent être choisies de telle sorte que la taille des particules détermine la vitesse de sédimentation par gravité. L'adjonction au sang total d'agents tels que le dextran, l'hydroxy-ethyl-starch (dérivé d'amidon) forme des agrégats de globules rouges, connus sous le nom de “rouleaux”, qui augmente la vitesse de sédimentation. Après 45 minutes de sédimentation par gravité, les agrégats peuvent être séparés des leucocytes et des plaquettes. Jusqu'à 95% des leucocytes et des plaquettes peuvent être supprimés par cette méthode. Néanmoins elle requiert l'ouverture du container de sang, ce qui réduit son stockage à 24 h après la production. Par ailleurs la présence de macromolécules telles que le dextran peut avoir des effets anaphylactiques chez le receveur.

3.3 Congélation-décongélation

La méthode de congélation a été à l'origine développée pour la conservation à long terme des globules rouges. Afin de protéger les globules rouges contre la congélation, un agent cryoprotecteur, tel que le glycérol, est ajouté au sang. Le glycérol se lie

fortement aux globules rouges mais pas aux leucocytes. Pendant la congélation, des cristaux de glace se forment dans les leucocytes, provoquant la rupture de la membrane pendant la décongélation. Un lavage ultérieur permet d'éliminer le glycérol et des débris de leucocytes. Cette méthode permet d'éliminer jusqu'à 90% des leucocytes avec une perte en globules rouges d'environ 10%. Cependant le concentré de globules rouges peut contenir des fragments résiduels de leucocytes pouvant entraîner les mêmes complications post-transfusionnelles précédemment décrites pour des leucocytes intacts (Crowley *et al*, 1977). De plus, cette méthode pose de lourds problèmes logistiques et a conduit à son remplacement par d'autres techniques.

3.4 La filtration

C'est dès 1926 qu'Alexandre Fleming¹ décrit une méthode de déplétion des leucocytes du sang par la filtration sur la ouate (Fleming, 1926). Ses recherches n'étaient pas appliquées à la transfusion et il fallut attendre 1962 pour que cette idée fut appliquée à la filtration du sang pour les banques du sang (Greenwalt *et al*, 1962). Quand du sang hépariné était filtré sur des colonnes remplies de fibres telles que l'Orlon, le Dacron, le Teflon ou le nylon, on s'est aperçu que la déplétion des leucocytes était plus efficace quand des fibres de nylon étaient utilisées. Les granulocytes étaient très fortement retenus par les fibres par phagocytose alors que les cellules mononuclées se retrouvaient dans le filtrat avec les globules rouges. Malgré une déleucocytation incomplète, les risques de réactions fébriles liées à la transfusion étaient fortement diminués en utilisant des produits déplétés en granulocytes. La filtration sur des fibres

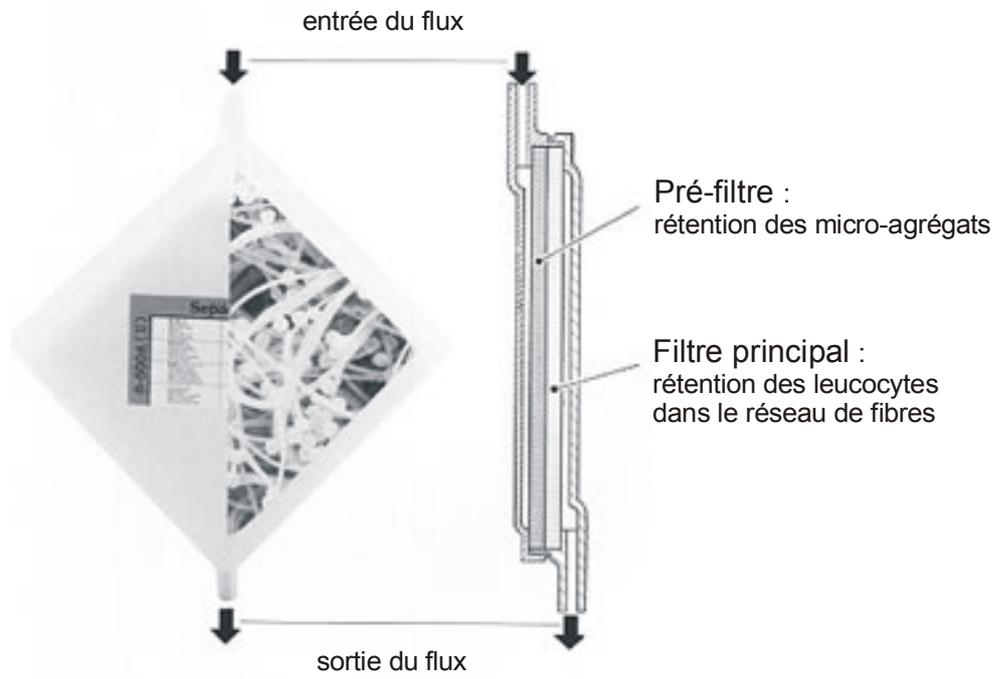
¹ Alexandre Fleming (1926) : " It has become a common observation that leukocytes adhere with great readiness to strands of fibrin, cotton-wool, glass or similar substances when blood is incubated in contact of these".

de nylon évolua par la suite en une technique d'isolation des lymphocytes ou de purification des granulocytes. La technique de filtration des leucocytes fut fortement améliorée en 1972 par Diepenhorst, qui développa un prototype fait à partir d'une colonne remplie de ouate tassée (Diepenhorst *et al*, 1972). Avec cette technique, plus de 95% des leucocytes, toutes populations confondues, étaient supprimés, ainsi que 90% des plaquettes, pour une perte de 10% environ des globules rouges. Deux ans plus tard, les premiers modèles étaient disponibles en routine dans les banques du sang. Peu de temps après l'introduction des filtres à base d'ouate, d'autres types furent développés à partir de fibres d'acétate de cellulose. Le remplacement des fibres naturelles par des fibres synthétiques garantit un effet pyrogénique moindre, une qualité constante du matériel, résultant en un produit plus sûr.

Plus récemment, la technologie utilisée pour la conception des filtres a considérablement évoluée. En effet, quand il fut constaté que la déplétion des leucocytes était accomplie en partie par l'adhésion des cellules sur les fibres du filtre, l'objectif a été de préparer des filtres ayant une plus grande surface de contact. La solution a été d'utiliser des fibres de faible diamètre. Elles sont créées à partir de polymères à l'état liquide soumis à un jet de gaz à haute vitesse, produisant un réseau de fibres non tissées qui peuvent atteindre un diamètre de 2 μm . Les filtres actuels sont constitués de plusieurs couches de fibres non tissées, composées pour la plupart de polyester. La figure 3 regroupe des modèles actuels de filtre à déleucocyter.

Jusqu'à maintenant, l'optimisation des matériaux des fibres a été très empirique. Le développement de nouveaux filtres serait accru par de meilleures connaissances des

Figure 3. Filtres à déleucocyter



mécanismes mis en cause dans la filtration du sang. Le tableau 2 regroupe des paramètres importants pour les performances des filtres récents (Dzik, 1993), comme par exemple une grande surface de contact, un faible volume mort, ... Mais très peu d'informations ont été recueillies sur ces mécanismes, car leur étude n'a jamais été systématique. Les hypothèses avancées par plusieurs auteurs proposent que la filtration des leucocytes soit gouvernée par deux principaux mécanismes : le tamisage et l'adhésion (Steneker *et al*, 1991; Pietersz *et al*, 1992).

Tableau 2. Spécifications d'un filtre ((Dzik, 1993))

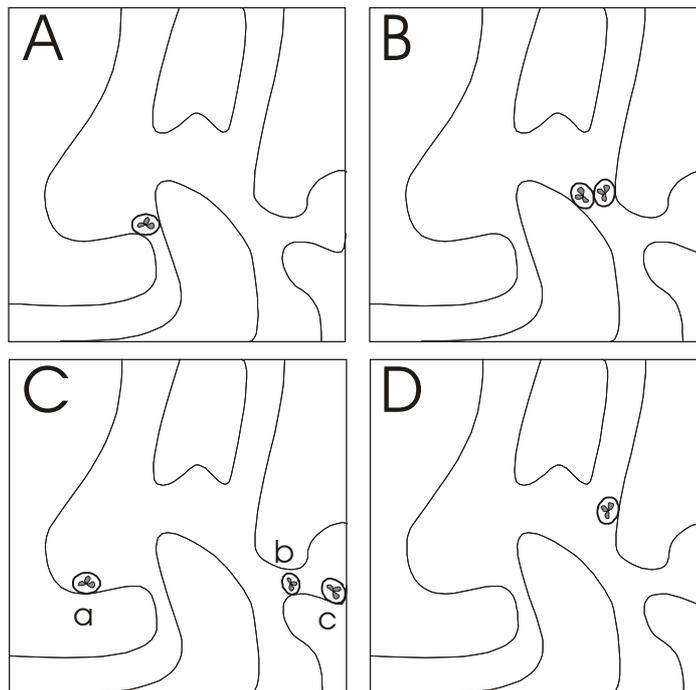
Caractéristiques générales	Surface de la section (cm ²) Epaisseur (cm) Volume mort (mL)
Intérieur du filtre	Matériau des fibres et modification de surfaces Diamètre des fibres (µm) Densité des fibres (mg/cm ³) Surface totale de fibres (m ²) Tension de surface (dynes/cm ²)
Caractéristiques du flux	Temps de passage (sec) Pression (Pa) Débit (mL./min) Contrainte de cisaillement (sec ⁻¹)

4. LES MECANISMES DE LA FILTRATION

Les procédés de filtration peuvent se classer en trois catégories : la filtration de surface, la “ cake filtration ” et la filtration en profondeur. La filtration de surface est une technique où les particules plus grosses qu'une taille donnée ne peuvent pas traverser la surface du filtre. Comme ces particules vont rapidement obstruer la surface du filtre, ce procédé ne fonctionne que pour de faibles concentrations de particules. Pendant la cake filtration, les particules filtrées forment une couche poreuse, un “ gâteau ”, dans la partie supérieure du filtre. Jusqu'à ce que le fluide puisse traverser cette couche, elle contribuera à la rétention de nouvelles particules. Pour la filtration en profondeur, la rétention des particules n'est pas restreinte à la surface du filtre. Généralement ces filtres sont constitués d'une large gamme de taille de pores à travers la matrice du filtre. Cette structure permet une capture des particules dans tout le filtre. La filtration des leucocytes du sang à l'aide des filtres peut être considérée comme une filtration en profondeur (Guidoin *et al*, 1977). Les théories développées pour expliquer les mécanismes de la filtration en profondeur ont été exclusivement appliquées à la filtration dans le lit des rivières. Plusieurs mécanismes élémentaires sont connus pour jouer un rôle dans la filtration en profondeur (Figure 4) : le blocage (A), le pontage (B), l'interception (C), et l'adhésion (D). Ces mécanismes peuvent aussi se combiner. Le blocage intervient quand la taille de la particule est plus grande que le diamètre du pore. Le pontage est un mécanisme significatif pour des concentrations élevées de particules et a lieu quand plusieurs particules s'engagent en même temps dans un pore. L'interception est un phénomène purement mécanique, lorsque les particules sont piégées dans le filtre, outre les petits

pores. Quand l'adhésion a lieu, l'action de forces mécaniques telles que la gravité, la pression hydrodynamique n'est pas nécessairement utile pour retenir les particules. D'après des études réalisées dans d'autres domaines (filtration industrielle, métallurgie, hydrologie,...), la taille des particules permet de distinguer la contribution mécanique (tamisage) de la contribution physico-chimique (adhésion); le tamisage devient prépondérant pour des particules supérieures à 30 μm , et l'adhésion est dominante pour une taille de particule inférieure à 1 μm . Entre ces deux bornes (cas de la filtration des leucocytes), les mécanismes agissent ensemble (Bruil *et al*, 1995).

Figure 4. Représentation schématique des mécanismes élémentaires de la rétention de cellules dans La filtration " en profondeur " : A. blocage, B. pontage, C. interception (a) cul-de-sac, (b) instable, (c) stable, D. adhésion.



4.1 Tamisage

Compte tenu de la variation en terme de taille et de déformabilité de cellules, la tamisage peut être considéré comme un mécanisme envisageable dans la filtration des leucocytes (Tableau 1). Il y a très peu de renseignements sur le rôle du tamisage dans la filtration cellulaire, même si la littérature dans le domaine de la biorhéologie et la microcirculation fournit quelques éléments.

4.1.1 Influence de la taille des pores

Comme il a été dit précédemment, l'intérieur des filtres à déleucocyter n'est pas homogène et consiste en une série de couches de fibres non tissées, compactées entre elles, à travers lesquelles le sang doit circuler. Au fur et à mesure, la taille des pores de chaque couche diminue. Au début de la filtration, le sang entre en contact avec les couches qui servent à récupérer les micro-agrégats. Puis il pénètre des couches de fibres de plus en plus denses permettant une filtration plus sélective. La taille des pores, définie par l'espace inter-fibres, est modulée par le degré de compactage des fibres (densité de fibres). Pour un diamètre donné, plus la densité de fibres est grande, plus la taille des pores est petite. Comme la rétention cellulaire est dépendante de la surface totale de contact, les fibres de petit diamètre sont préférées car elles offrent une plus grande surface de contact pour un volume donné de boîtier de filtre. Il a été montré que le taux de rétention de leucocytes passe de 20%, pour un réseau de fibres de 10 μm de diamètre, à 90%, pour des fibres de 3 μm de diamètre (Dzik, 1993).

Le réseau de fibres devenant de plus en plus serré dans l'épaisseur du filtre, c'est le facteur déformabilité cellulaire qui va être déterminant pour le passage des cellules. Le degré de déformabilité des leucocytes est environ 1000 fois plus petit que celui des

globules rouges. Ce facteur est déterminé par la résistance qu'une cellule sanguine offre en traversant un capillaire fin (Chien *et al*, 1983). Il dépend des propriétés viscoélastiques du cytoplasme et de la membrane, la forme de la cellule, et la relation surface/volume de la cellule (Chien, 1985). Ce degré de déformabilité des cellules est généralement réduit en présence d'ions calcium, et dépend en outre de l'anticoagulant utilisé (Zaiss *et al*, 1990).

Pour illustrer cette différence de déformabilité, il apparaît qu'un leucocyte passe difficilement un pore de 5 μm de diamètre alors qu'un globule rouge traverse un pore de 3 μm . Ainsi, pendant la filtration de sang total à travers des pores de 3 à 8 μm , les leucocytes vont obstruer les pores de faible diamètre. Il en résulte alors un accroissement de la pression en fonction du temps, qui peut être décrit mathématiquement en fonction de la déformabilité cellulaire, la taille des pores, la distribution des pores (Skalak *et al*, 1983; Skalak *et al*, 1987). Ce type d'expression s'applique parfaitement aux membranes de filtration, de type Nuclepore, mais n'est pas adapté aux filtres de déleucocytation dans lesquels la matrice filtrante est un réseau hétérogène de fibres.

Outre la taille des pores, la pression hydrostatique va influencer le passage des cellules à travers les pores. Si elle est trop faible, le flux de globules rouges ne circule pas à travers les pores. Si elle est trop élevée, les membranes des globules rouges risquent de se rompre, provoquant une hémolyse, ainsi que l'éclatement des membranes de leucocytes.

4.1.2 Margination

Quand le sang circule à travers des petits capillaires, les globules rouges sont généralement regroupés au niveau de l'axe du capillaire (Goldsmith *et al*, 1984). Ceci est dû à la forme flexible et biconcave des globules rouges ou à la formation de micro-agrégats, permettant aux globules rouges un déplacement radial vers l'axe. Les leucocytes sphériques et plus rigides sont poussés vers les parois des capillaires. C'est ce qui est appelé la margination et peut favoriser l'adhésion des leucocytes aux parois. Cet effet est d'autant plus important que le diamètre du capillaire est petit. Mais d'un autre côté, les contraintes de cisaillement près des parois des capillaires sont très fortes et peuvent inhiber l'adhésion. L'expression de molécules d'adhésion sur les parois va permettre de faire basculer la balance d'un côté ou de l'autre. Mais ces observations ne sont pas directement transposables aux filtres pour lesquels la contribution des fibres synthétiques n'est pas du même ordre. Tout au plus, la margination dans les filtres, si elle existe, peut accroître les différents mécanismes de capture des leucocytes (Figure 4).

4.2 Adhésion cellulaire

L'adhésion des cellules sanguines sur des surfaces solides est un processus compliqué dont les mécanismes sous-jacents sont peu connus. La membrane cellulaire peut être vue comme une surface hétérogène, composée d'une matrice de phospholipides contenant des groupes de glycoprotéines. Ces glycoprotéines, souvent des récepteurs, régule le comportement de la cellule, dont l'adhésion de la cellule à un substrat. Les études de récepteurs spécifiques, tels que LFA-1, Mac-1 ou p150-95 (Springer *et al*, 1986; Anderson *et al*, 1987), ont été nombreuses (cf. paragraphe *Molécules d'adhésion* p.33). Malgré plusieurs études des récepteurs dans le cadre de la chromatographie d'affinité pour la séparation cellulaire, il existe peu de renseignements sur leurs rôles dans la filtration.

Cependant, de nombreux auteurs ont détaillé l'adhésion non spécifique des leucocytes sur des surfaces, permettant de faire ressortir des facteurs importants.

4.2.1 Propriétés chimiques de la surface

Plusieurs auteurs ont essayé de relier le taux d'adhésion cellulaire à la composition chimique de la surface, mais peu d'études ont traité l'adhésion des leucocytes. Quelques travaux ont concerné l'adhésion des leucocytes et de cellules de reins de hamsters (BHK) sur des surfaces de polystyrène modifiées et ont montré que l'adhésion est augmentée par les chaînes hydroxyles et légèrement inhibée par les chaînes d'acide carboxylique (Curtis *et al*, 1983). D'autres auteurs, utilisant des types cellulaires différents, ont montré que les surfaces comportant des groupements hydroxyles ou amines, accroissent l'adhésion alors que les chaînes sulfonates provoquent l'effet inverse. L'effet des chaînes d'acide carboxylique sur l'adhésion est

controversé ; ceci semble s'expliquer en partie par les méthodes de greffage des chaînes (acétylation, méthylation, traitement par plasma).

Il est important de noter que l'ajout de groupes chimiques à une surface modifie aussi la charge, la mouillabilité et la microstructure. De plus, les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent changer par l'adsorption de protéines contenues dans le milieu cellulaire.

Les seules études, concernant la déleucocytation, qui ont traité séparément l'effet de facteurs physico-chimiques (chimie de la surface, mouillabilité et flux) ont été publiées par Bruil *et al* (Bruil *et al*, 1992; Bruil *et al*, 1994a; Bruil *et al*, 1994b). Les conclusions seront détaillées dans les prochains paragraphes avec d'autres résultats ne concernant pas directement la filtration du sang.

4.2.2 Charge de la surface

Comme beaucoup de cellules de mammifères, les leucocytes ont une charge de surface négative, due à la présence de groupes anioniques (phosphate, acide sialique, acide carboxylique) dans la membrane cellulaire. Les forces électrostatiques (répulsion ou attraction) peuvent par conséquent influencer l'adhésion (Bruil *et al*, 1995). Il est généralement conclu que les surfaces chargées négativement réduisent l'adhésion alors que les surfaces chargées positivement l'augmentent. Ces résultats corroborent généralement les effets du greffage de chaînes, détaillés auparavant.

La théorie DVLO (du nom des ses auteurs Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek), qui décrit l'énergie libre d'une particule colloïdale en fonction de la distance inter-particules, est souvent utilisée pour prédire le taux d'adhésion cellulaire sur une

surface chargée (Srinivasan *et al*, 1981). Ce taux d'adhésion dépend des interactions électrostatiques et des interactions de van-der-Waals entre la surface et les cellules. Cette théorie prédit donc que la probabilité d'adhésion de cellules est d'autant plus faible que la surface est fortement chargée.

4.2.3 Mouillabilité de la surface

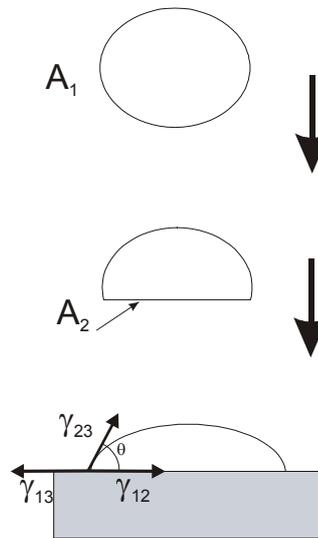
Les tensions de surface du sang et des matériaux du filtre jouent un rôle important dans la rétention des leucocytes aussi bien dans le cas de capture mécanique ou de capture "biologique". Chaque matériau synthétique a une tension de surface caractéristique qui est généralement inférieure à celle du sang. Les fibres des filtres dont la tension de surface est nettement inférieure à celle du sang seront difficiles à mouiller. Ainsi dans les parties plus denses du filtre où la surface de contact des fibres s'accroît et la taille des pores décroît, le problème de mouillage des fibres (perlage) va se traduire en une plus grande résistance à l'écoulement, nécessitant ainsi une plus forte pression. Le défaut de mouillabilité peut aussi réduire le contact des leucocytes avec le matériau, en interférant ainsi avec le mécanisme biologique de rétention. Par ailleurs, il est important que la mouillabilité du filtre soit homogène. Dans le cas contraire, la surface de contact serait réduite.

La tension de surface (γ_{23}), propriété de tout liquide, est définie comme la tendance d'un liquide à minimiser sa surface de contact (Annexe 1). Les solides ont aussi une tension de surface caractéristique (γ_{13}). Tout liquide placé sur différents types de surfaces solides va "perler" à divers degrés, dépendant entre les tensions de surfaces respectives du liquide et des solides. Les interactions de ces deux forces définissent la

tension à l'interface, γ_{12} , selon la relation $\gamma_{13} - \gamma_{23} \cos\theta = \gamma_{12}$ où θ est l'angle de contact entre le liquide et le solide (Figure 5).

Quand γ_{13} est nettement plus petit que γ_{23} , l'angle de contact est grand, le liquide perle à la surface du solide et la surface n'est pas " mouillée ". Ce problème peut être résolu par l'ajout de surfactant pour abaisser la tension de surface du sang ou en effectuant un traitement de surface du solide pour augmenter sa tension de surface. Ce traitement peut être réalisé par irradiation pour greffer de façon covalente des groupes fonctionnels hydrophiles (Dzik, 1993).

Figure 5. Les différents stades de l'adhésion ;
A1=surface non participante ; A2=interface d'adhésion ;
 γ =énergie de surface



Il est généralement admis que les surfaces hydrophiles favorisent l'adhésion de leucocytes par rapport aux surfaces hydrophobes même s'il existe des travaux contradictoires (Lim *et al*, 1991).

Les travaux de Bruil *et al*, concernant la déleucocytation, vont dans le même sens (Bruil *et al*, 1994a). Il a observé que l'adhésion des leucocytes augmente sur des films de polyuréthane modifié quand la mouillabilité est plus grande. De plus, le nombre de lymphocytes adhérents est nettement plus faible que les granulocytes, confirmant les travaux d'autres auteurs (Grinnel, 1978). Ces résultats quantitatifs sont par ailleurs appuyés par des observations microscopiques de la morphologie des cellules adhérentes, qui montrent plus de granulocytes adhérents étalés que de lymphocytes. L'étalement de cellules sur un substrat est généralement associé au processus d'adhésion (Grinnel, 1978).

Pour expliquer cet accroissement d'adhésion sur les surfaces hydrophiles, Neumann *et al* ont utilisé un modèle thermodynamique dans lequel l'énergie libre résultant de l'adhésion dépend de l'énergie libre de la surface (Absolom *et al*, 1988), elle même liée à la mouillabilité (Tableau 3). Ce modèle a été aussi utilisé pour l'adhésion des plaquettes et des globules rouges (Absolom *et al*, 1985; Absolom *et al*, 1987).

Tableau 3. Tension de surface des cellules sanguines
(Neumann *et al*, 1983; Absolom *et al*, 1988)

Type cellulaire	Tension de surface (mJ/m ²) à 22°C
Globules rouges (humain)	70,1
Lymphocytes (humain)	70,1
Granulocytes (humain)	69,1
Plaquettes (porc)	67,2

Remarque : la tension de surface d'un tampon de Hanks à 22°C est de 72,6 mJ/m².

Ces différentes études tendent à montrer que la tension de surface optimale pour les fibres de filtres est un compromis entre une tension de surface élevée pour accroître la mouillabilité, la circulation du sang, et une tension de surface plus faible pour faciliter l'adhésion.

4.2.4 Morphologie de la surface

Certaines caractéristiques morphologiques de la surface, telles que la porosité, la courbure, la texture, sont connues pour influencer l'adhésion cellulaire à un substrat extracellulaire (Grinnel, 1978). Par exemple, les fibroblastes adhèrent plus fermement à une surface poreuse. La rugosité et les irrégularités de surface peuvent aussi influencer l'adhésion en l'augmentant (Zingg *et al*, 1982). Ces remarques s'appliquent aussi aux matériaux des filtres de déleucocytation, comme l'a observé Guidoin *et al*, avec un nombre plus important de plaquettes et de leucocytes adhérents (Guidoin *et al*, 1977). L'effet de la rugosité sur l'adhésion peut s'expliquer par la présence de micro-bulles d'air pouvant activer le système du complément, et ainsi contribuer à l'adhésion.

5. PARAMETRES INFLUENÇANT LA RETENTION LEUCOCYTAIRE

5.1 Composition du sang

La composition du sang peut influencer l'adhésion dans différents cas. Compte tenu de la variabilité en terme d'adhésion des différentes populations de leucocytes (tableau 1), la composition et la concentration de la population totale de leucocytes peuvent influencer l'adhésion (Bruil *et al*, 1995). De même, la concentration de plaquettes a une importance dans son rôle de pontage entre la surface et les leucocytes, comme il sera détaillé plus tard. Les globules rouges peuvent aussi être impliqués dans le processus d'adhésion par le phénomène de margination, décrit précédemment.

L'implication du plasma est plus équivoque comme on peut le voir dans la divergence des résultats, tantôt promoteur, tantôt inhibiteur de l'adhésion des leucocytes (cf. paragraphe suivant).

Les ions, Ca^{2+} et Mg^{2+} en particulier, sont connus pour favoriser l'adhésion leucocytaire (Grinnel, 1978; Forrester *et al*, 1984). Il est important de noter que, dans le cadre de la filtration, non seulement l'adhésion mais aussi la déformabilité des leucocytes sont influencées par les ions divalents (Zaiss *et al*, 1990).

La présence de ces ions est elle-même fonction de l'anticoagulant utilisé, comme par exemple l'EDTA qui inhibe l'adhésion des leucocytes (Lang *et al*, 1988).

5.2 Activation du complément

Le système humain du complément est un ensemble complexe d'au moins 25 constituants, qui après activation, interagissent entre eux dans une séquence donnée

pour produire des molécules effectrices (Müller-Eberhard, 1988). Une des fonctions physiologiques de l'activation du complément est de réguler la réponse immunitaire après une infection bactérienne ou virale, par ce qu'on appelle la voie classique. L'activation du complément est aussi engagée pendant l'adhésion de leucocytes sur des surfaces artificielles (Kazatchkine *et al*, 1988). L'activation du complément par une autre voie, dépendante en Ca^{2+} et Mg^{2+} , génère les fragments C3a et C5a, reconnus pour favoriser l'adhésion et l'agrégation des leucocytes (Kazatchkine *et al*, 1988).

L'importance de l'activation du complément dépend des caractéristiques physico-chimiques de la surface. Le tableau 4 présente le potentiel d'activation du complément de plusieurs polymères. Les surfaces négativement chargées sont connues pour avoir une faible capacité à activer le complément, probablement due à l'adsorption du cation C5a. A l'opposé, les groupements amines ou hydroxyles ont été observés comme étant activateurs du complément. Mais il convient de noter aussi que des composants de protéines plasmatiques pré-adsorbés sur la surface peuvent davantage causer l'activation du complément que la nature même du matériau (Chenoweth, 1987).

5.3 Adsorption des protéines

Un des premiers événements qui a lieu quand un matériau est exposé à du sang, bien même avant l'adhésion de cellules, est l'adsorption des protéines plasmatiques sur la surface. Pendant ce phénomène, il y a une compétition entre les différentes protéines du plasma connue sous le nom d'effet Vroman. On observe un « déplacement »

graduel des protéines adsorbées, selon leurs concentrations et leurs coefficients de diffusion, qui se produit sur les surfaces hydrophiles dans la séquence suivante :

Tableau 4. Etude de polymères sur l'activation du complément et sur le potentiel d'adhésion des leucocytes (Bruil *et al*, 1995)

Polymère / nom courant	Activation du complément ¹	Adhésion des leucocytes ²
Polyacrylonitrile	•	•••
Polycarbonate	•	•
Polyéthylène	•	••
Polypropylène	•	•
Polytetrafluoroéthylène /Teflon	•	•
Polystyrène	•	•
Polysulfone	•	•
Polyvinylchloride	•	•
Acetate de cellulose	••	•••
Polydimethylsiloxane	••	••
Poly(éthylène téréphthalate) / Dacron	••	•••
Poly(méthyl methacrylate)	••	•••
Polyuréthanes	••	••
Cellulose / Cellophane	•••	•••
Polyaramides / Nylons	•••	•••
Poly(hydroxyéthylène methacrylate)	•••	•
Polyvinylalcool	•••	•

(1) potentiel relatif d'activation du complément (proportionnel au nombre de points), classé selon l'activité hémolytique ou la génération de C3a/C5a. Résultats recueillis dans différentes études.

(2) Prédisposition relative à l'adhésion leucocytaire, établie à partir de plusieurs auteurs.

albumine, immunoglobuline G, fibrinogène, fibronectine, kininogène de haut poids moléculaire et facteur XII (Vroman, 1987). La quantité de protéines adsorbées est dépendante des propriétés physico-chimiques de la surface et en général, elle est plus importante sur les surfaces hydrophobes (Absolom *et al*, 1987).

L'adhésion leucocytaire est connue pour être influencée par la pré-adsorption des protéines. Par exemple, il est connu que l'albumine inhibe l'adhésion, alors que les globulines peuvent l'augmenter (Forrester *et al*, 1984). La fibronectine (Fn) est aussi reconnue comme « promoteur » de l'adhésion, agissant comme une molécule « pont » entre la cellule et le substrat.

La concentration optimale de plasma nécessaire à la plus forte déplétion leucocytaire n'est pas connue. Cependant, plusieurs études tendent à montrer qu'il est préférable de travailler dans des conditions de filtration où la concentration de plasma est faible. Par exemple, Bruil montre dans un système de chambre à flux que des polynucléaires adhèrent moins à un matériau (polyéthylèneimine) quand on ajoute 10% de plasma à la solution tampon de resuspension (Bruil *et al*, 1994b). Cependant, certaines études contredisent ces résultats. Ledent et Berlin ont comparé la filtration de concentrés globulaires contenant ou non 10% de plasma (Ledent *et al*, 1996). Le nombre de leucocytes résiduels est plus élevé pour les concentrés globulaires dilués dans le SAGMAN (saline-adenine-glucose-mannitol), c'est-à-dire sans plasma. Par la suite, les auteurs ont observé une diminution de l'efficacité de la filtration quand ils ajoutent 10% d'albumine. Enfin, ils ont relevé une déplétion sensiblement plus grande après adjonction de 10% de plasma inactivé. Ils concluent d'une éventuelle influence

de protéines stables à la chaleur qui favorisent l'adhésion des leucocytes dans le filtre et que l'effet du plasma n'est pas dépendant du complément ou du fibrinogène.

5.4 Effet de la température

De façon générale, les filtrations de routine sont réalisées à température ambiante (20-22°C). A cette température, on observe une déformabilité des globules rouges proche de celle à 37°C, et une capacité optimale de l'adhésion des leucocytes et des plaquettes (Steneker *et al*, 1995). Néanmoins, il y a peu d'études de l'influence de la température sur l'efficacité de la filtration. Ledent et Berlin ont testé la filtration à 4°C et 37°C (Ledent *et al*, 1996). Ils ont relevé un accroissement de 2 log des leucocytes résiduels dans le filtrat pour les poches de sang filtrées à 37°C. D'autres études confirment une baisse de performance de la déleucocytation à haute température (Kikugawa *et al*, 1978; Davey *et al*, 1989; Beaujean *et al*, 1992; van_der_Meer *et al*, 2001).

5.5 Effet du stockage

Les changements de température du sang pendant la collecte et le stockage, avant la déleucocytation, peuvent influencer fortement les propriétés et la viabilité des leucocytes et des plaquettes, comme le système de la quinine, la chaîne de la coagulation et les agglutinines dans le plasma.

A 4°C, les granulocytes perdent l'intégrité et la flexibilité de leurs membranes, leur mobilité et les propriétés de diapédèse, leur capacité à produire des radicaux de l'oxygène et perdent leur aptitude de phagocytose des bactéries (Loos *et al*, 1998). Toutes ces modifications apparaissent dans les 24 h et peuvent être évitées en plaçant le sang à température ambiante.

Le délai optimal pour la déplétion des leucocytes après la collecte du sang correspond au moment où les granulocytes ont ingéré les microorganismes qui peuvent être présents après la collecte et quand les leucocytes n'ont pas relargué des quantités trop importantes de cytokines, d'histamine ou activé le système de la quinine. La récupération des globules rouges est aussi influencée par ce délai dans la mesure où la morphologie et la flexibilité de ces cellules changent pendant le stockage. Un délai trop long peut entraîner une plus forte perte de globules rouges dans le filtre. Au contraire, des délais trop courts (inférieurs à 2 h) pénalisent l'efficacité de la déleucocytation (Smith *et al*, 2000). Finalement, ce délai peut être estimé à environ 12 h après le don et le stockage à 20°C (Loos *et al*, 1998).

5.6 Effet du débit

Comme l'a montré le tableau 2, les caractéristiques du flux sont des paramètres non négligeables de la filtration. Néanmoins, les paramètres optimaux sont délicats à déterminer compte tenu de la géométrie complexe du filtre. Il faut un temps de passage des cellules dans le filtre suffisamment long pour que l'adhésion ait lieu. Il faut aussi tenir compte du débit et des contraintes qu'il engendre sur les cellules circulantes et les cellules adhérentes. Des contraintes trop élevées peuvent détacher les leucocytes adhérents aux fibres. C'est pourquoi la conception d'un filtre doit minimiser les contraintes locales (Dzik, 1993).

En routine, les poches de sang sont filtrées par gravité, conduisant à un débit moyen de 20-25 mL/min (de 450 à 500 mL de sang filtré en 15 à 20 minutes). Une étude récente conforte ce mode de filtration par gravité. L'auteur a ainsi montré en utilisant

des filtres standards qu'il n'y avait pas de corrélation entre le débit et la déleucocytation, en faisant varier le débit de 25 à 110 mL/min (Janetzko *et al*, 1999). Toutefois, d'autres études, en utilisant là aussi des filtres taille réelle, nuancent ces conclusions. Une d'entre elles montre que des contraintes hydrodynamiques trop fortes associées à des débits trop élevés à travers les filtres réduisent les performances de déplétion de leucocytes (Nishimura *et al*, 1989; Smith *et al*, 2000). Bruil quant à lui a observé l'adhésion de leucocytes en chambre d'écoulement sur différents supports. Il montre que l'adhésion des cellules n'est pas forcément la plus élevée quand la contrainte de cisaillement est la plus faible. Ces observations sont encore plus marquées quand les leucocytes sont en présence de plaquettes (Morley *et al*, 1989; Bruil *et al*, 1994b). Ces résultats confortent l'idée qu'il doit y avoir une gamme de contraintes de cisaillement pour laquelle l'adhésion des leucocytes serait optimale dans la filtration sanguine.

6. LES MOLECULES D'ADHESION

Les leucocytes et les plaquettes sont des cellules qui possèdent une grande variété de molécules spécifiques à leurs surfaces permettant le contact et l'adhésion. Ces molécules d'adhésion appartiennent à au moins trois grandes familles de protéines : les intégrines, les sélectines et la superfamille des immunoglobulines.

De nombreuses molécules d'adhésion leucocytaires peuvent contribuer à l'adhésion cellulaire pendant la filtration sanguine mais il y a jusqu'à présent très peu d'informations permettant d'évaluer leur importance en tant que mécanisme de déplétion. La rétention des leucocytes par adsorption peut être augmentée par l'activation cellulaire et l'adhésion. La propriété des leucocytes à adhérer à certaines surfaces synthétiques est connue depuis des années et constitue la base des premières méthodes pour la récupération des granulocytes (Djerassi *et al*, 1972). Des études ont suggéré que l'activation et l'adhésion peuvent varier selon le type de leucocytes (Steneker *et al*, 1990; Steneker *et al*, 1991). Après filtration de sang dans différents modèles de filtres puis rinçage, les filtres sont fixés au formaldéhyde et découpés au microtome en fines sections. Les auteurs ont ainsi pu observer sur les coupes que les lymphocytes sont retenus principalement par capture mécanique alors que les granulocytes et les plaquettes sont retenus par un processus « direct » d'adhésion. Par ailleurs, les auteurs ont relevé des signes d'activation des cellules sur les filtres composés principalement de fibres de polyester sans toutefois préciser si la phase d'activation est un pré-requis pour l'adhésion.

Un second mécanisme d'adhésion envisagé est l'interaction entre les plaquettes et les leucocytes ; ce mécanisme est détaillé par la suite.

6.1 Les intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui sont liées aux protéines du cytosquelette et qui véhiculent les signaux extra-cellulaires (Figure 6). Chaque intégrine est constituée de chaînes d'hétérodimères α et β , liées de façon non covalente. Ces sous unités consiste en de grandes régions extracellulaires (domaine de liaison au ligand), une courte région transmembranaire, et une partie cytoplasmique de longueur variable. Chez les mammifères, au moins 17 sous unités α et 8 sous unités β ont été identifiées qui peuvent former 22 récepteurs différents. Certaines intégrines interagissent avec un seul ligand spécifique. Cependant il est plus courant qu'une intégrine spécifique reconnaisse plusieurs ligands. Bien qu'il y ait un haut degré de redondance, chaque intégrine à une fonction biologique spécifique, de sorte que les intégrines qui interagissent de façon identique avec un ligand particulier n'induisent pas nécessairement la même réponse cellulaire.

6.1.1 Intégrine $\beta 2$

L'intégrine $\beta 2$ (CD11/CD18), caractéristique des leucocytes, est constituée de trois hétérodimères avec des chaînes α spécifiques (CD11a, b, c, d) et une chaîne β commune (CD18). Elle joue un rôle important au niveau de l'adhésion de cellules, requise pour plusieurs fonctions leucocytaires (Arnaout, 1990; Patarroyo *et al*, 1990). L'intégrine $\beta 2$ est particulièrement intéressante car l'absence de cette protéine provoque le syndrome de déficience d'adhésion leucocytaire, LAD (pour Leukocyte Adhesion Defficiency).

Figure 6. Représentation schématique de l'intégrine

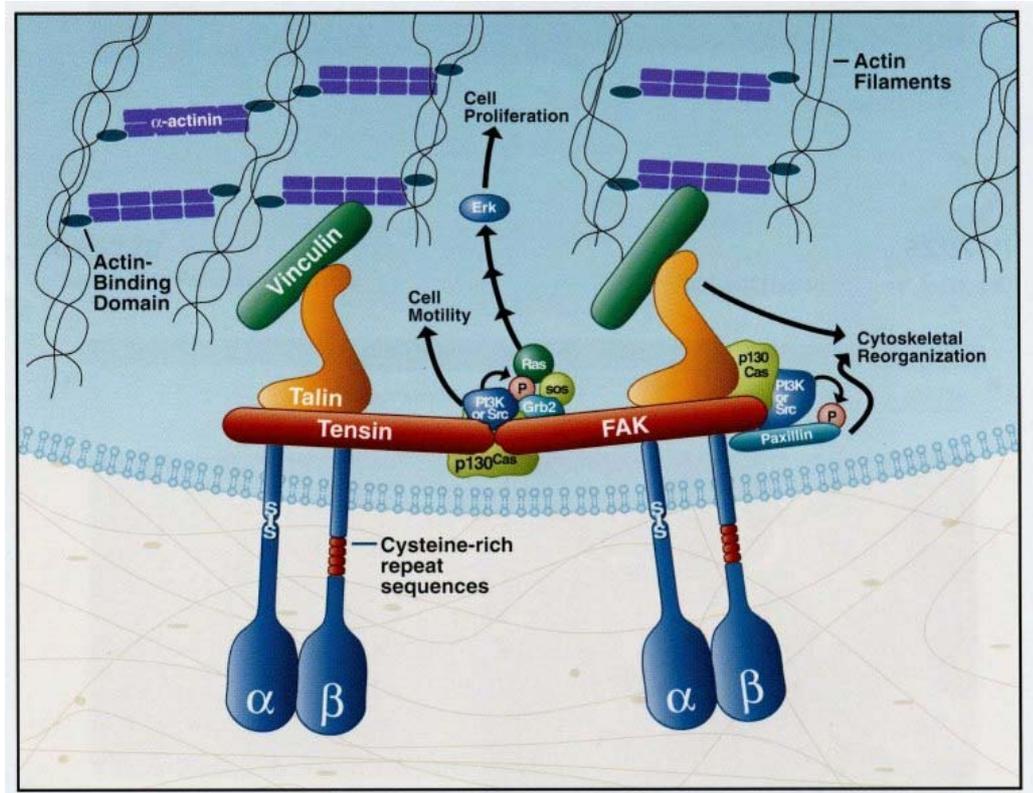


Tableau 5. Molécules d'adhésion (Dzik, 1993)

PN = Polynucléaire Neutrophile

LY = LYmphocytes

MO = MOncocytes et Endo = endothélium

Famille	Nom	Distribution cellulaire	Ligand
$\beta 2$ intégrine	CD11a-18 LFA-1	PN, LY, monos	ICAM-1, ICAM-2 sur endo
$\beta 2$ intégrine	CD11b-18 Mac-1	PN, monos	ICAM-1, C3bi sur endo
$\beta 2$ intégrine	CD11c-18 p150,95	PN, monos	ICAM-1 sur endo
$\beta 2$ intégrine	CD11d	PN, LY, monos	ICAM-3
$\beta 1$ intégrine	CD49d-29 VLA-4	LY. Monos	VCAM-1 sur endo
P-sélectine	CD62 GMP-140	plaquettes et endo activaté	PSGL-1
E-sélectine	- ELAM-1	Endo activé	ESL-1
L-sélectine	- LAM-1, Leu-8	PN, LY	CD34, GLYCAM-1
Superfamille des IgG	CD2 LFA-2	LY	LFA-3 sur LY
Superfamille des IgG	CD58 LFA-3	LY	CD2 sur LY
Superfamille des IgG	ICAM-1	Endo, PN	LFA-1, Mac-1, fibrinogène
Superfamille des IgG	ICAM-2	Endo, LY	LFA-1
Superfamille des IgG	ICAM-3	PN, LY, monos	LFA-1
Superfamille des IgG	VCAM-1	Endo	VLA-4 sur LY
$\beta 3$ intégrine	CD41-61 GPIIb-IIIa	Plaquettes	Fibrinogène, VWF
$\beta 1$ intégrine	CD49b-29 GPIa-IIa	Plaquettes	Collagène
$\beta 1$ intégrine	CD49e-29 GPIc-Iia	Plaquettes	Fibronectine
LRG	CD42 GPIb-IX	Plaquettes	VWf

CD11a/CD18 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1, LFA-1) qui est principalement trouvée sur les leucocytes mononucléés, se lie aux terminaisons NH₂ des molécules d'adhésion intercellulaires ICAM-1 (ou CD54) (Patarroyo *et al*, 1990), ICAM-2 (CD102) (de_Fougerolles *et al*, 1991), et ICAM-3 (CD50) (de_Fougerolles *et al*, 1992) appartenant à la superfamille des immunoglobulines. CD11b/CD18 (Mac-1), qui est exprimée principalement sur les cellules de la lignée myelo-monocytaire, se lie à ICAM-1 via le troisième domaine immunoglobuline (Diamond *et al*, 1991). De plus CD11b/CD18 se lie aussi à plusieurs ligands solubles dont le fragment du complément iC3b (Wright *et al*, 1983), le fibrinogène (Altieri *et al*, 1988) et le facteur X. Les ligands de CD11c/CD18 sont peu caractérisés. Il a été montré que CD11c/CD18 se lie à iC3b (Myones *et al*, 1988) et au fibrinogène (Postigo *et al*, 1991) entre autres. Enfin, CD11d, dernière sous-unité découverte récemment, est principalement exprimée sur les cellules myelomonocytaires (Noti *et al*, 2000).

6.1.2 Intégrine $\beta 1$

Les intégrines $\beta 1$ partagent CD29 comme sous-unité β commune. Cette famille d'intégrines largement représentée contient des séries de récepteurs cellulaires pour des protéines de la matrice extra-cellulaire telles que la fibronectine, la laminine, le collagène et la vitronectine. Il a été montré qu'un des membres de la famille $\beta 1$ des intégrines, $\alpha 4\beta 1$ (CD49d-29, VLA-4), est impliqué dans l'adhésion des lymphocytes, des monocytes, des éosinophiles, des basophiles, les cellules NK sur les cellules endothéliales activées par les cytokines (Carlos *et al*, 1994). Les Ligands de $\alpha 4\beta 1$ incluent VCAM, la fibronectine et la thrombospondine entre autres.

6.2 Les sélectines

La famille des sélectines comprend trois catégories désignées par les préfixes E (endothéliale), P (plaquette), L (leucocyte). E-sélectine (CD62E) et P-sélectine (CD62P) sont exprimées sur les cellules endothéliales et L-sélectine (CD62L) est exprimée uniquement sur les leucocytes. Les sélectines se caractérisent par trois régions extracellulaires typiques : un domaine de type lectine capable de reconnaître des structures sucrées complexes, un deuxième analogue à un élément de l'*epidermal growth factor* (EGF) et un troisième retrouvé dans certaines protéines contrôlant le complément.

Les ligands des sélectines sont de type protéique ou de type carbohydrate. On peut citer par exemple pour le premier type, la protéine PSGL-1 (pour P-Selectin Glycoprotein Ligand) pour la P-sélectine (Sako *et al*, 1993); CD34 et GlyCAM-1 (Dowbenko *et al*, 1993)(pour Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1) pour la L-sélectine ; ESL-1 (pour E-selectin Ligand-1) pour la E-sélectine (Wild *et al*, 2001). Les ligands de type carbohydrate sont étudiés depuis de nombreuses années. On peut citer pour la E-sélectine, le ligand sialyl Lewis X (SLe^x ou CD15s) (Phillips *et al*, 1990) ou des structures proches. E-sélectine reconnaît aussi un isomère de SLe^x, le sialyl Lewis a (SLe^a ou CD15a) (Berg *et al*, 1992). Il apparaît que SLe^a est davantage exprimé sur les cellules métastatiques que sur les leucocytes, expliquant que ces interactions molécule/ligand ont lieu au niveau de métastases plutôt que pendant la circulation des leucocytes. Les premières études ont montré que P-sélectine reconnaît le Lewis X (Le^x ou CD15) (Larsen *et al*, 1990) bien qu'ultérieurement il a été montré

que SLe^x a une plus forte affinité (Foxall *et al*, 1992). Comme la E-sélectine, P-sélectine se lie aussi à SLe^a. Par ailleurs, il a été montré que P-sélectine se lie aussi à des glycolipides sulfatés et certains polysaccharides sulfatés tels que l'héparine. Comme E-sélectine et P-sélectine, L-sélectine se lie à SLe^x et SLe^a (Foxall *et al*, 1992). L-sélectine et P-sélectine (mais pas E-sélectine) reconnaissent aussi des sulfatides et des polysaccharides sulfatés tels que l'héparine et le fucoïdan (Handa *et al*, 1991).

6.3 Les immunoglobulines

La famille des immunoglobulines (Ig) correspond à des protéines de surface qui sont impliquées dans la reconnaissance des antigènes (type C1) ou dans l'adhésion cellulaire (type C2) (Carlos *et al*, 1994). Cinq membres de cette famille au moins, sont impliqués dans l'adhésion leucocytaire : ICAM-1 (pour Intercellular Adhesion Molecule-1) ou CD54, ICAM-2 ou CD102, VCAM-1 (pour Vascular Cell Adhesion Molecule-1) ou CD106, PECAM-1 (pour Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) ou CD31 et l'adressine mucosale (MadCAM-1). Les ligands de ces immunoglobulines ne vont pas tous être détaillés. Néanmoins, on peut citer que ICAM-1 a pour ligand CD11a/CD18, CD11b/CD18 et CD11c/CD18.

6.4 Les molécules d'adhésion des plaquettes

Il y a de nombreuses preuves que des plaquettes adhérentes favorisent l'adhésion de leucocytes. A partir de 1961, Garvin remarqua que le taux d'adhésion des polynucléaires neutrophiles sur la laine de verre siliconée variait avec l'adhésion préalable des plaquettes (Garvin, 1961). Des effets comparables ont été observés par d'autres auteurs (Rasp *et al*, 1981; Morley *et al*, 1989). Bruil a étudié l'adhésion de

polynucléaires neutrophiles sur des surfaces de polyuréthanes modifiées en condition de flux et a remarqué que la présence des plaquettes dans le milieu de suspension augmente de façon significative le nombre de cellules adhérentes (Bruil *et al*, 1994b). Il en conclut que ce type d'interactions est un facteur important dans la déleucocytation. Steneker montra une corrélation positive entre la présence de plaquettes et la déplétion leucocytaire en filtrant des concentrés globulaires avec ou sans plaquettes (Steneker *et al*, 1992). Par ailleurs, des études en microscopie électronique ont montré que les plaquettes ont une très forte affinité pour les fibres des filtres à déleucocyter, aux vues de leurs modifications de forme et de la formation de pseudopodes (Steneker *et al*, 1992; Steneker *et al*, 1992). Ce changement de forme requiert une cellule viable capable de transduction du signal et d'activation. L'activation cellulaire peut être directement influencée par la nature du matériau utilisé dans le filtre. Par exemple, Sasakawa montra que des fibres de polyester dont on augmente le ratio molaire de groupes amines chargés positivement induit une activation des plaquettes par le relargage de β -thromboglobulin dans le filtrat (Sasakawa *et al*, 1989). En outre, il a été montré que les plaquettes activées peuvent relarguer des protéines adhésives telles que le fibrinogène, la fibronectine ou le facteur von Willebrand qui peuvent augmenter l'adhésion leucocytaire (Morley *et al*, 1989). Les plaquettes activées peuvent aussi exprimer un récepteur, PADGEM (pour Platelet Activation-Dependent Granule External Membrane protein) encore appelé GMP-140 ou CD62P, sur lequel les leucocytes peuvent adhérer (Larsen *et al*, 1989; Hamburger *et al*, 1990). Une glycoprotéine, PSGL-1, trouvée sur les polynucléaires neutrophiles et la lignée

cellulaire HL60, a été mise en évidence comme ligand pour l'adhésion via CD62P (Moore *et al*, 1992).

Par ailleurs, des études en chambre d'écoulement ont montré que les interactions leucocytes-plaquettes sont fortement influencées par le degré d'activation des plaquettes (Stone *et al*, 1999). Quand les plaquettes sont conservées dans un état de repos, il y a très peu d'adhésion et celles-ci ne sont pas stables.

Chapitre 1

LE MODELE

DE

MINIFILTRE

1. INTRODUCTION AU PREMIER ARTICLE

Comme cela vient d'être détaillé dans l'introduction, les mécanismes de capture des leucocytes pour la filtration du sang sont de nature complexe et regroupent différents types d'interactions que l'on désignera par « interactions mécaniques » et « interactions biologiques ». Le premier type correspond au tamisage des cellules, discriminées par des critères de diamètre cellulaire et des critères de déformabilité cellulaire. Dans ce type d'interaction intervient un paramètre géométrique inhérent au filtre, c'est-à-dire sa porosité et le diamètre des fibres entre autres. Les interactions biologiques quant à elles font appel d'une part aux propriétés « adhésives » des différents types cellulaires et des caractéristiques physico-chimiques qui peuvent influencer cette adhésion. Le travail présenté dans ce chapitre se concentre sur l'influence des molécules d'adhésion au sein du filtre. Pour ce faire, nous avons utilisé deux techniques. La première est un modèle réduit d'un filtre à déleucocyter. Il nous est apparu nécessaire de travailler sur des volumes nettement plus petits que ceux

utilisés dans les filtres standards. Par ailleurs, ce volume réduit nous a permis de travailler avec des anticorps permettant de mettre en évidence le type de molécules d'adhésion entrant en jeu. La seconde technique consiste à utiliser un modèle de lignée cellulaire. Il est employé par la suite dans le second article. Le minifiltre nous a permis de diminuer le volume de filtration mais le sang reste une denrée rare et ce fluide complexe ne permet pas directement de mettre en évidence l'influence ou non d'un de ces constituants. Pour palier cette difficulté, nous avons choisi plusieurs modèles de lignées cellulaires dont les caractéristiques se rapprochent de celles des leucocytes humains. Dans ce chapitre, notre choix s'est arrêté sur la lignée HL60, lignée promyelocytaire humaine. Cette lignée a été largement utilisée pour modéliser les leucocytes humains (Lei *et al*, 1999). Le premier avantage est de pouvoir travailler dans des conditions de type cellulaire unique, s'affranchissant ainsi des interactions avec les autres éléments du sang. Le second avantage est la facilité d'induire une surexpression de certaines molécules d'adhésion à la surface des lignées. Enfin ce type de lignées se multiplie très rapidement permettant de travailler à de fortes concentrations cellulaires.

La première partie de ce chapitre correspond à une publication dans la revue américaine *Transfusion*. La seconde partie propose des résultats non publiés avec au préalable des compléments d'information sur les techniques utilisées.

2 MATERIELS ET METHODES

Des éléments des techniques utilisées ont été ajoutés ou complétés par rapport à l'article afin d'apporter une meilleure compréhension à ces résultats.

2.1 Minifiltre

Le dimensionnement du volume de filtration du minifiltre type I a été calculé en effectuant un ratio entre la surface du filtre standard (3600 mm² pour 500 mL de sang à filtrer) et la surface du modèle (100 mm²), l'épaisseur restant identique.

Pour le minifiltre type II, qui a été utilisé avec la lignée cellulaire, seule la moitié supérieure des couches de fibres a été utilisée (la partie la moins dense) pour permettre d'obtenir dans le filtrat un nombre détectable de cellules. Dans ce cas, le volume de filtration a été réduit à 7 mL.

Les détails de la fabrication des modèles réduits de filtre sont données en Annexe 2.

2.2 Mesure de temps de filtration

Pour chaque essai de filtration, des mesures de temps ont été réalisées à différents instants compris entre le démarrage de la filtration, c'est-à-dire au moment où la première goutte apparaît en sortie de filtre (noté temps de mouillage) et la fin de la filtration où la totalité de la suspension a été filtrée. Pour ce faire, le réservoir de la suspension et le tube de raccord au filtre sont gradués. La prise de mesure se fait manuellement avec un chronomètre. Il en résulte des graphiques temps – volume.

2.3 Numération des cellules du filtrat

Tous les résultats de déleucocytation dans le minifiltre sont exprimés en LOG_{10} de déplétion. Ce type de notation est utilisé couramment dans le milieu transfusionnel et permet d'exprimer l'efficacité d'un filtre de façon « condensée », de façon plus parlante que des pourcentages très proches de 100%. Il est obtenu simplement en effectuant le LOG_{10} du nombre initial de leucocytes divisé par le nombre résiduel de leucocytes.

En comparaison des filtres standards de déleucocytation où la législation fixe le nombre de leucocytes résiduels inférieur à 1.10^6 pour 450 à 500 mL de sang filtré (soit environ 2 leucocytes/ μL), le minifiltre, avec une efficacité comparable, laisse passer 1000 leucocytes au total dans le filtrat. Par ailleurs, il est important de rappeler que les derniers modèles de filtres ont une efficacité plus grande pouvant aboutir à des concentrations finales variant de 0,1 à 1 leucocyte résiduel/ μL . Plusieurs méthodes de comptage existent mais les procédés automatisés prennent le pas sur le comptage microscopique avec la cellule de Nageotte. Les automates regroupent deux types de produits. Le premier est fondé sur la technique de cytométrie en flux (Vachula *et al*, 1993; Szufiad *et al*, 1997). Le second, appelé microfluorométrie, repose sur un principe de fonctionnement similaire (Dietz *et al*, 1996). L'avantage de ces automates est d'être indépendant d'un manipulateur, d'éviter les biais de sous-estimation et d'avoir une meilleure précision de comptage (Dzik *et al*, 2000). Cependant, ces techniques requièrent des appareils et des consommables coûteux. Néanmoins, compte tenu du faible volume de filtration pour le minifiltre et du taux de rétention élevé des lignées cellulaires, il est apparu indispensable de déterminer un protocole spécifique de concentration des filtrats (détaillé en Annexe 3). Après

concentration, lyse des globules rouges et marquage, ce protocole, utilisé avec un kit de numération pour cytomètre (Leucocount, Becton Dickinson, San José, Californie, USA) permet de déterminer 10 leucocytes résiduels dans le filtrat (soit 0,001 leucocyte / μ L). En dessous de ce seuil, la reproductibilité n'est pas bonne.

3. PREMIER ARTICLE

HUMAN LEUKOCYTE PROMYELOCYTIC CELL LINE (HL60) : A CONVENIENT TOOL TO STUDY MOLECULAR BASIS OF LEUKOCYTE FILTRATION ²

Laurent L. Barbe ¹, Bernadette M. Boval ¹, Marie-Paule S. Wautier ^{1,3}, Jean-Luc T.
Wautier ^{1,2}

1. Laboratoire de Biologie Vasculaire et Cellulaire. JE:1557. Université de Paris 7.
Hôpital Lariboisière, 2 rue A. Paré. 75475 Paris Cedex 10.

2. Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS). 6 rue Alexandre Cabanel.
75739 Paris Cedex 15.

3. INSERM U76. 6 rue Alexandre Cabanel. 75739 Paris Cedex 15.

3.1 Abstract

Background. Blood filtration is a technique widely used to deplete leukocytes from blood products. Several studies have been conducted to define the parameters that are involved in leukocyte reduction but the different mechanisms are not clearly delineated. In this study we have explored the role of leukocyte adhesion molecules in leukocyte reduction during filtration.

Study design and methods. We have made a minifilter that has similar properties to the standard filter (Sepacell) but which allows a smaller volume of blood to be used (15ml). Leukocyte reduction was achieved to a similar extent in the standard filter and minifilter (4.15 log₁₀ and 4.18 log₁₀ respectively). Human promyelocytic cell line

(HL60) was filtered as non-differentiated or after differentiation induced by vitamin D3 (D3-HL60). Flow cytometry was used to characterize the D3-HL60 and to count the leukocytes after filtration.

Results. HL60 were retained in the filter to the same extent as blood leukocytes. A higher level of integrin receptors (CD11b/CD18; CD11c/CD18) was expressed by D3-HL60 compared to HL60. When incubated with anti-CD11b, anti-CD11c or anti-CD18, fewer D3-HL60 cells were trapped by the filter while only anti-CD11b alter the HL60 retention in the filter.

Conclusions. The receptors CD11b/CD18, CD11c/CD18 appear to bind to the filter fibers and be one of the mechanisms responsible for leukocyte retention.

Key words

leukocyte, leukocyte reduction, HL60 cell line, integrins, CD11-CD18

² Article publié dans *Transfusion*, volume 40, p.1250-56, octobre 2000.

3.2 Introduction

The removal of white blood cells (WBC), i.e. the leukocyte reduction, from platelet and red cell concentrates is an accepted method for limiting the adverse effects of allogeneic transfusions, such as HLA alloimmunization, nonhemolytic febrile reactions, and immunosuppression. WBC are known to harbor intracellular viruses such as cytomegalovirus and bacteria such as *Yersinia* sp., and infections caused by these organisms can be prevented by the leukocyte reduction. This removal is usually done by passing the red blood cell or platelet concentrates through a filter consisting of synthetic fibers (Dzik, 1993; Bruil *et al*, 1995; Steneker *et al*, 1995; Alcorta *et al*, 1996; Ledent *et al*, 1996; Loos *et al*, 1998).

Although filtration has been used in clinical practice for the last 20 years, the mechanism of leukocyte reduction is not yet fully understood (Dzik, 1993; Bruil *et al*, 1995). Current filters can retain both aggregates and free cells on the basis of size (mechanical sieving) and biological affinity (Steneker *et al*, 1995). It has also been reported that platelets play a role in the leukocyte reduction of red blood cell (RBC) concentrates. Additionally interactions between plasma proteins that coat artificial surfaces such as the fibers of the filter may alter leukocyte retention in the filter (Bruil *et al*, 1994; Ledent *et al*, 1996). Flow conditions and temperature are important factors and we know from previous experiments that they can influence leukocyte depletion. However the mechanisms which are influenced by shear rate and temperature remain poorly understood (Dzik, 1993).

Temperature and mechanical stress influence cell adhesion molecule expression, surface distribution and cell microrheology, which may interfere with cell adhesion and cell deformation resulting in different leukocyte reduction.

To further understand the mechanism of leukocyte retention and with the final objective to improve the efficiency and the specificity of cell depletion by filtration, we have conducted a study that focused on the molecular basis of leukocyte retention in the filter.

We have designed a prototype filter that allows a limited volume of blood to be used. To circumvent the difficulty in obtaining pure leukocyte populations free of platelets, we used leukocytic cell line (HL60) which acquires some of the properties of mature leukocytes when differentiated by chemicals. With this new experimental system we found that the interaction between leukocyte adhesion molecules (integrins) and filter components play a key role in cellular retention in the filter.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Leukocyte isolation and counting

Whole blood was collected from healthy donors in a 50 ml conical polypropylene tube (Costar, Cambridge, MA) containing 5ml 0.129M sodium citrate (Becton Dickinson, San Jose, CA) and kept at room temperature (20°C) before filtration. Blood filtration was performed within 6 hours after blood collection. Alternatively whole blood was centrifuged at 120g for 15 min to obtain platelet rich plasma (PRP). After PRP isolation, the tubes were centrifuged at 3500g for 10 min and the platelet poor plasma (PPP) decanted by aspiration.

Mixed leukocytes were obtained after separation of the buffy coat or isolated by ficoll hypaque gradient (Sigma, St Louis, MO) (English *et al*, 1974). Remaining RBC were lysed with lysis solution containing 11g/L ammonium oxalate. Cells were counted

with an automated electronic cell counter (STKS, Coulter) and adjusted to 5×10^6 /ml for filtration.

3.3.2 HL60 culture and differentiation

The human promyelocytic cell line (HL60) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were cultured at 37°C with 5% CO₂, in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) containing 10% fetal calf serum (D. Dutscher, Brumath, France), 15mmol/l hepes (Life Technologies), 2.5µg/ml amphotericin (Life Technologies), 50µg/ml gentamicin (Life Technologies), 2mmol/l glutamine (Boehringer-Mannheim, GmbH, Germany). HL60 cells were maintained in exponential growth from a seeding density of 2×10^5 cells/ml to a maximum density of 1.5×10^6 . Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) (Sigma) was solubilized in ethanol to obtain a stock solution of 20µmol/l, and stored at -20°C. Cells in exponential growth were seeded at 2×10^5 cells/ml in 225 cm² culture flasks (Costar) and differentiated with 20 nmol/l vitamin D₃ 1,25(OH)₂. The final concentration of ethanol (vitamin D₃ carrier) did not exceed 0.001% vol:vol. Cells were harvested after 72 hours, washed and counted and assessed for viability by trypan blue exclusion in a Malassez hemacytometer (Polylabo, Strasbourg, France). Changes in cell volume upon differentiation were assessed by Scion image cell sizing software using digitized video-microscope images (Todd *et al*, 1981; Brackman *et al*, 1995; Brackman *et al*, 1995; Ketley *et al*, 1997).

Cell differentiation along the monocyte lineage was confirmed by: 1) microscopical observation after May Grunwald Giemsa-staining ; 2) the expression of CD11b and

CD14 measured by flow cytometry ; 3) the capacity to reduce nitroblue tetrazolium (NBT).

Prior to filtration cells were diluted in RPMI 1640 supplemented with 4% human albumin.

3.3.3 Quantification of cell membrane molecules

3.3.3.1 Monoclonal antibodies

All antibodies were mouse IgG1 when otherwise stated. Anti-CD11a, CD11b, CD11c, and CD14 (IgG2a) antibodies for cytometry analysis were purchased from Immunotech (Marseille, France). Anti-CD18 for cytometry analysis was from Becton Dickinson. Fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) goat anti-mouse IgG (FITC-GAM-G) was obtained from Nordic Immunology (Tilburg, The Netherlands). Adhesion blocking antibody directed against CD11b was OKM1 (Todd *et al*, 1981) (IgG2b mouse) (Coulter, Miami, FL) and against CD18 was 7E4 (Nortamo *et al*, 1988) (Immunotech). Control antibodies were purified mouse monoclonal antibody IgM (Immunotech) and IgG (gift from Dr Renard) (Wahyono *et al*, 1990). Saturating concentrations of OKM1 and 7E4 were determined by flow cytometry to determine optimal blocking concentrations. For adhesion blocking studies, cells were incubated for 30 min at 4°C with antibodies.

3.3.3.2 Flow cytometric studies

HL60 and D3-HL60 (both at 5×10^5 cells/ml) were labeled with monoclonal antibodies recognizing surface epitopes (35 min at 4°C). Bound antibody was labeled with a secondary FITC goat anti-mouse Ig (Fab')₂ (30 min at 4°C) (Lioté *et al*, 1996). Cells were washed in PBS and fixed in 1% formaldehyde in PBS. The percentage of

positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI) using arbitrary units of fluorescence (AUF) were measured using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

3.3.3.3 Measuring adhesion molecule density on leukocytes

Adhesion molecule density was measured using commercially available calibration beads in conjunction with antibodies with known conjugation ratios allowing us to calculate the number of sites on each cell (Quantibrite, Becton Dickinson) (Poncelet *et al*, 1996). Analysis was conducted by flow cytometry.

3.3.4 Filtration on minifilter

3.3.4.1 Blood filter scale models

A scale model of a standard leukocyte reduction blood filter, Sepacell RS2000 (Asahi Medical, Japan) was made. Our goal was to construct a filter which had the same properties as the standard filter but which used limited volumes of blood. Two different types of small filter were constructed: one with the same number of non-woven polyethylene terephthalate fiber layers (minifilter type I) and one containing half the number of fiber layers (minifilter type II) contained in the standard filter. A standard filter was opened and a cylindrical portion was cut using a cylindrical heated punch and inserted into a plastic tube (diameter 12mm) capped by a plastic piece which permit to connect the small filter to silicon tube (diameter 3mm). The ratio between the filtration volume and the filter volume and the design of fiber layers were the same in the standard and the model filter (Fig. 1).

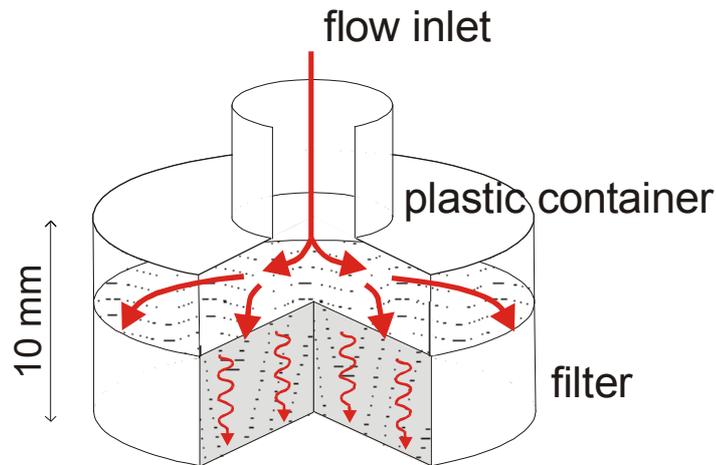


Figure 1. Schematic representation of the minifilter.

3.3.4.2 Filtration protocol

Cell suspensions were transferred to a 20 mL syringe body used as a reservoir (Terumo, Tokyo, Japan) 50 cm above the filter and connected via a 3mm diameter silicon tube (Polylabo) to the filter. The filter was subjected only to forces generated by gravity. The filtrate was collected in a conical polypropylene tube. RBC in the filtrate were counted by electronic cell counter (Coulter) while the leukocytes were stained with Leucocount reagent (Becton Dickinson) and counted by flow cytometry (Vachula *et al*, 1993).

3.3.5 Statistical Analysis

The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the parametric Dunnett's test.

3.4 Results

3.4.1 Leukocyte reduction of whole blood by minifilters

The reduction of leukocytes during whole blood filtration in the minifilter type I was similar to that obtained with a standard filtration of a blood transfusion bag ($4.15 \pm 0.26 \log_{10}$ and $4.18 \pm 0.39 \log_{10}$ respectively) (Fig. 2A).

Leukocytes isolated from whole blood were filtered in presence of PRP or PPP on minifilter type I. Under both conditions, leukocyte reduction was similar ($5.90 \pm 0.29 \log_{10}$ and $6.34 \pm 0.35 \log_{10}$ respectively) and was significantly greater than whole blood filtration ($p = 0.003$). The addition of platelets (PRP) did not alter the trapping of leukocytes in the filter. However, the initial leukocyte preparations were not free of platelets (3 to 9×10^3 platelets/ μ l) and we cannot exclude a contribution of these contaminating cells to leukocyte reduction. To further evaluate the role of platelets in leukocyte reduction we used platelet free suspensions of the promyelocytic cell line HL60 and the mixture HL60+PRP. When an identical number of cells was applied to the minifilter type I depletion was in the same range for HL60 and leukocytes ($6.30 \pm 0.06 \log_{10}$ and $6.34 \pm 0.35 \log_{10}$ respectively) (Fig. 2B).

3.4.2 Differentiation of HL60 cells

HL60 cells are a leukemic cell line which can acquire leukocyte characteristics when induced by a number of different agents (e.g. DMSO, retinoic acid and vitamin D3) (Bellón *et al*, 1994). It has been previously shown that PMA is one of the most potent HL60 differentiating agents (Pedrinaci *et al*, 1989; Rosmarin *et al*, 1989) but in our own experiments it caused cell aggregation which limited the use of these cells in the filtration system.

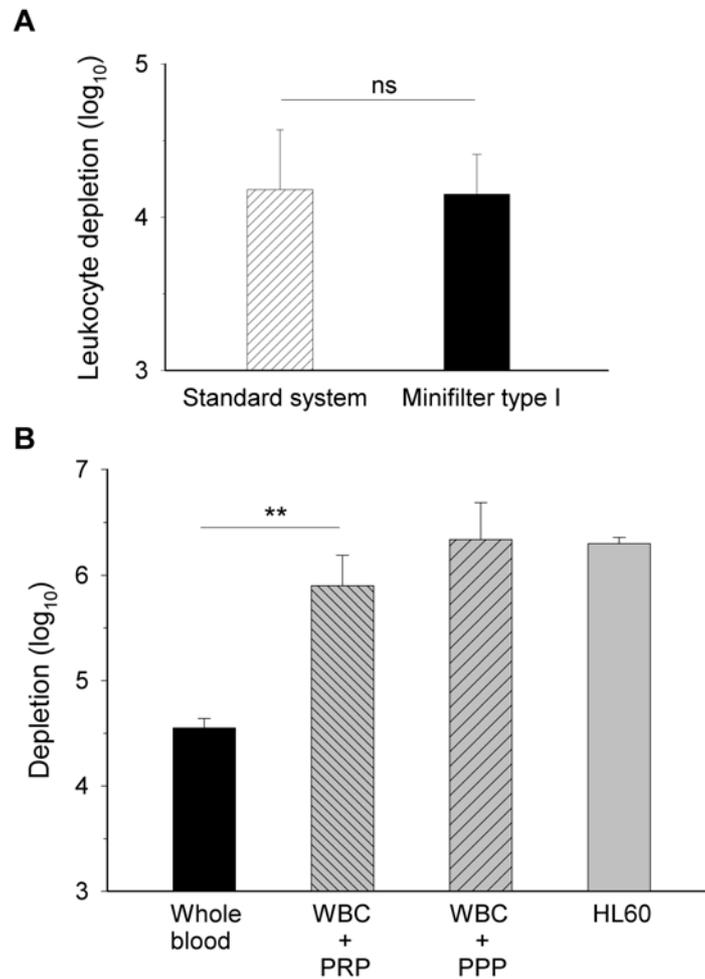


Figure 2. A) Comparison of whole blood filtration on standard filters (n=10) and scale model minifilters type I (n=5). The results are expressed in log₁₀ leukocyte depletion. ANOVA showed no significant differences in filtration efficiency between the filters. **B)** Filtration on minifilter type I of whole blood, white blood cell concentrate (WBC) (n=5) in presence of platelet rich plasma (PRP) (n=5) or platelet poor plasma (PPP) (n=5) or the human leukocyte cell line (HL60) (n=5). ANOVA and Dunnett's tests showed a significant difference between leukocyte depletion from whole blood or WBC (p<0.01) but no difference between WBC filtered in the presence of PRP or PPP or between WBC and HL60.

After culture in the presence of vitamin D3 HL60 expressed high levels of CD14, which is considered a good marker for monocytes (Fig. 3) (Ketley *et al*, 1997).

The pattern of integrin molecule expression was also altered by vitamin D3 treatment with significant increases in CD11b ($p < 0.001$), CD11c ($p = 0.01$), CD18 ($p < 0.001$).

The levels of CD11a were unaffected by differentiation ($p = 0.7$).

3.4.3 Quantification of leukocyte adhesion molecules

Since differentiated HL60 expressed higher levels of CD11b and CD11c, we quantified the number of molecules expressed using the Quantibrite system.

After vitamin D3 induced differentiation, the number of CD11b molecules per cell increased approximately six times from 5,000 to 30,000. The number of CD11c molecules per cell was increased but to a lesser extent i.e. from 1,100 to 9,000 molecules per cell. The number of CD18 molecules was higher than the sum of the number of CD11b-CD11c molecules on HL60 (17,700 versus 6,100 respectively) while it was similar on D3-HL60 (34,800 versus 39,000 respectively) (Fig. 4).

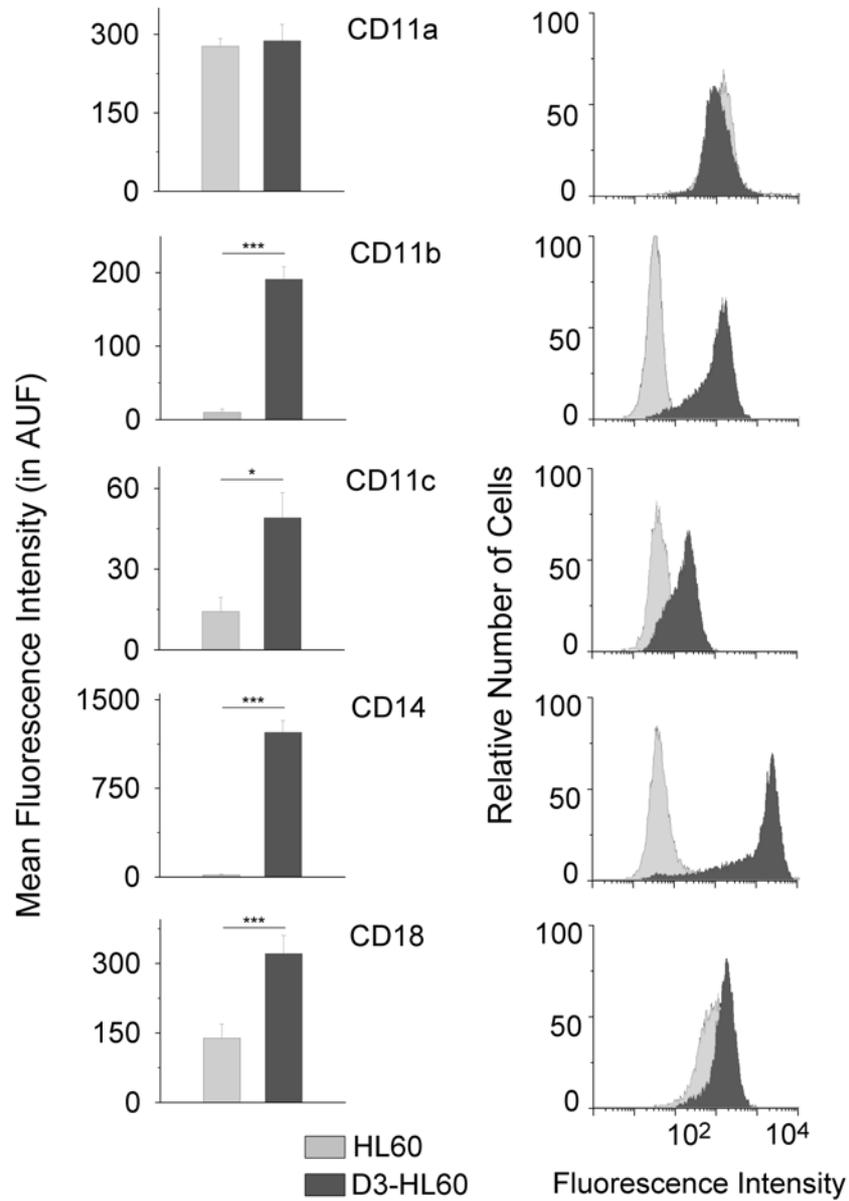


Figure 3. Flow cytometry profiles of HL60 and D3-HL60 cells after labeling with anti-integrins antibodies (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) and CD14 antibody. (Four separate sets of experiments ; 5,000 cells per counting) (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$)

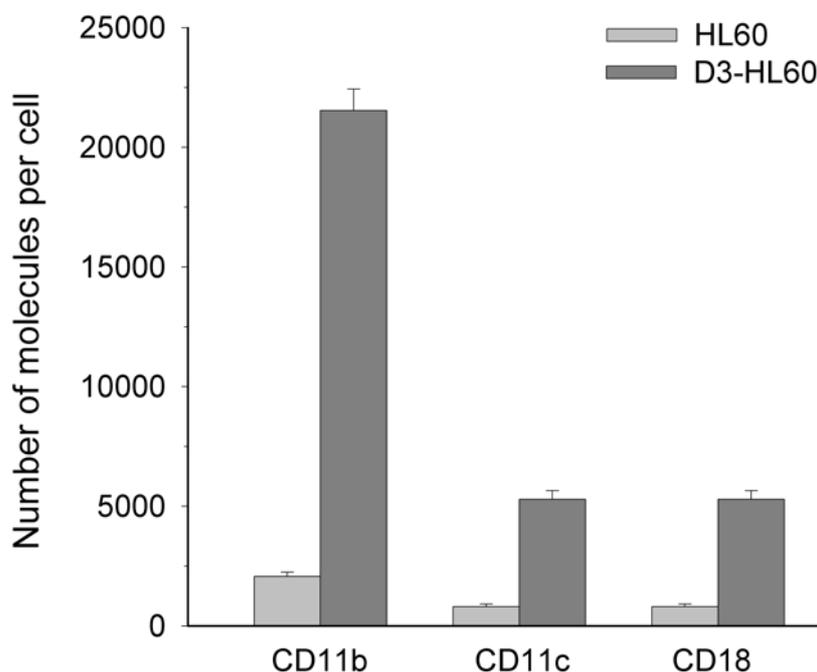


Figure 4. Number of CD11b, CD11c and CD18 molecules determined by the Quantibrite system on HL60 and HL60 differentiated by incubation with vitamin D3 (D3-HL60). (Four separate sets of experiments ; 5,000 cells per counting)

3.4.4 Quantification of cell size

Size analysis of digitized video microscope images of HL60 showed that the mean cell diameter decreased from $12.7 \pm 0.09 \mu\text{m}$ to $11.7 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ($p < 0.001$) after differentiation induced by vitamin D3.

3.4.5 HL60 filtration

In the following experiments the minifilter type II was used in order to have a higher number of cells flowing out the filter. We compared the filtration of differentiated and undifferentiated HL60. Differentiation increase HL60 retention by approximately 1 \log_{10} depletion (Fig. 5). Since differentiation also increased

expression of CD11b, CD11c and CD18, we used adhesion blocking antibodies directed against these molecules to block cell retention in the filter. Anti-CD11b reduced significantly the retention of HL60 and D3-HL60 ($p < 0.05$). HL60 filtration was slightly altered by anti-CD11c and to a higher but not statistically significant level with D3-HL60. Anti-CD18 was the most efficient antibody in inhibiting D3-HL60 reduction and had no significant effect on HL60 filtration. Monoclonal IgM and IgG antibodies non-directed against a leukocyte antigen did not modify the filtration results of HL60 and D3-HL60 (results not shown).

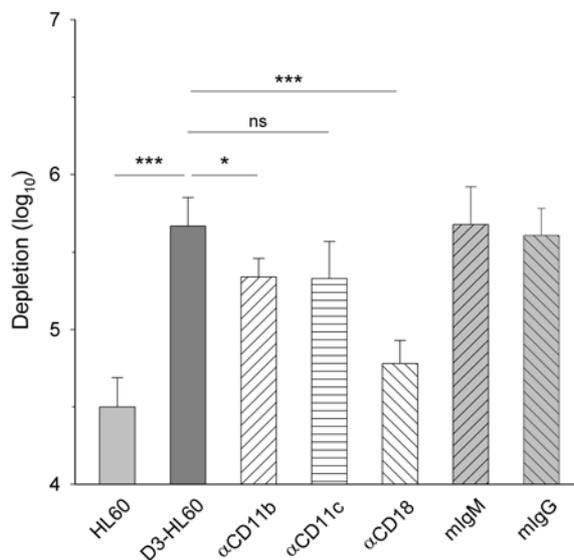


Figure 5. Cell depletion with minifilter type II of HL60 (n=10) or D3-HL60 (n=6) in medium or after addition of adhesion blocking anti-CD11b (n=3), anti-CD11c (n=3), anti-CD18 (n=3) or control (mouse IgM or mouse IgG antibodies) (n=3). Anti-CD11b significantly reduced the retention of HL60 and D3-HL60 while anti-CD18 decreased the number of trapped D3-HL60 in the filter. (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$)

3.4.6 HL60 and platelets filtration

To further investigate the possible role of platelets in leukocyte reduction we added PRP to HL60 or D3-HL60 to obtain a final concentration of $180 \pm 10 \times 10^3$ platelets per μl . The presence of platelets did not significantly modify the retention of HL60 (Fig.6). Interestingly D3-HL60 depletion was significantly inhibited in the presence of platelets (5.67 and 4.60 \log_{10} , respectively; $p = 0.03$).

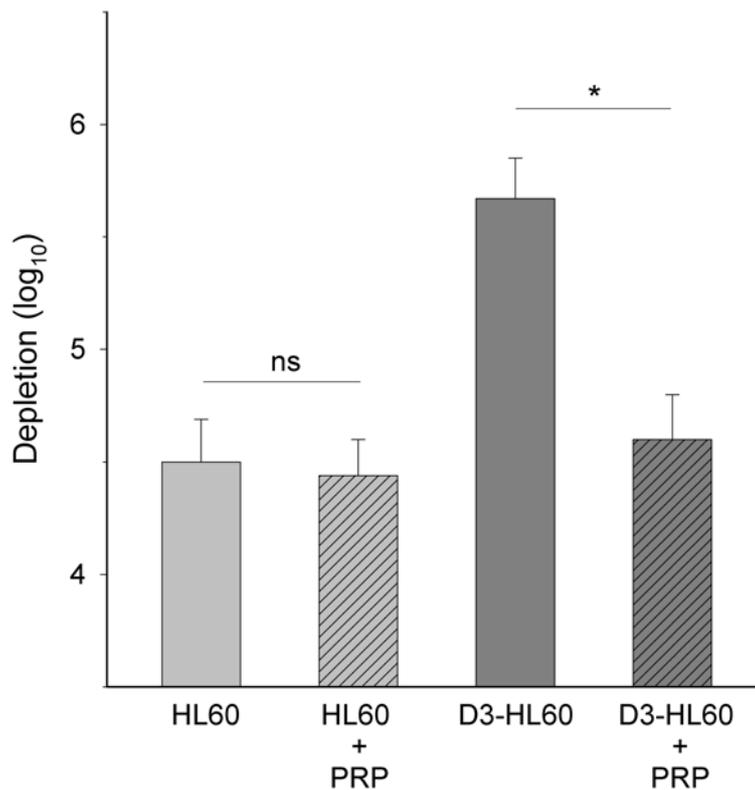


Figure 6. Filtration of HL60 (n=10) and D3-HL60 (n=6), using the minifilter type II, in presence or absence of platelet rich plasma (PRP) (n=3). PRP significantly reduced the retention of D3-HL60 (* $p < 0.05$) but did not affect HL60 depletion.

3.5 Discussion

Leukocyte reduction was achieved to a similar extent when using the standard filter (Sepacell) or minifilters when proportional volumes of blood were applied to these systems. The minifilter was very convenient since it allowed repeat experiments with smaller volumes of blood or cultured cells and also allowed the effects of antibodies directed against adhesion molecules to be tested. The respective role of RBCs and platelets in the trapping of leukocytes was difficult to evaluate since it was not possible to isolate leukocytes from blood without contaminating platelets. Thus we used the HL60 cell line which after induction shares a great number of the properties of mature leukocytes (Hickstein *et al*, 1987; Brackman *et al*, 1995; Brackman *et al*, 1995) and has the advantage of being a platelet free preparation. Several inducers of HL60 differentiation have been tested in this study and they potentiated leukocyte markers such as CD14 and leukocyte specific adhesion molecules. In our experiments after incubation with vitamin D3 HL60 cells were retained to a greater degree in the filter, indicating that the modification induced by vitamin D3 was responsible for this phenomenon.

Several factors might affect the trapping of leukocyte in the filter. Adhesion molecules such as selectins and integrins are known to participate in rolling and steady state adhesion (Carlos *et al*, 1994; Springer, 1995). In our system, it is unlikely that selectins play a major role since they or their ligands are not present on the filter or on HL60. The $\beta 2$ integrin (CD18) is present on HL60 but at least in a large proportion not associated to the subunit CD11b or CD11c until after vitamin D3 treatment when both CD11b/CD18 and CD11c/CD18 are present on the cells. The

expression of these integrins and the fact that anti-CD11b, anti-CD11c and anti-CD18 antibodies could inhibit the retention of D3-HL60 in the filter was consistent with a role for integrin mediated trapping of leukocytes in the filter. Importantly therefore, the active adhesion process appears to be more important than the size sieving since differentiated HL60 are smaller than the native HL60 and they are more deformable and would thus be assumed to pass more readily through the filter if size alone was the sole factor determining retention (Erzurum *et al*, 1991).

The possible mediation of leukocyte retention to the filter via adherent platelets is controversial. Platelet-HL60 interactions have been studied in a flow based adhesion assay (Stone *et al*, 1999). In this system, immobilized activated platelets could capture granulocytes but adhesive interactions depended critically on the degree of the stimulation of the platelets. Thus when platelets were inactivated, they bound very few leukocytes but when activated by thrombin they efficiently captured the cells from flow using P-selectin and could induce a substantial proportion of captured cells to undertake integrin (CD11b/CD18) mediated adhesion. This dependency upon platelet activation may account for the discrepancy about the role of platelets in leukocyte depletion on the filters as it is not clear if platelets become activated upon contact with fibers (Stone *et al*, 1999). The role of platelets in reduced D3-HL60 retention can be explained either by a competition between platelets and leukocytes for the same region of the filter, or by adhesion of platelet to D3-HL60 which reduced the adhesion of D3-HL60 to the filter by masking leukocyte integrins. Furthermore activation of platelets could be different according to the technique of

blood collection, handling of blood samples, and conditions of filtration (flow rate, nature of the fibers).

The fact that leukocyte adhesion is one of the mechanisms responsible for leukocyte retention reinforces the already recognized importance of temperature and flow conditions on filtration as both of these parameters have been shown to affect the function of integrin molecules (Ledent *et al*, 1996; Stone *et al*, 1999).

The plasma concentration level required to achieve optimal protein adsorption for leukocyte adhesion to filters is not known. The results of experiments with leukocytes reported by Bruil *et al* favor the use of filtration conditions in which the concentration of plasma is reduced (Bruil *et al*, 1994). However, Shimizu *et al* found that the leukocyte depletion efficiency of polyester fiber filters did not alter when the cells were stored in a plasma-poor medium (Shimizu *et al*, 1993). In our own experiments with WBC and PPP the depletion was similar to that of HL60 in culture medium containing human serum albumin (4%). Thus all of these preparations contained albumin which is a sufficient ligand for the support of leukocyte immobilization and migration via CD11b/CD18 in a flow based adhesion assay and might function as a ligand for leukocyte retention in filters (Rainger *et al*, 1997).

The HL60 cell is a leukemic cell that is less trapped than the corresponding differentiated cells which could indicate that some tumor cells not expressing adhesion molecules are less adhesive to the fibers. The limited retention of tumor cells by filters restrained the possible collection of blood during surgical operations for cancer to avoid cell dissemination (Kwekkeboom *et al*, 1998). A better knowledge

of the cell retention mechanism in the filter may facilitate the development of new filters which can retain tumor cells.

The identification of the mechanisms responsible for leukocyte reduction could be beneficial in the design of new filters for leukofiltration. By identifying ligands for leukocyte cell adhesion molecules new fibers containing counter-receptors for adhesion molecules could be manufactured (Kwekkeboom *et al*, 1998; Franklin *et al*, 1999).

The use of cell lines is convenient and can be considered as an analytical tool but they are not normal cells and the conclusion that can be drawn from the experiments has to be validated with normal leukocytes. However it will be difficult to have leukocyte of the same degree of homogeneity which are not modified by anticoagulation or centrifugations. With regards to the study of adhesion process, the HL60 were widely used and were found to give results which can be compared to leukocyte adhesion processes on a molecular basis (Lalor *et al*, 1995; Stone *et al*, 1999).

Acknowledgments

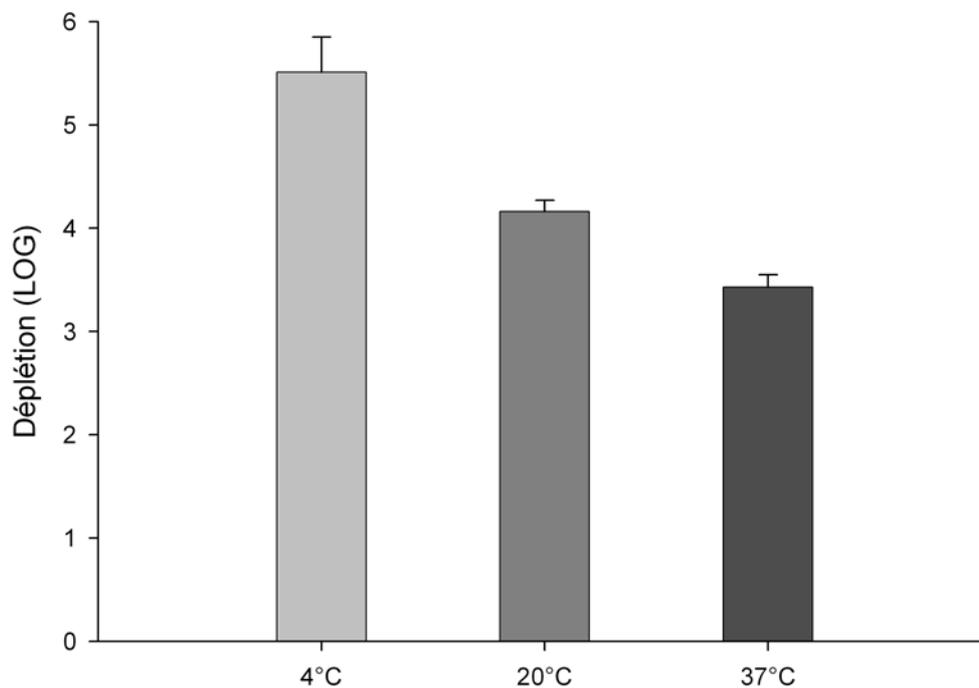
We are very grateful to E. Rainger Ph.D. (Department of Physiology. University of Birmingham, UK) for his scientific advice and help in the preparation of the manuscript.

We acknowledge Hemotech (France) for providing filters and Becton Dickinson (France) for providing antibodies.

4. AUTRES RESULTATS DU MINIFILTRE

Les résultats détaillés ci-après concernent l'effet de la température sur l'efficacité de la déleucocytation et la mesure du temps de filtration.

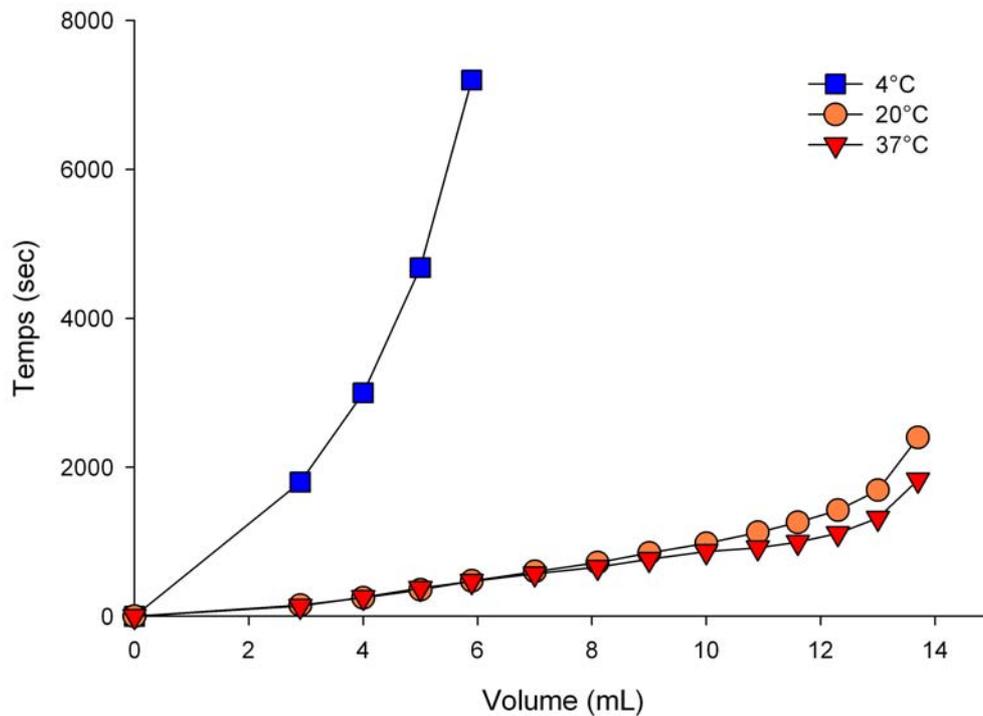
4.1 Effet de la température sur la déleucocytation



L'influence de la température a été testée sur les performances de déleucocytation, en utilisant le modèle du minifiltre. Les filtrations de sang total ont été réalisées à trois températures : 4°C (en chambre froide), à la température ambiante soit environ 20°C et 37°C (en étuve sèche). On observe autour de la valeur de déleucocytation standard à 20°C deux extrêmes séparés d'environ 2 LOG₁₀. Néanmoins, comme cela est montré sur la figure suivante, il faut souligner le fait que la filtration à 4°C est

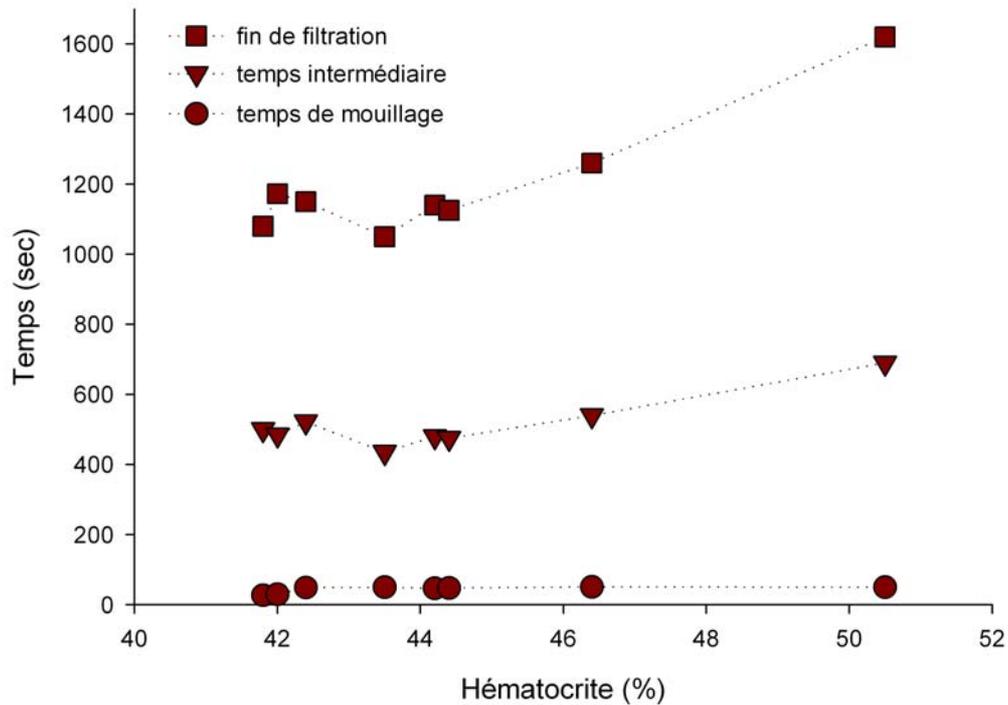
incomplète avec un volume de filtrat d'environ 6 mL à comparer à 14 mL dans les autres situations.

4.2 Effet de la température sur l'écoulement



Pour les trois températures, des mesures de temps ont été prises à différents moments de la filtration. La filtration du sang à 4°C est beaucoup plus lente que pour celles réalisées à 20°C et 37°C et ce, dès le début de la filtration. En outre, le volume total de 15 mL n'est pas filtré car le minifiltre semble bouché à partir de 5-6 mL. Les courbes à 20°C et 37°C sont similaires jusqu'à 8 mL puis on observe un écoulement plus rapide en fin de filtration à 37°C.

4.3 Influence de l'hématocrite



Compte tenu que pour une numération sanguine normale, on peut considérer qu'il n'y a qu'un seul globule blanc pour 30 plaquettes et 600 globules rouges, il n'est pas étonnant que le comportement rhéologique du sang soit étroitement lié à celui des globules rouges. C'est pourquoi nous avons mesuré le temps au démarrage de la filtration (temps de mouillage), à 5 mL (temps intermédiaire) et à la fin de la filtration pour des différentes valeurs d'hématocrite. Il faut noter que ces expériences ont été réalisées sur des échantillons sanguins provenant de différents donneurs choisis pour avoir des concentrations en plaquettes et globules rouges relativement proches.

On observe une élévation du temps de filtration en fonction de l'hématocrite, quel que soit l'instant de la mesure, même si la différence n'est pas significative pour le temps de mouillage.

4.4 Dynamique de filtration de différentes suspensions

4.4.1 Sang ou dérivés

Par la suite, nous avons mesuré une « dynamique de filtration » (courbe temps – volume) pour différentes suspensions cellulaires :

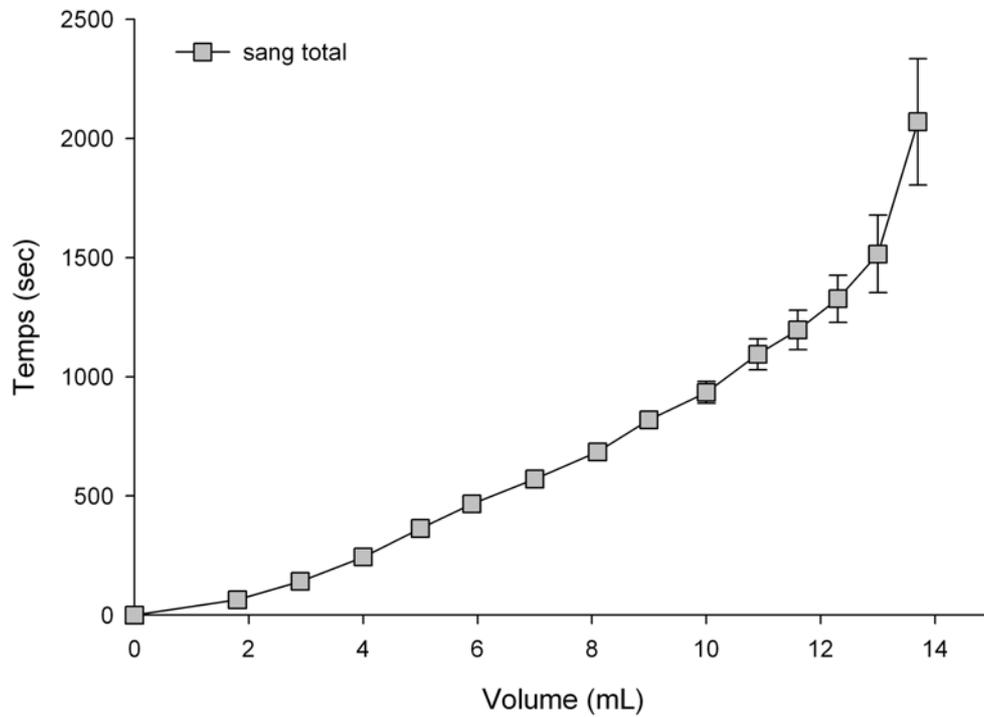


Figure 1A. Filtration de sang total sur minifiltre type I (c'est-à-dire avec la totalité des couches de fibres) (n=5 pour les deux conditions).

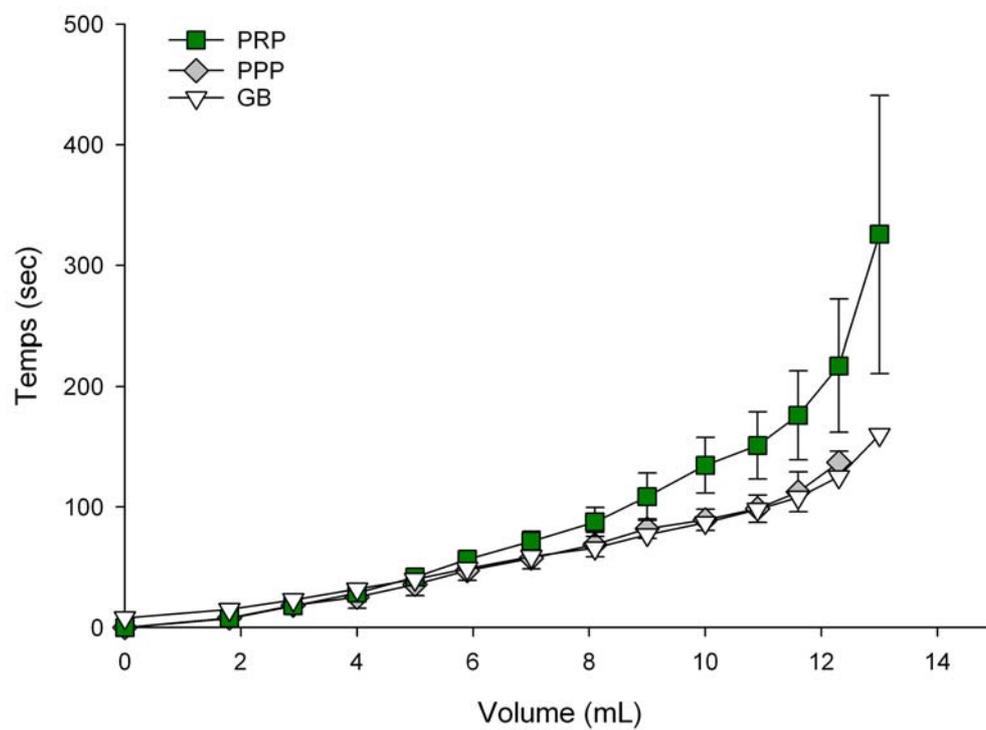


Figure 1B. Filtration de PRP (leucocytes + plaquettes en suspension dans le plasma), PPP (leucocytes dans le plasma) et GB (leucocytes seuls dans un tampon) avec le minifiltre type I (n=5).

4.4.2 Lignée cellulaire

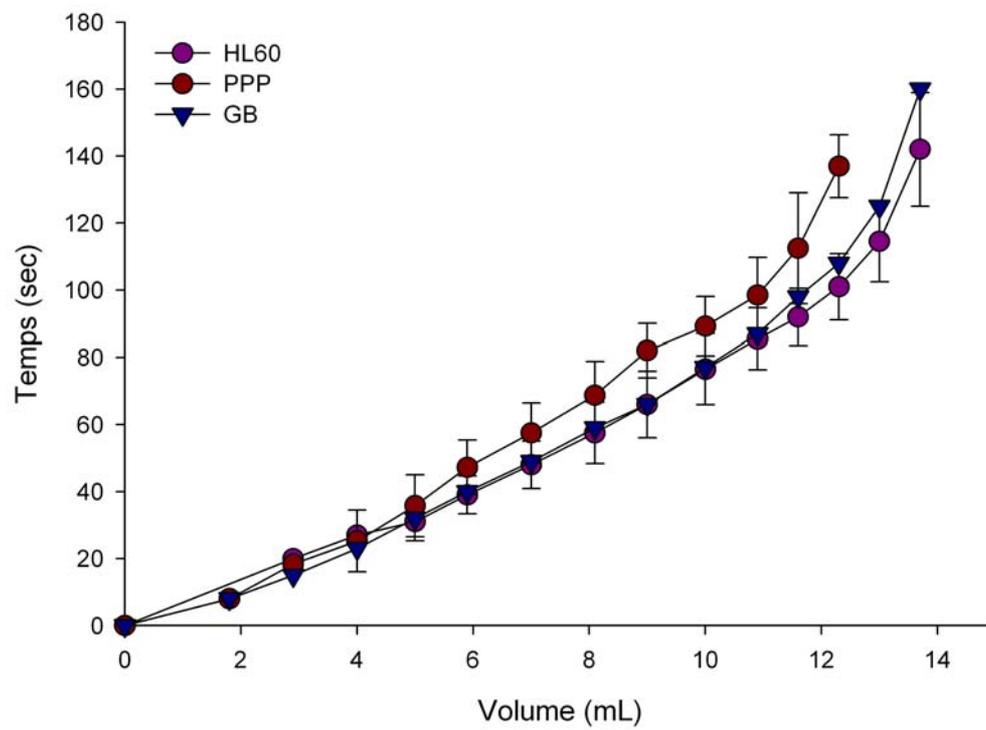


Figure 2A. Comparaison des filtrations de PPP et GB avec une suspension de cellules HL60 avec le minifiltre type I (n=5).

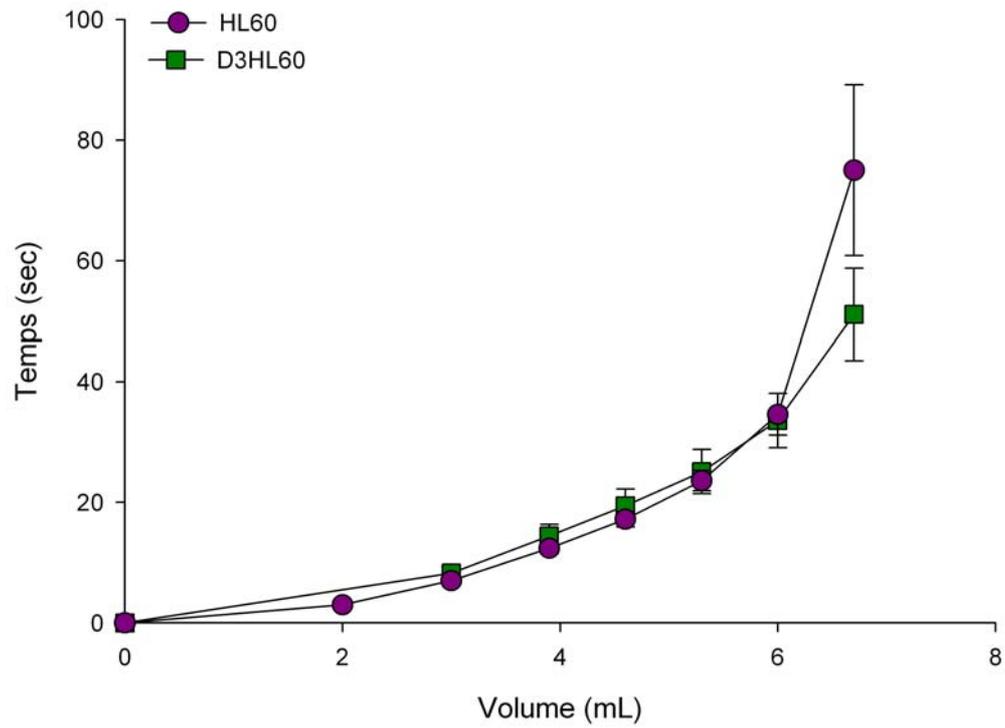
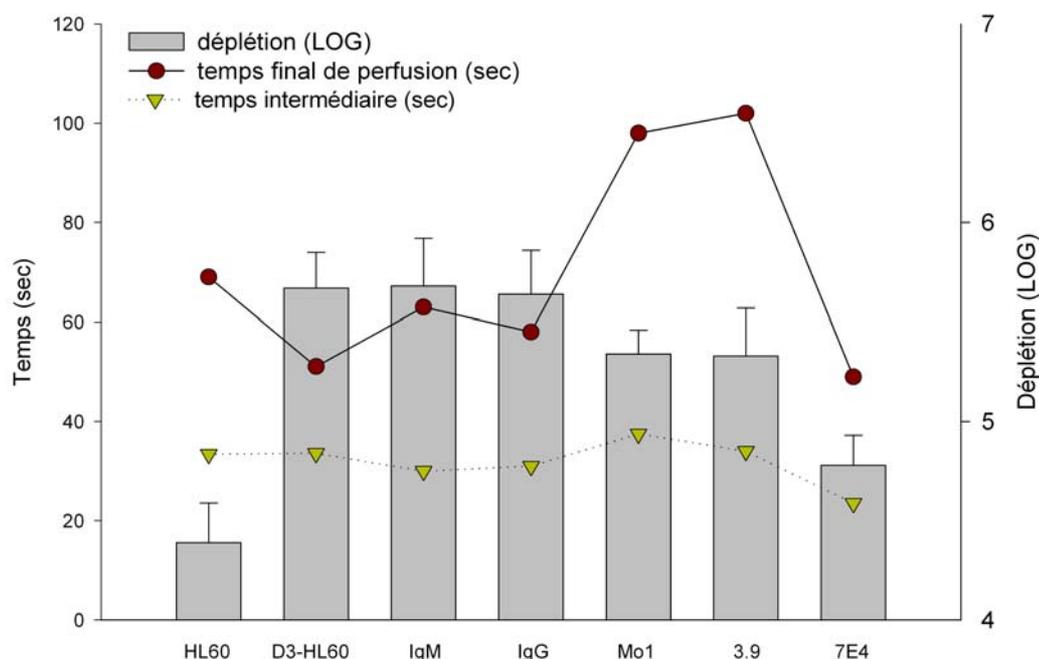


Figure 2B. Comparaison des filtrations de cellules HL60 natives et différenciées avec la vitamine D3 avec le minifiltre type II (50% de couches de fibres en moins) (n=5).

Nous pouvons observer des valeurs de temps de filtration très différentes entre le sang total (Figure 1A) et les solutions cellulaires sans globules rouges (Figure 1B). Pour la figure suivante, nous observons un comportement très similaire entre la suspension de leucocytes avec (PPP) et sans plasma (GB) en comparaison de la suspension comportant des plaquettes et du plasma (PRP) qui a un écoulement plus lent. Nous avons ensuite comparé l'écoulement dans le minifiltre type I entre les suspensions de PPP et GB avec la lignée cellulaire HL60, modèle de leucocytes (Figure 2A). Nous observons en effet une similitude entre l'écoulement des leucocytes seuls (GB) et celui des HL60. Sur ce graphique où l'échelle des temps est dilatée par rapport à la figure 1B, nous pouvons remarquer une différence entre les leucocytes en solution ou non dans le plasma, avec un temps de filtration plus long en présence du plasma. Enfin, la figure 2B représente l'écoulement de suspensions de HL60 non induites et de HL60 différenciées par la vitamine D3. Les valeurs de temps sur ce graphique sont plus faibles que pour le précédent étant donné qu'on utilise le modèle de minifiltre comportant moitié moins de couches de fibres. Nous pouvons noter des valeurs sensiblement plus faibles pour les cellules différenciées en fin de filtration.

4.4. Temps de filtration et déleucocytation



Ce dernier graphique compile les données temporelles de l'écoulement (représentation graphique en lignes) avec les valeurs de déleucocytation (représentation en histogramme) pour différents cas (D3HL60 : cellules différenciées ; MO1, 3.9 et 7E4 : cellules différenciées incubées avec des anticorps bloquants respectivement les intégrines CD11b, CD11c et CD18 ; IgM et IgG : cellules différenciées incubées avec des protéines témoins, servant de contrôle négatif pour les expériences avec les anticorps). D'une part, nous observons une déleucocytation plus grande pour les cellules différenciées (D3HL60) et pour les HL60 servant de contrôle négatif (IgM et IgG). L'incubation des cellules D3HL60 avec des anticorps bloquants certaines molécules d'adhésion réduit sensiblement la

déplétion cellulaire (MO1 et 3.9) et de façon plus marquée avec l'anticorps 7E4. D'autre part, l'écoulement est proche entre les cellules différenciées dont les molécules d'adhésion ne sont pas bloquées (D3HL60, IgM et IgG). Pour les cellules D3HL60 incubées avec des anticorps bloquants, nous observons deux valeurs extrêmes de temps de filtration. Pour MO1 et 3.9, la filtration est très lente alors que pour 7E4, la filtration est la plus rapide.

A l'issue de ce premier article, le minifiltre et le modèle de lignée cellulaire ont permis de définir des molécules d'adhésion impliquées dans le processus de filtration (essentiellement les intégrines CD11/CD18). Ces résultats nouveaux font apparaître que le phénomène d'adhésion est un mécanisme très actif dans la déleucocytation du sang. Les résultats de ce chapitre seront détaillés davantage dans le chapitre 4 et comparés avec les données du chapitre suivant.

Chapitre 3

LE MODELE DE
CHAMBRE
D'ÉCOULEMENT

1. INTRODUCTION AU SECOND ARTICLE

A l'issue du premier article, nous nous sommes rendus compte des avantages et des inconvénients du modèle du minifiltre. D'un côté, sa constitution reste fidèle à celle d'un filtre standard de déleucocytation et il permet d'utiliser de très faibles volumes de sang ou de suspensions cellulaires tout en conservant des capacités de déleucocytation similaires. Cependant, il apparaît comme une « boîte noire » pour laquelle nous connaissons les conditions d'entrée et de sortie de filtre (essentiellement concentrations cellulaires) sans savoir exactement ce qui se passe à l'intérieur. Pour pallier cette lacune, nous avons conçu un système de chambre d'écoulement permettant de tester l'efficacité de différents types de fibres. Une observation microscopique couplée à une chaîne d'acquisition et de traitement d'images permet de quantifier l'adhésion cellulaire aux fibres. Ce système offre en outre la possibilité de faire varier la densité de fibres, le débit de la suspension cellulaire, etc.

Par rapport au premier article, une des hypothèses de travail est de s'affranchir du paramètre « mécanique » (tamisage) de la capture des leucocytes. Cette première étape permet de nous concentrer sur les interactions de nature biologique et physico-chimique. Avec ce modèle de chambre d'écoulement, nous avons travaillé dans des conditions de faible densité de fibres, correspondant à la densité des toutes premières couches des filtres à déleucocyter.

Peu d'études concernent la nature « biologique » des interactions cellules-fibres ou plus généralement cellules-biomatériaux dans des conditions dynamiques. Dans le domaine de la filtration sanguine, l'aspect tamisage a longtemps été mis en avant comme phénomène prépondérant de la rétention des leucocytes. Quelques auteurs ont émis des hypothèses sur des interactions cellules-cellules et sur l'intervention des molécules d'adhésion des leucocytes et des plaquettes dans le processus de déleucocytation (Dzik, 1993; Bruil *et al*, 1995; Steneker *et al*, 1995). Ce chapitre va se concentrer sur cet aspect et plus particulièrement sur les leucocytes et leurs molécules d'adhésion.

Outre le modèle de chambre d'écoulement, des lignées cellulaires ont été utilisées pour modéliser les leucocytes humains de la même façon que dans le premier article. Pour ce nouveau travail, nous avons utilisé la lignée HL60, native ou induite par un inducteur, mais aussi les lignées THP-1 (lignée monocyttaire humaine) et Molt-4 (lignée lymphocytaire humaine), qui expriment différemment des molécules d'adhésion à l'état non différencié.

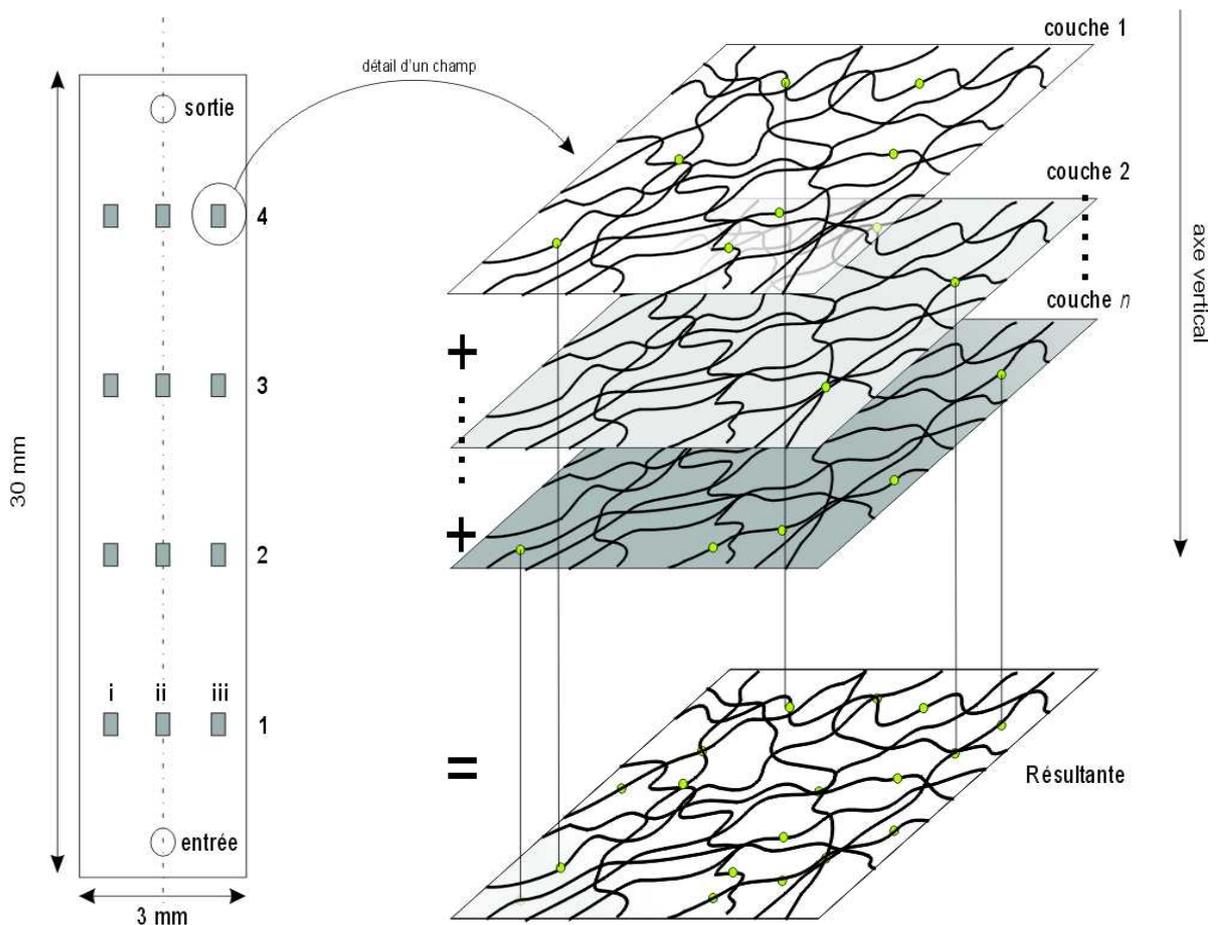
2. MATERIELS ET METHODES

Afin de compléter la description du matériels et méthodes de l'article, nous avons détaillé la procédure du calcul de la densité.

Pour le modèle de la chambre d'écoulement, il s'est avéré indispensable d'automatiser la phase de comptage des cellules adhérentes au sein du réseau de fibres. Outre le gain de temps appréciable, cette automatisation permet le comptage d'un plus grand nombre de champs microscopiques, permettant ainsi d'obtenir un calcul plus fiable.

Compte tenu de l'aspect tri-dimensionnel de la chambre et du caractère hétérogène du réseau fibreux, le volume de la chambre a été découpé en plusieurs plans selon l'axe vertical. La faible densité de fibres déposées dans le canal de la chambre permet l'utilisation d'un microscope classique à fluorescence car le réseau fibreux reste relativement transparent à l'éclairage pour atteindre les couches les plus « profondes », tout en laissant filtrer la lumière émise par les cellules fluorescentes, adhérentes ou en mouvement. Différentes coordonnées ont été choisies selon l'axe longitudinal (notées de 1 à 4 sur le schéma ci-dessous) et l'axe transversal (notées i, ii, iii) de la chambre. Le déplacement entre ces différents points est effectué avec les vis micrométriques de la platine du microscope. Pour chacun des champs, l'analyse microscopique est réalisée par une chaîne d'acquisition de l'image. Après positionnement, une caméra CCD enregistre chaque plan (noté couche 1 à n sur le schéma). Le déplacement vertical de la platine est réalisé à l'aide d'une vis micrométrique. Selon la densité de fibres dans la chambre, 20 à 30 images ont été enregistrées sur le disque dur d'un ordinateur. Après capture de tous les champs, le logiciel de traitement d'images analyse et traite les piles d'images. Pour chaque

champ, un programme, développé spécifiquement pour cette tâche, effectue un seuillage pour extraire les points fluorescents puis additionne les 20 à 30 images. Il en résulte une image unique (notée résultante sur la figure) à partir de laquelle le logiciel compte les cellules. Un calcul global de la densité de cellules adhérentes (en $\text{mm}^2/10^6$ cellules perfusées) peut alors être effectué.



Comme nous l'avons décrit dans le second article, plusieurs modèles de lignées cellulaires ont été utilisés comme modèle de leucocytes humains. L'analyse par cytométrie en flux a permis de quantifier l'expression de certaines molécules d'adhésion à la surface des cellules, à l'état natif ou différencié par certains agents inducteurs. Nous avons regroupé dans l'annexe 4 l'ensemble des tests cytométriques sur les lignées utilisées, en ne conservant qu'un profil représentatif pour une molécule d'adhésion.

3. SECOND ARTICLE

AN IN VITRO SYSTEM FOR TESTING LEUKOCYTE AND LEUKAEMIC CELL LINE ADHESION TO SYNTHETIC FIBRES ³

Laurent L. Barbe ¹, Bernadette M. Boval ¹, Marie-Paule S. Wautier ^{1,2}, Jean-Luc T. Wautier ^{1,2}

1. Laboratoire de Biologie Vasculaire et Cellulaire. JE:1557. Université de Paris 7.. 6 rue Alexandre Cabanel. 75739 Paris Cedex 15.

2. Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS) and Institut National de la Recherche Médicale (INSERM) U76, 6 rue Alexandre Cabanel 75739 Paris Cedex 15.

3.1 Abstract

Leukocyte adhesion is an important phenomenon in antimicrobial defence, inflammation and immunological mechanisms and has been shown to be dependent upon specialized adhesion molecules. To prevent side effects related to blood transfusion (e.g. anti-HLA immunization and transmission of infectious agents) leukocyte reduction of blood products is now systematically performed in various countries. The most common system used for leukoreduction is blood filtration. For further understanding of the mechanisms responsible for the interaction between leukocytes and the fibres present in filters we used a flow chamber to study the adhesion of leukocytes and leukaemic cell lines to different

³ Article accepté pour publication dans la revue *British Journal of Haematology*, vol 115, 2001.

types of fibre. Adhesion was quantified using video-microscopy and computer image analysis. Our results demonstrate that adhesion to filter fibres was dependent on the expression of β 2-integrins CD11-CD18 and was inhibited by anti-CD18. The amount of fibres present, their spatial arrangement and the physicochemical characteristics of the fibres were important factors in leukocyte adhesion. Leukocyte adhesion was the highest to Polyethylene Terephthalate (PET) and Polyimide fibres. Lymphocytes or lymphocytic cell lines were poorly adherent to PET fibres. The retaining capacity of leukocyte filters can be improved by taking into account the different parameters for the design of new filters.

Key words

blood filtration, flow chamber, leukocytes, leukaemic cells, synthetic fibres.

3.2 Introduction

After the recognition of the relation between leukocyte antibodies (Brittinger *et al*, 1957), leukocyte contaminated blood components and non-haemolytic transfusion reactions, attempts have been made to reduce the number of leukocytes in blood cell preparations (Dausset *et al*, 1957). Leukocytes can adhere to numerous different surfaces including other cells, immobilized proteins and artificial substrates such as glass (Bessis, 1972). The adherence of leukocytes to glass fibres has been used to remove leukocytes from blood. Several investigations have been conducted to identify natural or synthetic fibres to which leukocytes bind (Rasp *et al*, 1981; Lang *et al*, 1988; Bruil *et al*, 1992; Bruil *et al*, 1993). Several materials have been selected for their biocompatibility or capacity to react with leukocytes. They have been used in filters to deplete blood products in leukocytes. Leukocyte reduction in blood products is used to improve blood safety by limiting anti-HLA antibody formation, to decrease the possibility of transmission of leukocyte borne viruses and bacteria (Loos *et al*, 1998; Williamson, 2000). Successively inverted spin method, velocity sedimentation after agglomeration of red blood cells and nylon wool filtration were explored to reduce the number of leukocytes in the blood cell preparation. Cellulose fibre filtration was then developed since the filter could be steam sterilized and aseptically connected to a blood container. The principles of leukocyte trapping mechanisms by filtration are still quite unknown and efforts have been made to improve the efficacy of leukocyte reduction and to optimise the recovery of functional and viable platelets.

The nature of the fibres present in the filter and the molecular basis of the interactions remained critical parameters. We previously showed that adhesion

molecules expressed on leukocytes were involved in the trapping of leukocytes in filters used for blood product's leukodepletion. A leukaemic cell line (HL60) adhered more efficiently when it expressed a higher number of integrin adhesion molecules on the cell surface and retention was inhibited by anti-integrin antibodies (Barbe *et al*, 2000). The flow chamber has been extensively used to explore mechanisms of leukocyte adhesion to endothelial cells (Lawrence *et al*, 1987; Cooke *et al*, 1993) or synthetic substrates (Yung *et al*, 1996; Thompson *et al*, 1997). In our current work we have designed an experimental flow based model chamber to explore the interactions between several types of fibre and different leukaemic cell lines. We investigated the respective role of the characteristics, the quantity and the arrangement of the fibres in the chamber. We also explored the role of the adhesion molecules expressed differently on leukocytes or leukocyte cell lines and found that distribution of the fibres and adhesion molecule expression by leukaemic cells affected interactions between cells and the filter material.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Blood cells and cell lines

Whole blood was collected from healthy donors in 10 mL conical polypropylene tubes (Costar, Cambridge, MA) containing 1mL 0.129M sodium citrate (Sigma, St Louis, MO). Whole blood was diluted in HBSS without Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ at a final concentration of 1x10⁶ leukocytes per millilitre.

HL60, a human promyelocytic cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). HL60 cells were cultured at 37°C with 5% CO₂, in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) containing 10% fetal

calf serum (D. Dutscher, Brumath, France), 15mmol/L hepes (Life Technologies), 2.5µg/mL amphotericin (Life Technologies), 50µg/mL gentamicin (Life Technologies), 2mmol/L glutamine (Life Technologies). HL60 cells were maintained in exponential growth from a seeding density of 2×10^5 cells/mL to a maximum density of 1.5×10^6 /mL. Vitamin D3 (1,25(OH)₂D₃) (Sigma) was solubilised in ethanol to obtain a stock solution of 20µmol/L, and stored at -20°C. Cells in exponential growth were seeded at 2×10^5 cells/mL in 225 cm² culture flasks (Costar) and differentiated with 20nmol/L vitamin D3 1,25(OH)₂. The final concentration of ethanol (vitamin D3 carrier) did not exceed 0.001% vol:vol. Cells were harvested after 72 hours, washed, counted and assessed for viability by trypan blue exclusion in a Malassez haemocytometer. Cell differentiation along the monocyte lineage was confirmed by: 1) microscopic observation after May Grunwald Giemsa-staining ; 2) the expression of CD11b and CD14 measured by flow cytometry ; 3) the capacity to reduce nitroblue tetrazolium (NBT).

THP-1, a human acute monocytic leukaemia-derived cell line and the human T cell line Molt-4 were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). THP-1 and Molt-4 cells were cultured under the same conditions as HL60 cells.

Cell diameters were measured by microscopic image analysis using Optimas 6.52 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

3.3.2 Quantification of cell membrane molecules

The adhesion molecules were quantified using monoclonal antibodies and flow cytometry. Anti-CD11a antibody (IgG1) (Immunotech - Marseille, France) and

fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) goat anti-mouse IgG (FITC-GAM-G) (Nordic Immunology - Tilburg, The Netherlands) were used for CD11a measurement.

Antibodies (CD11b, CD11c, CD18, CD62L) were phycoerythrin (PE) -conjugated from Becton Dickinson (San Jose, CA) and used for site quantification.

Adhesion blocking antibody directed against CD18 was 7E4 (Immunotech) (Nortamo *et al*, 1988). Control antibodies were purified IgG (gift from Dr Renard) (Wahyono *et al*, 1990). Saturating concentrations of 7E4 were determined by flow cytometry to determine optimal blocking concentrations.

Blood cells and leukaemic cells (5×10^5 cells/mL) were labelled with adhesion receptor specific monoclonal antibodies at saturating conditions for 35 minutes at 4°C. Having been washed, the cells were incubated for 30 minutes at 4°C with FITC-GAM-G at a dilution giving a negative signal in the absence of a primary antibody (Lioté *et al*, 1996). Cells were washed in PBS and fixed in 1% formaldehyde in PBS. Immunofluorescence was quantified by FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). For each sample, 5,000 events were recorded. Results were expressed as mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units of fluorescence (AUF).

Adhesion molecule density was measured using commercially available calibration beads in conjunction with antibodies with known conjugation ratios (Quantibrite, Becton Dickinson) (Poncelet *et al*, 1996). Analysis was conducted by flow cytometry.

3.3.3 Measurement of cell adhesion to fibres

Cell adhesion was measured using a system which consists of a flow chamber mounted on the stage of a fluorescent microscope (Laborlux, Leitz, Wetzlar,

Germany) (Fig 1A). The flow chamber (Fig 1B) based upon the model developed by Forrester (Forrester *et al*, 1984), was built in order to observe and quantitate cell adhesion to fibres immobilized in the chamber. The flow chamber was constructed with two microscope slides separated by a 300 μm thick silicon gasket that had two rectangular channels (length 35 mm, width 3 mm) cut into it. This permitted two

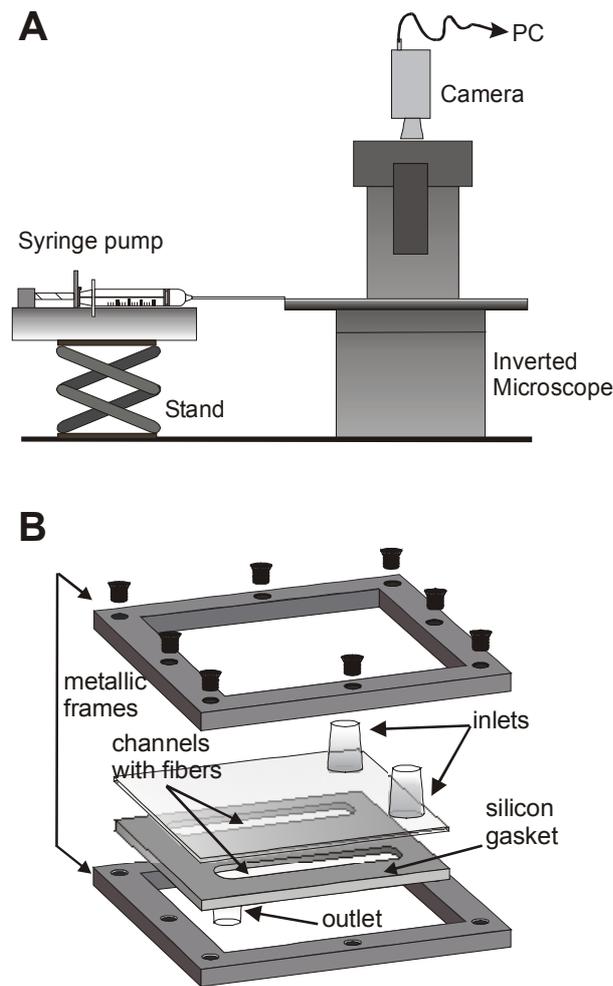


Figure 1. Schematic representation of the flow based assay system (A) and the flow chamber (B).

simultaneous and independent experiments to be conducted. Inlet and outlet ports were drilled in the upper and lower slide respectively, to allow perfusion of cells via a

syringe pump (PHD2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA). The chamber was securely clamped together using a screwed together metallic frame.

Observations were made using a video camera (Protec 2040, Jai, Copenhagen, Denmark) connected to a computer (AMD K7-500, Eagle Computer, Paris, France).

The chambers were connected to a reservoir containing the cell suspension in RPMI by a three-way stopcock. Chamber outlets were linked to a syringe pump which pulled cell suspensions or washing buffer through the chamber when in refill mode.

All experiments were conducted at room temperature (20°C).

Prior to cell perfusion, fibres were wetted in RPMI medium. Cells were incubated for 10 minutes with acridine orange (Sigma) (final concentration 100 µg/mL), washed and suspended at a final concentration of 1×10^6 /mL in RPMI containing 1% bovine serum albumin or 10% autologous plasma for white blood cell perfusions. The cells were perfused at 0.2mL/min during 5 minutes followed by an additional 5 minutes cell free medium perfusion. Adhesion was quantified at a residual flow rate (0.02mL/min) to allow adherent and non-adherent cells to be discriminated. Twelve microscopic fields were digitised and stored on the computer hard disk. For each microscopic field twenty different levels in the depth axis were analysed to account for the three dimensions of the chamber. Microscopic analysis was performed with dual lighting (white and fluorescent light) which allowed adherent fluorescent cells to be visualized on non-fluorescent fibres. Using Optimas 6.52 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), all depth axis images were integrated to finally obtain a single image on which fluorescent cells were automatically counted. Results are expressed as adhering per mm² per million cells perfused (cells/mm²/10⁶ perfused). The

diameter of cells in suspensions was measured on digitised micrographs. HL60, D3HL60, THP-1 and Molt-4 diameters were respectively 12.7 ± 0.10 , 11.7 ± 0.14 , 15 ± 0.16 , $14.6 \pm 0.14 \mu\text{m}$ (mean \pm SEM of four determinations). These results were consistent with a previous report (Erzurum *et al*, 1991).

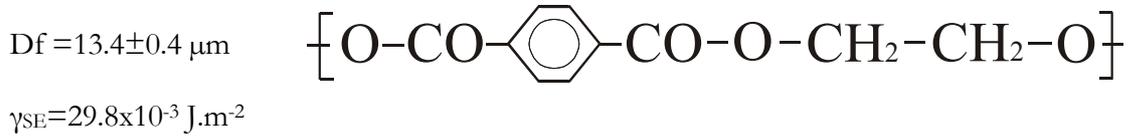
In the empty chamber, the flow conditions in channels were laminar, as indicated by Reynolds number lower than 12. For a standard flow rate (0.2 mL/min), the shear stress corresponds to 0.74 Pa. The shear stress on cells moving through the fibres was variable and could not be calculated in the experimental system. To evaluate the intensity of adhesion we increased the flow rate from 0.2 mL/min to 2 mL/min, which corresponds to a shear stress of 7.4 Pa. At higher shear stress, the leukocytes which remained bound to the fibres were considered to be in stable and irreversible adhesion.

Several different fibres were tested in the chamber: Polyethylene Terephthalate (PET), Polyimide (PI), Polyester (PE), Polypropylene (PP), Polyvinyl Alcohol (PVA) and cellulose. The physicochemical characteristics of the fibres are presented in Table I. Not all parameters regarding the fibres are known or accessible. The fibres were kindly provided by Spontex (Beauvais, France). The fibres were weighted and layered in the chamber. The location and density of fibres were determined by video-microscopy and image analysis. To evaluate how fibre density affected adhesion, we varied the concentration of fibres in the chamber (from 12.7 mg/mL

Table I. Chemical and physical characteristics of fibres

Polyethylene

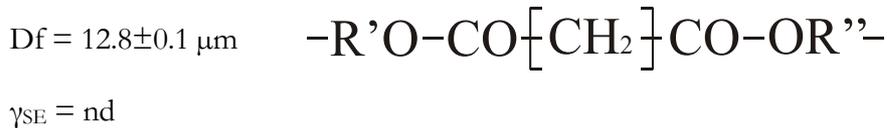
Terephthalate (PET)



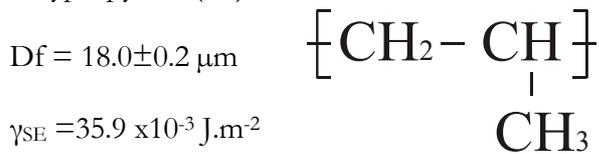
Polyimide (PI)



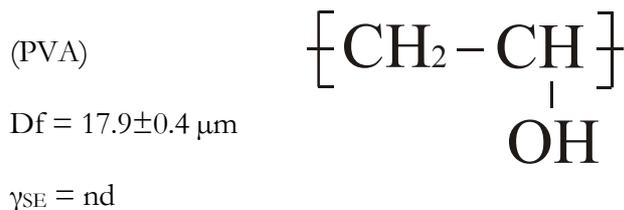
Polyester (PE)



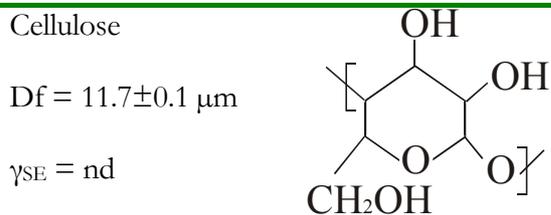
Polypropylene (PP)



Polyvinyl Alcohol



Cellulose



Df=fibre diameter ; γ_{SE} =interfacial tension (nd = not determined). (Dzik, 1993; Schmidt, 1999)

to 69.8 mg/mL). The relationship between fibre concentration and cell adhesion was linear in the range of concentrations tested. At fibre concentrations higher than 70 mg/mL flow conditions were difficult to standardize and the microscopic observations difficult to perform. In subsequent experiments we used a fibre concentration of 25 mg/mL, which gave us the best conditions for observing and counting adherent cells whatever the physical characteristics of the fibres. To determine whether the placement of fibres had any effect on leukocyte adhesion, we defined three cases according to the angle the fibre was making with the axis of the chamber (0°- 30°, 31°- 60° and 61°- 90°). We counted the number of cells adhering to fibres in different arrangements. The adhesion of HL60 was higher to the fibres parallel (0°-30°) to the chamber axis than to those making an angle of more than 30°.

3.3.4 Statistical Analysis

The results are expressed as mean \pm SEM of at least four different sets of experiments. Statistical analysis was performed using one way ANOVA followed by the parametric Dunnett's test.

3.4 Results

3.4.1 Adhesion to fibres of HL60 and leukocytes in whole blood

As an initial step, we compared the adhesion of leukocytes in whole blood and of cultured HL60 cells to fibres present in standard filters (PET fibres). HL60, when non differentiated, adhered less to PET fibres than normal blood leukocytes (205.7 ± 7.1 versus 318.8 ± 7.0 cells/mm²/10⁶ perfused respectively). D3HL60 and blood leukocytes bound to PET fibres to a similar extent but significantly more than non-induced HL60 ($p < 0.001$).

3.4.2 Effect of fibre placement on HL60 adhesion and fibre characteristics

We analysed whether the three-dimensional placement of fibres within the chamber influenced cell adhesion. We looked at HL60 adhesion to fibres at three different heights (A, B, C) within the chamber and defined four different areas (1, 2, 3, 4) along the length of the chamber (Fig 2A). The three dimensional distribution of the cells is shown in Fig 2B. There were no statistically significant differences in HL60 adhesion to fibres according to their level in the chamber. However the difference between the density of cells in A2 and C4 was higher than in A4. This result may be related to the main stream of the flow and the consequently different rheological forces. However according to the inhomogeneity of the medium, it was difficult to calculate the exact shear stress and we are trying to mathematically modelise the flow conditions according to porous medium equations.

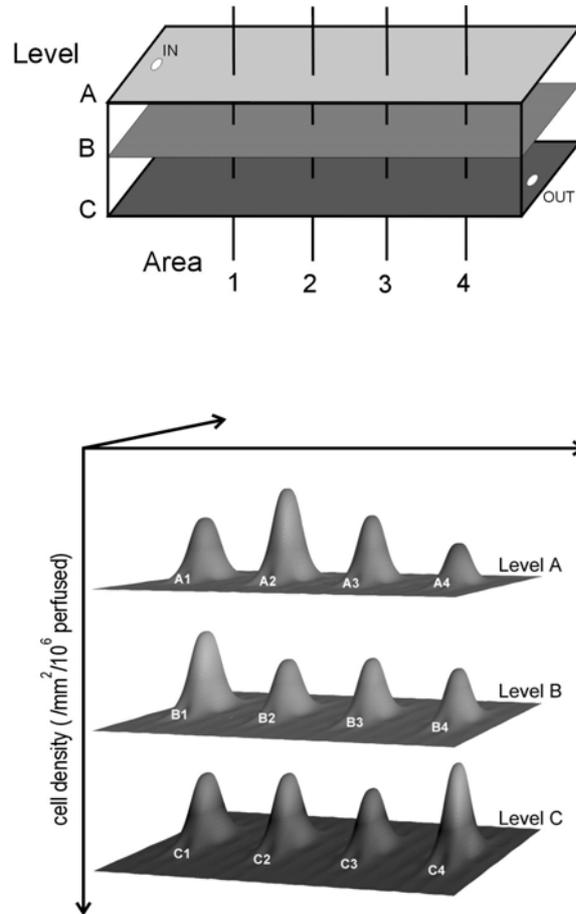


Figure 2. The relationship between HL60 adhesion and the location of the fibres in the chamber. Levels A, B, C correspond to three height levels in the chamber. 1, 2, 3, 4 are sections along the length of the chamber. We measured adhesion on the convergent point. There is no significant difference in HL60 adhesion to fibres located at different levels in the chamber.

The adhesion of HL60 cells to PET, PI and PE were in the same range (205-180 cells/mm²). PVA and cellulose retained less cells (42-50 cells/mm²/10⁶ perfused) and the difference in adhesion to PET was statistically significant ($p < 0.001$). Adhesiveness to PP was intermediate but significantly less than to PET and PI ($p < 0.002$) (Fig 3).

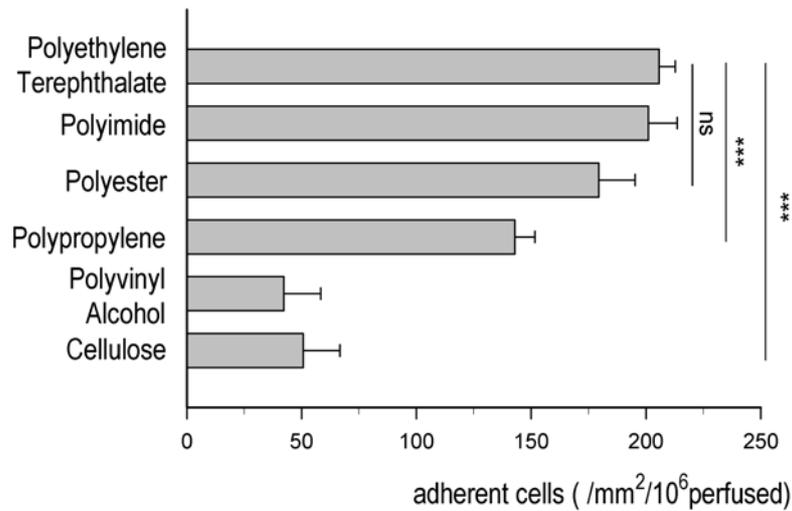


Figure 3. Adhesion of HL60 cells to different type of fibres. The adhesion was significantly higher to polyethylene terephthalate, polyimide, polyester compared to polypropylene, polyvinyl alcohol and cellulose. (***) $p < 0.001$

3.4.3 Cell adhesion molecule expression

Molecule expression was different on different cell types. CD11a was more expressed on granulocytes than on monocytes and lymphocytes as previously reported (Fig 4) (Uciechowski *et al*, 1989). At variance with CD11a which has been quantified in AUF, the other adhesion molecules were expressed in molecules per cell. CD11b was significantly enhanced on HL60 cells after vitamin D3 stimulation and reached a level similar to that observed on THP-1 ($29,906 \pm 481$ molecules per cell). Monocytes, D3HL60 and THP-1 had detectable amounts of CD11c while lymphocytes and Molt-4 had only a very low density of CD11c molecules per cell. CD18 molecules were present at a significant level on all cells but monocytes, D3HL60 and THP-1 exhibited the highest values of molecules per cell. Vitamin D3

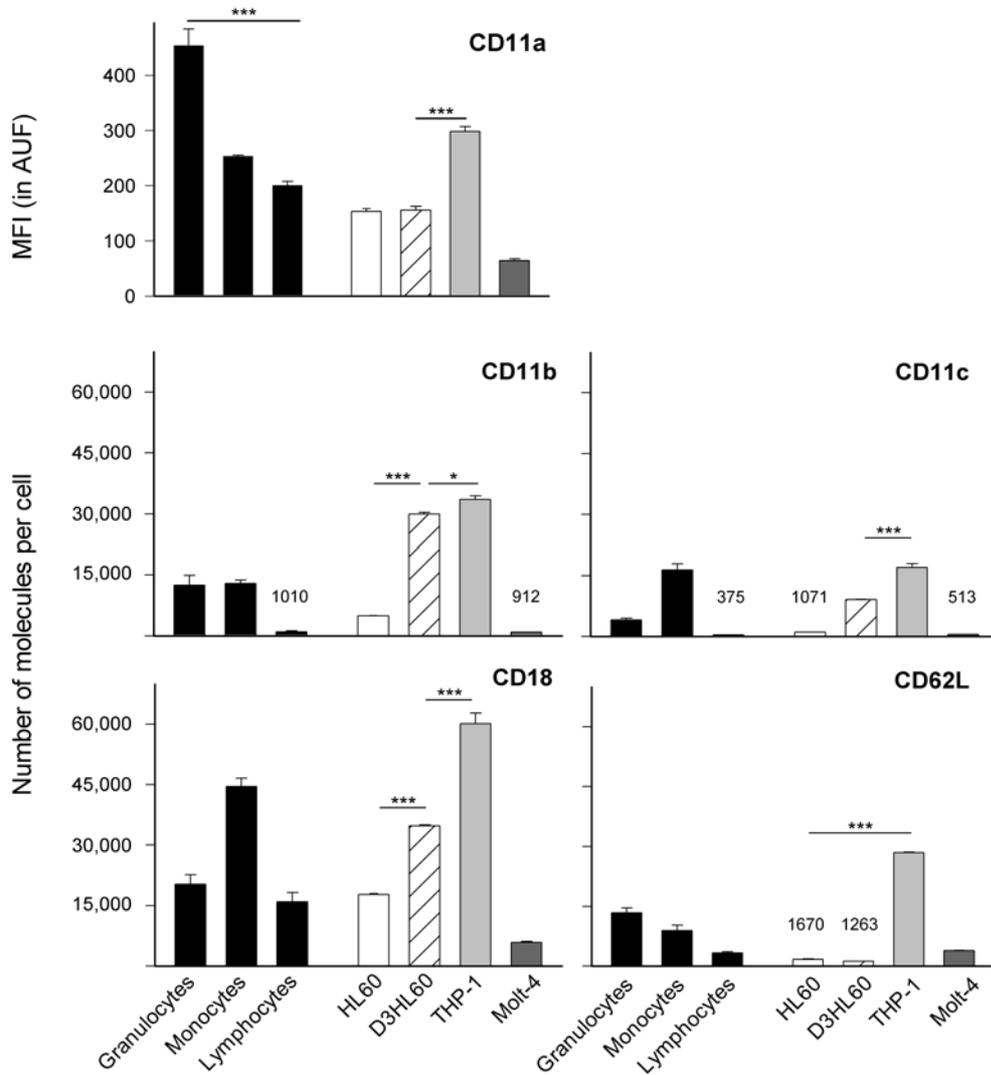


Figure 4. Expression of CD11a, CD11b, CD11c, CD18 and CD62L molecules on human normal blood leukocytes (granulocytes, monocytes, lymphocytes) and on the leukaemic cell lines HL60, D3HL60, THP-1 and Molt-4 using FACS analysis and Quantibrite system. The THP-1 which belong to the monocytic lineage and the Molt-4 to the lymphocytic exhibited significantly different levels of expression of CD11a (***) ($p < 0.001$). THP-1 and D3HL60 had a significantly higher expression of CD11b, CD11c and CD18 compared to uninduced HL60 and Molt-4 (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$). Levels of L selectin were low on HL60 (native and vitamin D3 induced) and Molt-4 ; THP-1 and blood borne white blood cells expressed similarly CD62L.

stimulation significantly increased CD18 on HL60 ($p < 0.001$) but did not reach the monocyte level of CD18. These results indicate that D3HL60 and THP-1 share some of the properties of normal monocytes. THP-1 differed from other cell types in terms of CD62L molecules ($p < 0.001$).

3.4.4 Adhesion of leukocyte cell lines to PET, PI and PVA fibres

A comparative study of the adhesion of cell lines HL60 (undifferentiated and D3 differentiated), THP-1 and Molt-4 to three different types of fibres showed that leukaemic cell lines were more adherent to PET fibres than to PI and PVA fibres (Fig 5). THP-1 cells bound more efficiently than D3HL60 and Molt-4 to PET and PI fibres which appeared to be the most effective adhesive substrate for leukaemic cell lines. THP-1 adhered significantly more than Molt-4 to PI fibres ($p < 0.001$). We previously observed that with D3HL60, anti-CD18 antibody was the most efficient inhibitor of cell retention in the filter (Barbe *et al*, 2000). In the flow chamber, anti-CD18 reduced the adhesion of HL60 to PET fibres which is the type of fibres present in the filter (103 ± 4.7 ; $p < 0.001$). Since THP-1 expressed CD18 to the highest level, we tested the effect of anti-CD18 blocking antibody on the adhesion to PET, PI and PVA fibres. We found that anti-CD18 at a saturating concentration significantly inhibited the adhesion of THP-1 on PET and PI fibres ($p < 0.001$) while a control IgG was without effect (not shown). This result strongly suggested that integrins containing CD18 were involved in the adhesive process to PET fibres as it was the case for leukocyte retention in the minifilter.

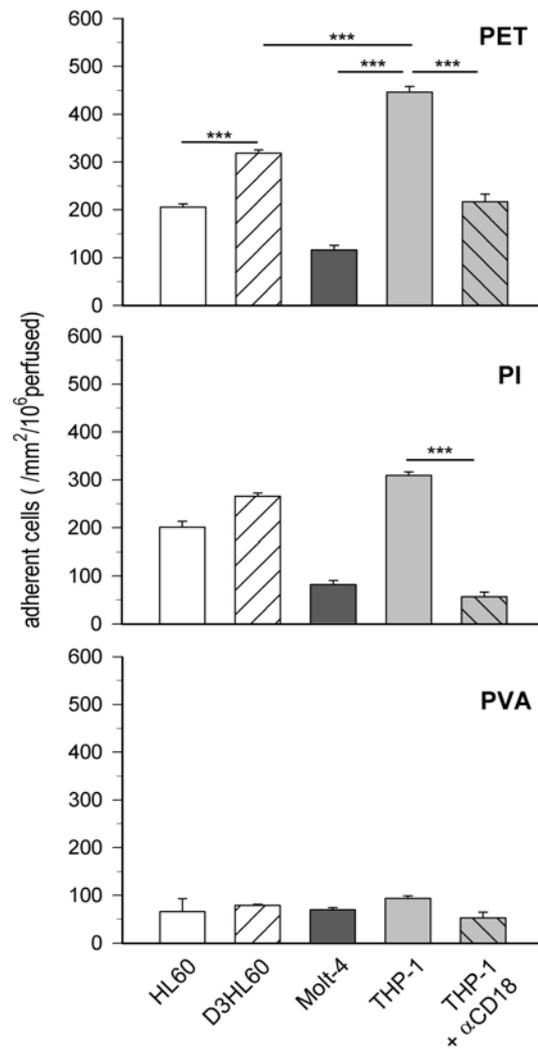


Figure 5. Adhesion of leukaemic cell lines (HL60, D3-HL60, THP-1, Molt-4) on PET, PI and PVA fibres. The adhesion of the monocytic cells (D3HL60 and THP-1) was higher compared to non-differentiated HL60 cells or lymphocytic cells (Molt-4) ($p < 0.001$). The high adhesion was inhibited by a specific antibody directed against CD18. Molt-4 cells were significantly less adherent to PET and PI fibres than THP-1 ($p < 0.001$). The most efficient fibres for retaining cells were PET and PI compared to PVA. The results are expressed as mean \pm SEM ($n=4$).

3.5 Discussion

The results obtained with the assay that we designed to study interactions between blood cells and fibres, showed that several parameters influenced cell binding to fibres: physical barrier retention, surface phenomenon, charge density, cell/cell interaction, cell molecule expression. The amount of fibres present in the flow chamber was directly related to the cell retention. The highest concentration of PET fibres tested (85 mg/mL) corresponds to that present in the upper layer of the standard blood filter (Sepacell RS2000). The experiment performed in the flow chamber demonstrated that the leukocyte or leukaemic cell retention is directly related to the amount of fibres which is consistent with the previous observations showing that increasing filter bed volume increased filter efficiency while smaller pore size has lower efficiency (Callaerts *et al*, 1992). The location of the fibres in the flow chamber appeared less important than the orientation of the fibres and their density. If in the filter the geometrical parameters are the same for leukocyte adhesion as in the chamber, the fibre placement should probably be reconsidered and the barrier retention mechanisms re-evaluated. Furthermore, in previous experiments we showed that HL60 differentiated by vitamin D3 are smaller than HL60 cells and are trapped to a higher extent in the filter (Barbe *et al*, 2000). Fibres almost parallel to flow axis provided longer contact time at variance with those perpendicular to the axis (fibre orientation = 60°-90°). The fibres which are presently used in filters (PET) appeared among the most attractive for leukocytes. However, PI fibres exhibited similar properties and could represent an alternative material. From a chemical point of view PET, PI and PE at variance with the other fibres have a carbonyl radical (CO group) in common. PET and PI are the only two

components that have a phenyl group which may confer a high hydrophobicity. Previous reports suggested that wettability and/or oxygen containing groups like hydroxyl carbonyl and carboxylic acid groups can influence cell adhesion (Bruil *et al*, 1992). The adhesion of leukocytes to coated surfaces with different polymers is consistent with the results recorded with the fibres and cell lines in a flow based assay (Bruil *et al*, 1992; Bruil *et al*, 1993). According to the model of Neumann *et al*, cells with the lowest surface tension (most hydrophobic) would be most likely to adhere to synthetic material (Absolom *et al*, 1988).

Our experiments revealed that the leukocyte integrin adhesion molecules are important for adhesion to filters. The integrin hydrophobic region of the molecule may be a counterpart of the hydrophobic part of the synthetic fibre since it is known that hydrophobicity of two molecules may facilitate their interactions (Hynes, 1992). To further explore the factors involved in leukocyte adhesion to the fibres we used several leukaemic cell lines. Modulation of HL60 integrin expression by VitD3 and the use of adhesion blocking antibodies revealed the importance of CD11-CD18 (Barbe *et al*, 2000). The β 2 integrin (CD18) is present on HL60 and is involved in the adhesion. The expression of the integrins and the fact that antibodies against CD11b, CD11c and CD18 could inhibit the retention of D3HL60 supported the concept that integrins mediate adhesion in the filter (Barbe *et al*, 2000). The anti-CD18 antibody was the strongest inhibitor in the minifilter experimental device, and was efficient in blocking adhesion of leukaemic cells expressing CD18 to PET and PI fibres. In other experimental settings, anti-CD18 was found to be the best antibody to prevent leukocyte adhesion and accumulation in ischemia reperfusion (Clark *et al*, 1996). The

CD11-CD18 expression profile of white blood cells appeared to be related to their ability to bind to PET fibres. Leukaemic cells which exhibited the highest level of expression of CD11-CD18 showed the most efficient adhesion to fibres. Molt-4 had the lowest capacity for adhesion whatever the fibre was and the lowest expression of β 2-integrins.

The use of fibres coated with proteins or antibodies to improve the retention of leukocytes has been proposed (Kwekkeboom *et al*, 1998). In our experiments fibres did not interact with other leukocyte adhesion molecules such as VLA class of adhesion receptors. In other studies sialyl Lewis x has been showed to be a ligand for selectin and could possibly represent an alternative pathway for leukocyte capture by sialyl Lewis x coated fibres (Lawrence *et al*, 1997). Selectins are capable of mediating leukocyte rolling and the relative effectiveness of selectin and β 2-integrin adhesion mechanisms has been attributed to differences in bond formation rates (Hammer *et al*, 1992).

The results obtained in this study confirmed that the choice of PET for blood filtration is currently the most efficient although fibres like PI have similar properties. Additionally the density of fibres and their orientation are factors that may influence leukocyte adhesion. As some leukaemic cells (Molt-4) as well as lymphocytes are less efficiently retained by the fibres, the design of new fibres with affinity for leukocyte adhesion molecules other than β 2-integrins may improve the process of leukocyte depletion by blood filters. Filters can also be used to isolate stem cells from cord blood (Nakamura *et al*, 2000; Yasutake *et al*, 2001).

The progress made in leukocyte biology and in the understanding of the adhesion process could allow improvement in blood filtration techniques leading to reduction of risks related to blood transfusion.

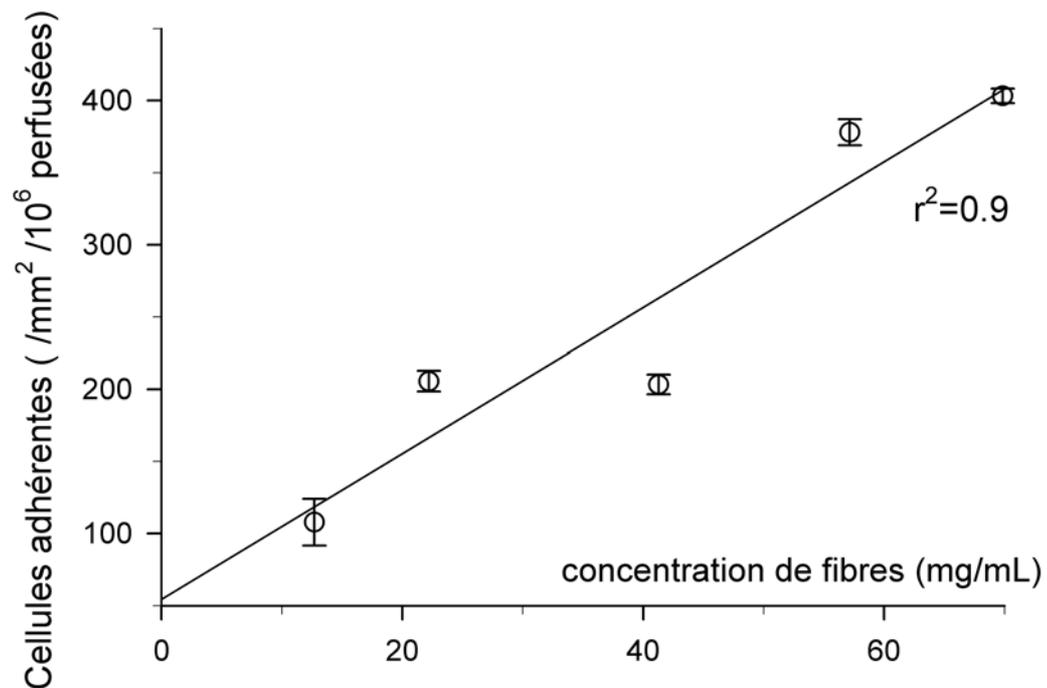
Acknowledgments

We are very grateful to E. Rainger Ph.D. (Department of Physiology. University of Birmingham, UK) for his scientific advice.

4. AUTRES RESULTATS DE LA CHAMBRE D'ÉCOULEMENT

Les premières figures de ce paragraphe correspondent à des éléments du « matériels et méthodes » de l'article. Quand le type de fibres n'a pas été précisé, les expériences ont été réalisées avec des fibres PET, polymère largement répandu dans la constitution des filtres transfusionnels.

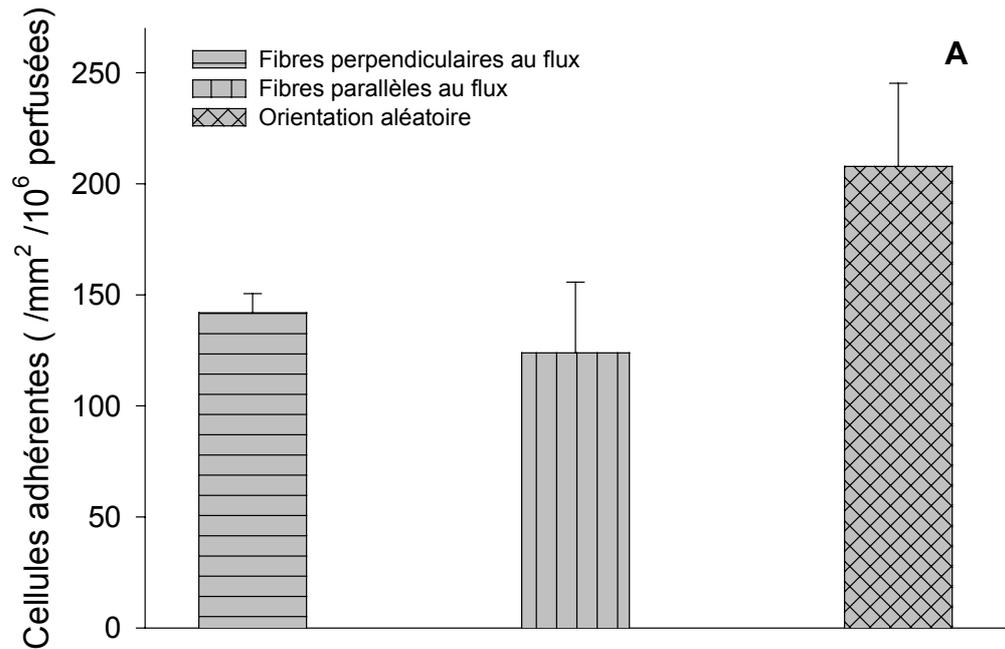
4.1 Effet de la densité de fibres



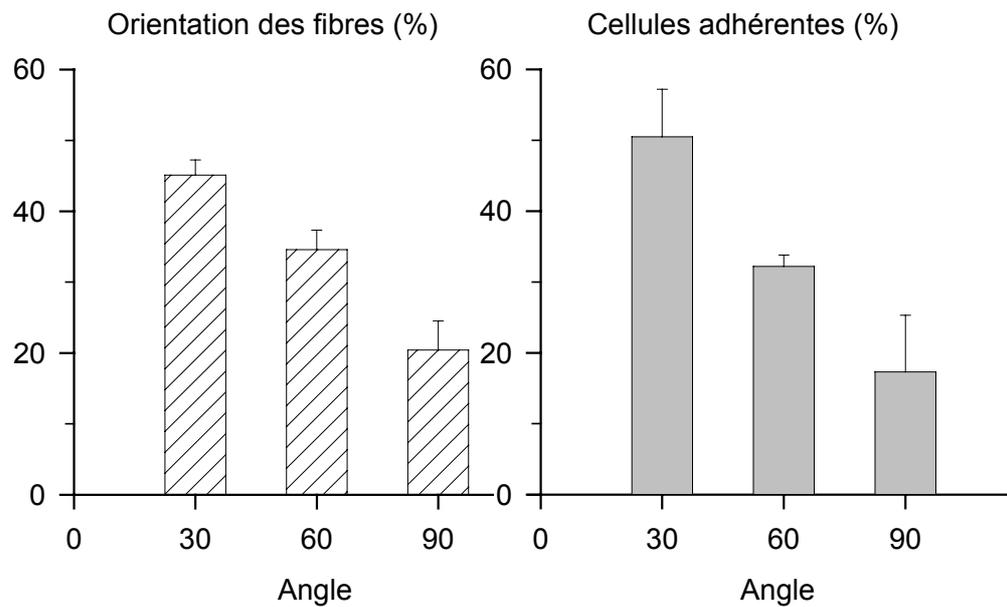
Dans un premier temps, nous avons testé l'influence de la densité de fibres sur la rétention des cellules HL60 (Figure ci-dessus). La densité de fibres, exprimée en mg/mL, varie de 12,7 à 69,8 mg/mL soit 0,4 à 2,2 mg de fibres. Nous observons une relation quasi-linéaire entre l'adhésion des cellules et la concentration de fibres dans la chambre. Au-delà de 70 mg/mL, l'opacité des fibres rend les observations

microscopiques et le comptage très difficiles. Par la suite, les expériences ont été réalisées avec 25 mg/mL de fibres.

4.2 Influence de l'orientation des fibres

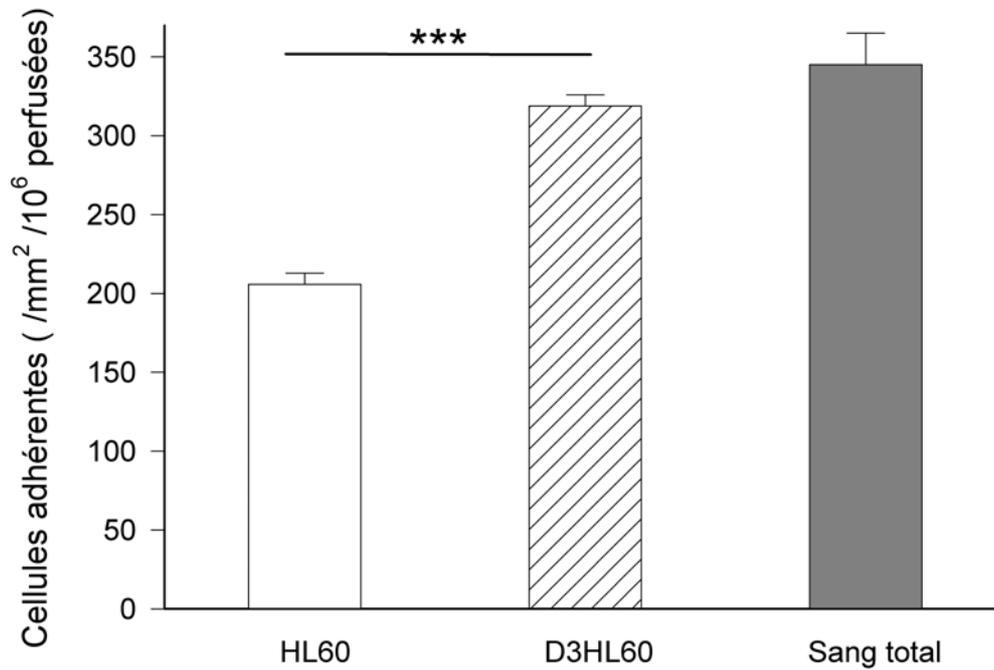


B



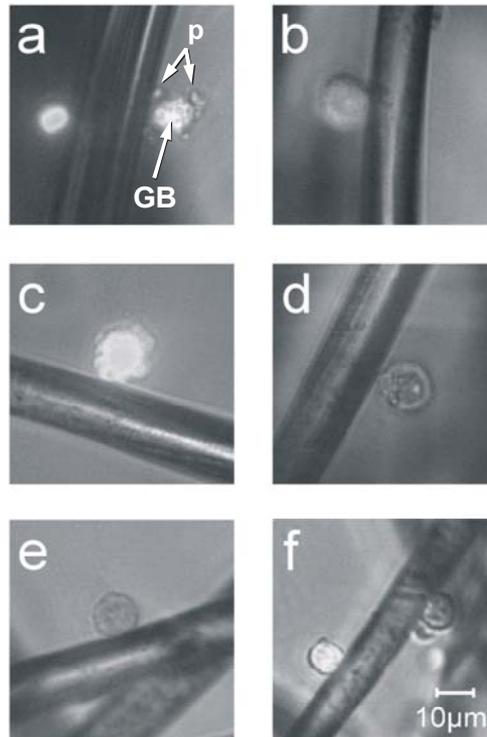
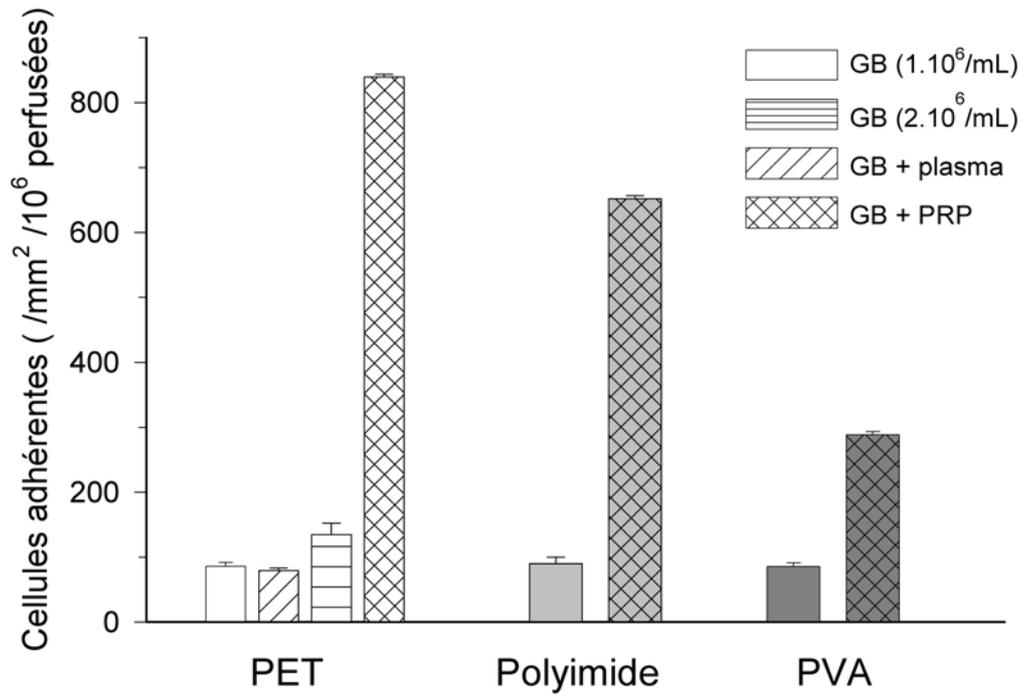
Dans un second temps, l'influence de l'orientation des fibres sur l'adhésion cellulaire a été évaluée. Des fibres peignées (considérées comme parallèles entre elles) ont été disposées dans l'axe du flux ou perpendiculairement à celui-ci. L'adhésion cellulaire dans ces deux configurations a été comparée à l'adhésion sur des fibres disposées aléatoirement (Figure A page précédente). Nous observons une légère augmentation, bien que non significative, de l'adhésion pour la disposition aléatoire des fibres. Pour cette configuration, la figure B détaille l'adhésion des cellules en fonction de l'orientation des fibres, découpée en trois sections angulaires (0° - 30° ; 31° - 60° ; 61° - 90°) selon l'angle que fait la fibre avec l'axe longitudinal de la chambre. Le premier graphique de la figure B reporte le pourcentage de fibres appartenant à l'une des trois sections angulaires. Ce pourcentage a été calculé avec le logiciel de traitement d'images à partir de multiples champs microscopiques étudiés. Il apparaît que près de la moitié des fibres ont une orientation comprise entre 0° et 30° , c'est-à-dire proche de l'axe principal de la chambre. Ceci s'explique par le fait que les deux canaux de la chambre ont une géométrie où la longueur est nettement plus grande que la largeur, influençant de ce fait la disposition des fibres. Il semble que dans le secteur 0° - 30° l'adhésion soit plus forte par rapport aux deux autres secteurs (différences non significatives). Néanmoins, lorsque le rapport de la répartition cellulaire par secteur sur l'orientation des fibres est effectué, nous observons des valeurs proches de 1 pour chaque secteur.

4.3 Comparaison sang – lignée



Comme pour le modèle de minifiltre, nous avons comparé l'adhésion de sang total à l'adhésion de cellules issues de lignées, permettant de valider le modèle de chambre et le modèle de lignée. La figure montre une plus forte adhésion des cellules HL60 différenciées, comparable à l'adhésion des leucocytes du sang total.

4.4 Influences des constituants sanguins



A partir du sang total, différents constituants ont été isolés et perfusés sur trois types de fibres caractéristiques (PET et Polyimide : fort potentiel de rétention ; PVA : faible potentiel de rétention). Pour le PET, deux concentrations de leucocytes isolés ont été testées. Dans cette gamme de concentration, nous observons une adhésion concentration dépendante. Pour les autres expériences, la concentration de leucocytes est fixée à 1.10^6 cellules/mL. En ajoutant du plasma aux leucocytes, l'adhésion est plus faible (différence non significative) que pour des leucocytes suspendus dans une solution tampon. Enfin, pour les trois types de fibres, les plaquettes et le plasma ont été ajoutés aux leucocytes. L'adhésion est très fortement augmentée en présence de plaquettes, quel que soit le type de fibres utilisé, avec toutefois une augmentation plus marquée pour les fibres de PET.

Les microphotographies de la page précédente représentent différents types de cellules adhérentes à des fibres de PET (A : leucocytes et plaquettes du sang total ; B : leucocytes seuls ; C : cellules HL60 ; D : cellules D3HL60 ; E : cellules THP-1 ; F : cellules Molt-4). Ces images, capturées pendant la phase de rinçage, après la perfusion de la suspension cellulaire, ont permis de mettre en évidence différents types d'interactions. Nous observons une grande affinité des plaquettes avec les fibres PET et Polyimide, beaucoup plus faible avec les fibres PVA (figure page précédente). Des interactions plaquette-plaquette ont aussi été observées. Selon la disposition « locale » des fibres, des amas de plaquettes peuvent se former. Le même type d'interaction se retrouve avec les leucocytes : leucocyte directement fixé sur la fibre (photo B page précédente), adhésion leucocytes – leucocytes et amas. Enfin, nous avons pu observer des adhésions entre plaquettes et leucocytes, c'est-à-dire des

leucocytes adhérant à des plaquettes fixées aux fibres mais aussi le schéma inverse, plaquette(s) sur leucocyte fixés à la fibre (photo A). Il est intéressant de remarquer que ces d'interactions ont été décrites mais uniquement après des analyses post-filtration de filtres (Steneker *et al*, 1992; Steneker *et al*, 1995). Un des intérêts de ce système est donc de pouvoir observer la cinétique des interactions.

Par la suite, différentes lignées cellulaires ont été perfusées dans la chambre d'écoulement. Les microphotographies illustrent des interactions typiques entre fibres et cellules et permettent en outre de distinguer des signes d'activation au contact de la fibre. Parmi les lignées choisies, nous n'avons jamais observé de cellules étalées, signe d'activation, sur la fibre.

Chapitre 4

DISCUSSION

L'adhésion cellulaire à une matrice extracellulaire, d'autres cellules ou des biomatériaux est un phénomène très important qui régit une large gamme de fonctions cellulaires en physiologie, pathologie et dans de nombreuses applications de biotechnologie. Ce processus utilise des interactions mécaniques mais aussi des signaux chimiques comme base de régulation cellulaire et il s'insère dans un large spectre de disciplines comme la biochimie, la biophysique, la biologie cellulaire, etc. La filtration sanguine dans le cadre de la transfusion est une des nombreuses applications de ce processus d'adhésion. Dans ce cadre, l'adhésion des leucocytes est dépendante de nombreux facteurs (physique, chimique, mécanique) qui interagissent et dont l'influence reste à confirmer ou à infirmer. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés, par le biais de plusieurs modèles expérimentaux, à certains d'entre eux.

1. LES MOLECULES D'ADHESION

A l'issue de cette étude, des résultats communs aux systèmes de minifiltre et de chambre d'écoulement ressortent. En effet, à l'aide du modèle de lignée cellulaire, nous avons pu mettre en évidence l'importance de certaines intégrines comme acteur de la déleucocytation. Quel que soit le système expérimental utilisé, nous avons

constaté une rétention cellulaire dépendante de l'expression des intégrines $\alpha\beta 2$. Ces résultats confirment des hypothèses émises dans certains travaux où l'intégrine $\beta 2$ était supposé jouer un rôle dans la déleucocytation (Dzik, 1993). En outre, l'utilisation d'anticorps bloquants nous a permis de cibler plus précisément les intégrines CD11b/CD18 et CD11c/CD18. L'importance de ces molécules d'adhésion a été démontrée de nouveau dans la chambre d'écoulement dans laquelle les mécanismes de tamisage sont absents. L'utilisation de lignées cellulaires, autre que la lignée HL60, telles que la lignée THP-1 ou Molt-4 a permis de tester l'adhésion de cellules qui expriment à l'état basal des sélectines, absentes sur les HL60. En effet, les cellules THP-1 expriment la L-sélectine (CD62L) (cf. Annexe 4). Cette expression explique peut être la différence d'adhésion entre les cellules THP-1 et les cellules D3HL60, même si le niveau d'expression des intégrines CD11/CD18 est plus élevé sur les cellules THP-1 et explique éventuellement à elle seule l'écart entre les deux types cellulaires. Il est possible cependant que pour de faibles contraintes de cisaillement, la L-sélectine soit médiateur de l'adhésion, sans nécessairement engager les intégrines CD11/CD18 (Gopalan *et al*, 1997). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant un anticorps bloquant la L-sélectine. Une autre hypothèse pour expliquer cet écart est la localisation des molécules d'adhésion à la surface des cellules. C'est ainsi que Berlin a montré que la L-sélectine se situe à l'extrémité des plis de la membrane cellulaire à la différence des intégrines $\beta 2$ (Berlin *et al*, 1995) et selon les forces exercées sur la cellule, et donc sur la membrane, nous pouvons imaginer des interactions avec l'une ou l'autre molécule.

2. LES CONSTITUANTS SANGUINS

Les deux modèles expérimentaux, travaillant avec de faibles volumes, ont permis dans un second temps de tester l'influence des différents constituants sanguins (cellulaires ou protéiques) sur l'efficacité de la rétention cellulaire. Globalement, nous observons que le plasma réduit ou ne modifie pas l'efficacité de la rétention cellulaire comme l'ont montré plusieurs auteurs (Bruil *et al*, 1994b; Ledent *et al*, 1996). Bruil, dans une chambre d'écoulement avec une monocouche de polymères, et Ledent, sur des filtres standards, ont montré que l'ajout de plasma à la suspension cellulaire diminue l'adhésion leucocytaire par rapport à un milieu de resuspension standard.

Les différentes études publiées sur les interactions avec les plaquettes dans le cadre de la transfusion s'accordent à avancer un effet synergique des plaquettes sur la déplétion des leucocytes. Cependant nous observons des divergences entre les résultats du minifiltre et ceux de la chambre d'écoulement (et plus généralement de la littérature) qui s'expliquent vraisemblablement par l'état des plaquettes. En effet, cet état - activé ou non - va en grande partie conditionner l'adhésion des leucocytes à leur surface (Rasp *et al*, 1981; Stone *et al*, 1999). Avec le minifiltre, il n'y a pas de synergie entre les plaquettes et les leucocytes. Dans les conditions de la chambre d'écoulement, nous observons une rétention de leucocytes beaucoup plus importante en présence des plaquettes, plus marquée avec les fibres PET et PI. Il est possible que les conditions hydrodynamiques favorisent l'activation des plaquettes. Une étude récente a ainsi montré que l'intensité des contraintes hydrodynamiques peut moduler l'adhésion des plaquettes selon les biomatériaux (Furukawa *et al*, 2000). Ces conditions sont différentes entre le minifiltre et la chambre d'écoulement en partie à

cause de la densité de fibres. L'écoulement de nouveau, comme pour CD11/CD18, peut favoriser des « schémas d'adhésion » différents entre les leucocytes et les plaquettes en recrutant certaines molécules d'adhésion plutôt que d'autres (Aigner *et al*, 1998; Greenberg *et al*, 2000; Rodgers *et al*, 2000; Sackstein *et al*, 2000). Dans notre cas, les leucocytes ou HL60 pourraient adhérer à des plaquettes par un autre chemin que la liaison PSGL-1 / P-sélectine selon les conditions d'écoulement.

3. LES CONDITIONS D'ÉCOULEMENT

Les conditions d'écoulement ont été étudiées à l'aide de la chambre d'écoulement dans laquelle la quantité et la disposition des fibres ont pu être modifiées ainsi que le débit par l'intermédiaire de la pompe seringue. Dans la chambre, le débit de perfusion a été fixé à 0,2 mL/min pour la plupart des expériences. Cependant, après perfusion, des échelons de débit ont permis de tester la résistance des cellules au décollement. Jusqu'à 2 mL/min, les cellules restent attachées aux fibres. Au-delà, l'intégrité du réseau de fibres n'est plus conservée et nous observons des déplacements des fibres. Il est intéressant de voir dans ce modèle expérimental que l'adhésion cellulaire est fonction de la disposition des fibres et de la vitesse locale de la cellule. Le réseau de fibres engendre des perturbations dans l'écoulement qui influencent ou non l'adhésion. Les observations microscopiques pendant les perfusions vont dans ce sens. Selon l'orientation des fibres par rapport à l'écoulement « global » du flux, différents comportements apparaissent. En effet, dans des configurations extrêmes où les fibres sont parallèles ou perpendiculaires au flux, nous observons des niveaux d'adhésion équivalents. Mais pour une orientation

aléatoire des fibres, l'adhésion cellulaire est plus importante d'environ 30%. Pour les fibres perpendiculaires au flux, nous avons pu observer des cellules qui ricochent avec vraisemblablement des longueurs et des durées de contact trop faibles. Pour les fibres parallèles, les cellules ont une plus grande longueur de contact mais leurs vitesses relatives (estimées par le logiciel d'analyse d'images) semblent plus importantes, réduisant de ce fait l'adhésion. Dans la configuration aléatoire, les cellules sont dans un réseau où il y a beaucoup d'obstacles qui peuvent abaisser la vitesse relative de la cellule et ainsi faciliter l'accrochage à la fibre. Les estimations de vitesse sont très délicates car les cellules dans ce cas ne restent pas sur un même plan. Cependant, il est important de rappeler que ces observations microscopiques restent qualitatives et difficilement quantifiables car ce sont des événements dynamiques.

4. TEMPS DE PASSAGE

Ce paramètre de temps de passage semble être principalement dépendant des conditions d'écoulement et de la rhéologie de la suspension à filtrer. Il est intéressant de remarquer l'influence du temps de passage des cellules dans le minifiltre par le biais de courbes d'écoulement (temps – volume). La courbe de temps de filtration indique une corrélation entre l'hématocrite et le temps nécessaire pour filtrer le sang. Nous observons une différence assez sensible du temps de filtration pour une augmentation de 10% de l'hématocrite, ce qui confirme l'influence de la concentration de globules rouges sur la rhéologie du sang (Comolet, 1984). Des études sur des membranes de filtration (plus fines et de pores plus petits) vont dans le même sens (Lindmark *et al*, 1996). Même si l'on observe des fluctuations dans

l'écoulement du sang total en fonction de l'hématocrite, les performances de la déleucocytation ne semblent pas corrélées avec ce paramètre. Ces mêmes performances ne semblent pas non plus influencées par la concentration initiale de leucocytes ou de plaquettes.

Les courbes d'écoulement des différents constituants du sang n'aboutissent pas aux mêmes conclusions. En l'absence de globules rouges, l'écoulement est plus rapide mais avec une déleucocytation plus forte comme le montrent les résultats du minifiltre. Nous pouvons imaginer que les globules rouges augmentent les contraintes sur les leucocytes en phase d'adhésion ou déjà accrochés aux fibres. Cette hypothèse est confortée par des observations dans la chambre d'écoulement où des leucocytes sont détachés par le flux de globules rouges. La présence de plaquettes ralentit le flux par rapport à une solution de leucocytes mais nous observons parallèlement une déleucocytation plus faible. Les mêmes conclusions s'imposent dans des suspensions de D3HL60 avec et sans plaquettes. D'autre part, il est intéressant de remarquer que les solutions de cellules HL60 se comportent de la même façon que des leucocytes seuls ou en suspension dans du plasma (différences non significatives entre ces deux derniers cas) aussi bien en terme de l'écoulement que de déleucocytation. Pour les expériences comparatives entre les cellules HL60 natives et différenciées, nous observons un temps final de filtration plus court pour les cellules D3HL60 et parallèlement un niveau de rétention plus élevé. Les données de temps pour les expériences avec les anticorps bloquants sur les D3HL60 sont à utiliser avec précaution compte tenu des variations relevées entre les expériences. A l'issue de ces résultats, il semble que le paramètre de temps de transit (ou temps de

passage) dans le filtre soit un facteur important. Dans le minifiltre, et par conséquent dans le filtre taille réelle, cette variable est couplée avec les concentrations respectives des autres espèces cellulaires qui peuvent conduire à des phénomènes de margination (Goldsmith *et al*, 1984; Murata, 1996). Le temps de passage est aussi lié à la géométrie du réseau de fibres et à la vitesse « locale » de la cellule qui ensemble font varier les probabilités et le temps de contact sur la fibre. Enfin, un paramètre plus global comme la température, a pu être testé sur le modèle de minifiltre. En accord avec la bibliographie, nous observons une meilleure déleucocytation à basse température (4°C) par rapport à la filtration menée à 37°C. Comme Ledent et Berlin, nous retrouvons une différence d'environ 2 LOG₁₀ entre les filtrations réalisées à 4°C et 37°C. A basse température, la viscosité du sang total s'accroît, due à des modifications de la viscosité du plasma, à la déformabilité des globules rouges et à l'agrégation (Adams *et al*, 1995). Nous observons alors un écoulement beaucoup plus lent. Dans ce cas, le phénomène de capture mécanique doit être plus important que le processus d'adhésion dans la déplétion leucocytaire.

5. MATERIAUX

Le temps de contact va en outre dépendre de l'affinité de la cellule avec la fibre, faisant appel à des interactions physico-chimiques et biologiques. Le modèle de la chambre d'écoulement a permis de tester différents modèles de fibres. Le PET (polyéthylène téréphtalate), un des polymères les plus utilisés dans la fabrication des fibres de filtres de transfusion, apparaît très réactif avec les différents types de cellules. Les fibres composées de PI (polyimide) et de PE (polyéthylène) arborent

une affinité légèrement plus faible. Le PET et le PI ont un groupement phényle en commun, radical hydrophobique, qui peut favoriser l'adhésion comme différentes études l'avancent (Bruil *et al*, 1992; Bruil *et al*, 1994a; Tegoulia *et al*, 2000). Les conclusions de ces études menées avec des systèmes dynamiques convergent vers le fait que l'adhésion cellulaire est le résultat de la compétition entre des interactions non-spécifiques qui amènent la cellule près de la surface et de forces mécaniques (contrainte de cisaillement) qui contribuent à l'en éloigner.

Des connaissances plus précises des mécanismes régissant la filtration peuvent aboutir à différentes applications ou améliorations. Pour la filtration, il semble évident que des filtres plus performants et plus sélectifs sont préconisés dans le but d'obtenir des produits sanguins avec un nombre de leucocytes résiduels qui tend vers zéro, confortant le principe de précaution. Des applications ont été imaginées en utilisant le principe de la filtration ou directement des filtres. Des études ont démontré que l'utilisation de filtres à déleucocyter dans le circuit de circulation extracorporelle peut rendre les autotransfusions plus sûres en chirurgie tumorale en évitant la réinjection des cellules malignes (Miller *et al*, 1991; Edelman *et al*, 1996; Kongsgaard *et al*, 1996).

Kwekkeboom quant à lui a utilisé des fibres de nylon coatées avec des immunoglobulines pour la déplétion des monocytes et des cellules myéloïdes depuis des échantillons de leucophérèse (Kwekkeboom *et al*, 1998). Plus récemment, une étude a démontré l'utilité de la filtration cellulaire pour la séparation et la récupération de cellules souches (Yasutake *et al*, 2001). Les auteurs utilisent un filtre à déleucocyter

un peu modifié dans lequel les fibres sont recouvertes d'un polymère hydrophile. Ce type de filtre plus sélectif permet ainsi de récupérer les cellules à partir de sang de cordon ombilical ou placentaire.

Chapitre 5

P E R S P E C T I V E S

Les perspectives de ce projet s'articulent principalement autour de deux axes. Le premier concerne les améliorations techniques des dispositifs expérimentaux mis en œuvre durant ce travail (chambre d'écoulement, microscopie, analyse d'images, etc.). Le second axe constitue les projets et applications de ce travail, en cours ou dans un futur plus ou moins proche.

1. AMELIORATIONS DES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

Comme nous l'avons expliqué dans le second article, une des limitations de la chambre d'écoulement est de ne pas pouvoir travailler à de trop grandes densités de fibres qui empêchent la visualisation des cellules fluorescentes. Pour remédier à ce problème, il est envisageable d'utiliser d'autres types de microscope comme le microscope confocal qui permet une exploration dans l'épaisseur du matériau à tester. Selon la puissance du laser de ce microscope et la durée de vie des marqueurs fluorescents, il est possible de visualiser des objets fluorescents jusqu'à 500 μm , ce qui correspond à l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la chambre. Des essais préliminaires ont été réalisés avec ce type de matériel, pour des densités de fibres élevées, et se sont avérés concluants. En outre, ce système de microscopie permet

d'obtenir des images de meilleures résolutions facilitant ainsi la procédure de traitements des images. Le seul obstacle reste financier compte tenu du coût très important de ce type de matériel.

Un certain nombre de perfectionnements peut être apporté à la chambre d'écoulement. Actuellement, les faces inférieures et supérieures de la chambre sont en plastique ce qui nécessite leur remplacement régulièrement. Il est possible d'imaginer une configuration légèrement différente de la chambre où les orifices ne sont pas placés sur les faces inférieures et supérieures mais de chaque côté des canaux. Un prototype a été réalisé au laboratoire et se comporte globalement comme le modèle utilisé pendant ce travail.

Les différentes modifications proposées permettraient d'approfondir l'étude des interactions cellules – fibres. Nous pouvons ainsi envisager l'étude de l'adhésion de microbilles de latex recouvertes de molécules spécifiques sur des fibres (Brunk *et al*, 1996; Brunk *et al*, 1997). L'avantage d'un tel système, par rapport aux lignées cellulaires, est de travailler avec un seul type de molécules d'adhésion dont on peut faire varier la densité. Ce procédé peut être très pratique pour tester l'affinité entre une molécule et son ligand et serait envisageable dans notre projet de greffages de molécules sur les fibres.

Une fois l'aspect purement moléculaire des interactions mieux cerné, nous pourrions évaluer le mécanisme de « tamisage » en augmentant la densité de fibres. Dans ce but, l'utilisation de microbilles (sans molécule dans un premier temps) semble là aussi bien appropriée.

Ce sont deux voies possibles d'investigation parmi tant d'autres. En effet, comme le décrit la bibliographie, de nombreux paramètres ne sont pas évalués dans le cadre de la filtration. Le paragraphe qui suit détaille les projets en cours avec d'autres laboratoires, dans le but entre autre est de mieux cerner l'influence de certains de ces paramètres.

2. TRAVAUX EN COURS

Actuellement notre laboratoire est en collaboration avec deux équipes de chercheurs pour aborder d'une part le greffage de molécules sur des fibres⁴ et d'autre part la modélisation de l'écoulement de suspensions cellulaires dans un réseau fibreux⁵. Leurs projets respectifs sont détaillés par la suite. Il nous est apparu intéressant de développer ces deux thématiques pour plusieurs raisons. D'une part, l'aspect greffage va permettre de créer des fibres sélectives selon le motif greffé. Il peut en résulter des filtres à déleucocyter plus performants mais aussi des fibres capables de retenir spécifiquement certains types cellulaires (cellules tumorales, cellules souches). D'autre part, la modélisation de l'écoulement dans le filtre apparaît comme la seule solution pour caractériser le flux cellulaire dans le réseau fibreux. Ce travail peut aboutir à de

⁴ Travail mené par le Dr Philippe Roger au Laboratoire de chimie organique multifonctionnelle de l'Institut de Chimie Moléculaire d'Orsay (ICMO).

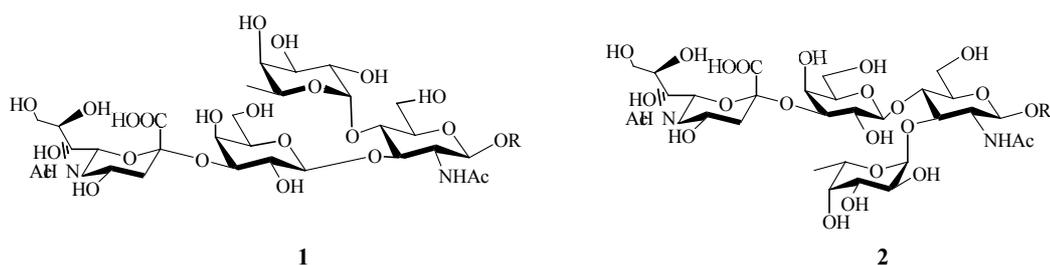
⁵ Travail mené conjointement par le Dr Eric Cancès au CERMICS (Centre d'Enseignement et de Recherche en Mathématiques, Informatique et Calcul Scientifique) à l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées et par le Dr Jean-Frédéric Gerbeau de l'INRIA (Institut National de Recherche en Informatique et Automatique).

nouvelles géométries de filtres dans lesquels les interactions cellules/fibres sont favorisées par l'écoulement.

2.1 Greffage des fibres

Les sélectines forment une famille de protéines responsables de l'adhésion entre les leucocytes et les cellules endothéliales ou les plaquettes. Cette famille comprend trois protéines : la sélectine P, constitutive, exprimée sur les plaquettes ; la sélectine E exprimée sur l'endothélium activé, et la sélectine L, constitutive, présente sur les leucocytes. Les sélectines ont un domaine de type C-lectine permettant la reconnaissance de structures glycaniques. Cette reconnaissance est l'objet de nombreuses études car elle précède la migration des leucocytes vers les sites d'inflammation, faisant de cette étape une cible importante dans la thérapie de différents dés ordres pathologiques observés comme l'inflammation, l'ischémie-reperfusion, l'arthrite rhumatoïde...

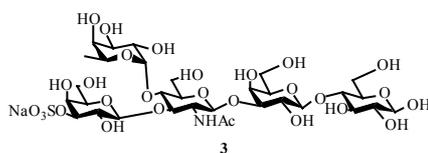
De nombreuses équipes ont montré au début des années 90 que les trois sélectines reconnaissent des structures oligosaccharidiques voisines. Il s'agit de tétrasaccharides de type sialyl Lewis^a (1) ou sialyl Lewis^x (2), ces composés partagent des conformations communes (même positionnement spatial des résidus acide sialique et fucose).



Tyrell et al (Tyrell *et al*, 1991) ont montré que la charge négative du carboxylate jouait un rôle dans la reconnaissance sélectine ligand plutôt que l'acide sialique lui-même. Ce qui a été confirmé par l'équipe de Feizi (Yuen *et al*, 1992) en montrant que la E-sélectine reconnaît un mélange équimoléculaire de tétrasaccharides Lewis a et x sulfatés en position du galactose terminal.

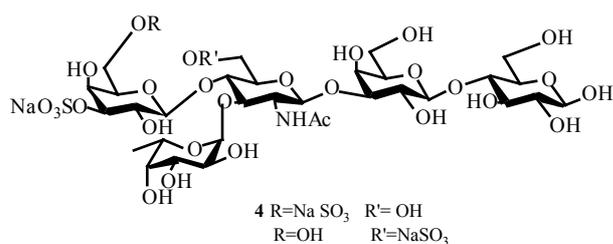
La biodisponibilité des ligands naturels étant faible, la synthèse chimique ou enzymatique est indispensable à la recherche du meilleur candidat possible.

Par exemple, pour la E-sélectine, le meilleur ligand monovalent connu actuellement a été synthétisé dans notre laboratoire. Il s'agit du 3'-sulfoLewis a pentasaccharide (**3**), 50 fois plus actif que (**2**) (Lubineau *et al*, 1994; Yuen *et al*, 1994). Des études RMN et de dynamique moléculaire sur ce composé ont confirmé que le groupement sulfate se positionnait comme le groupement carboxylate de (**2**) (Kogelberg *et al*, 1994).

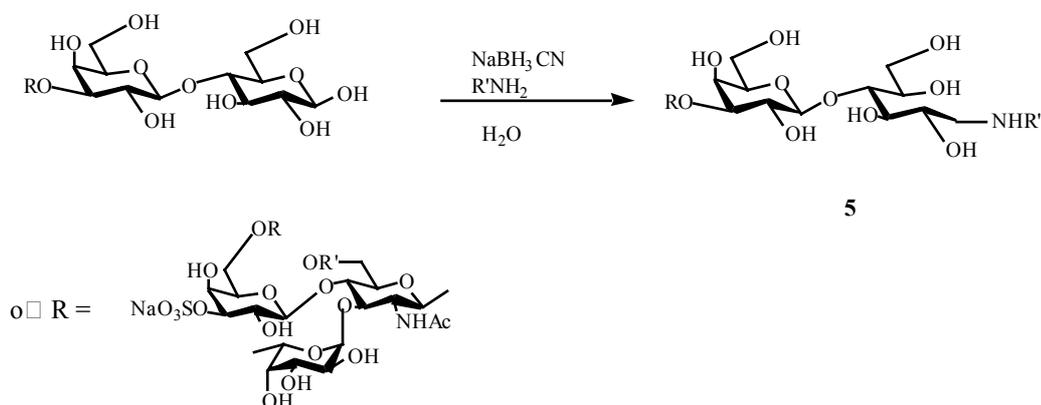


Un tel composé s'est également révélé être un bon ligand de la L-sélectine (Green *et al*, 1995). Une étude ex-vivo dans un système cœur-poumon isolé de rat a confirmé son efficacité dans le syndrome d'ischémie-reperfusion, le rendant bon candidat pour éviter l'œdème pulmonaire, responsable d'une mortalité importante dans la greffe du poumon (Reignier *et al*, 1997).

L'étude du récepteur naturel de la L-sélectine, GlyCAM-1 avait permis de mettre en évidence l'existence d'une structure oligosaccharidique possédant à la fois l'acide sialique et un ou plusieurs groupes sulfates situés sur le résidu Gal terminal ou GlcNAc. Nous avons réalisé la synthèse des deux pentasaccharides Lewis x correspondants contenant chacun deux groupes sulfates, l'un mimant le carboxylate de l'acide sialique et l'autre en position 6 ou 6' sur les résidus GlcNAc ou Gal du pentasaccharide (4). Là, encore il a été montré que ces composés possédaient une meilleure affinité que les composés sialylés correspondants, et qu'ils étaient de bons candidats en tant que ligands de la L-sélectine (Galustian *et al*, 1999).



Les interactions oligosaccharides-lectines sont connues depuis longtemps et comparées aux interactions protéines-protéines qui peuvent être extrêmement fortes, les premières sont faibles. Toutefois, cette faiblesse peut être compensée par la présentation de nombreux motifs oligosaccharidiques regroupés. Nous nous proposons de “ glycaniser ” des fibres synthétiques en y greffant des pentasaccharides synthétisés par voie chimio-enzymatique sur un support dendrimérique soluble (Lubineau *et al*, 2000)(Lubineau A., Malleron A et LeNarvor C., Tet Lett., 2000, 41, 8887-8891). Ces oligosaccharides pourront être introduits après modification par amination réductrice dans un polymère (Koshida *et al*, 2001).



De telles chaînes greffées à la surface des fibres devraient permettre de reproduire l'effet " cluster " existant sur GlyCAM-1 comme cela a déjà été montré par le groupe de Kiessling (Gordon *et al*, 1998). Les résultats obtenus par ce groupe en particulier pour la L-sélectine ont montré qu'une présentation multivalente d'un épitope spécifique entraînait une importante augmentation de l'inhibition en particulier sous des conditions de flux physiologique (Sanders *et al*, 1999).

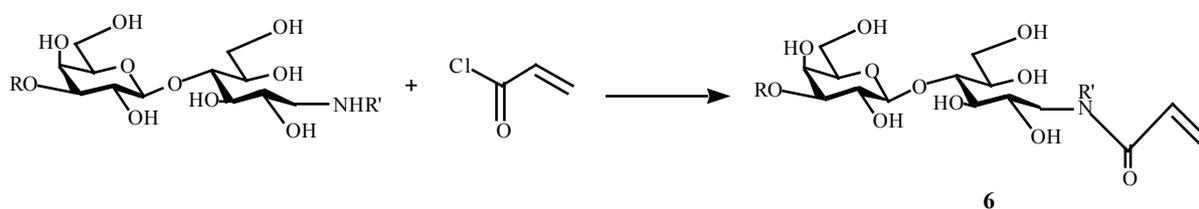
Le but de cette partie du projet est de décrire le greffage du pentasaccharide 3'-sulfoLewisa sur une fibre synthétique. La fibre choisie sera dans un premier temps le polyéthylènetéréphtalate (PET) car c'est ce matériau polymère, utilisé seul, qui a démontré la meilleure capacité d'adsorption des leucocytes lors de la filtration de sang humain. Les autres fibres testées à l'INTS étaient à base de polyimide, polyester, polypropylène, polyvinylalcool et cellulose.

L'incorporation du pentasaccharide dans la fibre de PET sera réalisée en plusieurs étapes : synthèse d'un monomère contenant l'oligosaccharide, création de bouts de

chaînes réactives sur la fibre de PET et enfin greffage de la molécule active sur cette dernière par l'intermédiaire d'une polymérisation en milieu aqueux.

Synthèse d'un monomère polymérisable contenant l'oligosaccharide.

Le 3'-sulfo-Lewisa, après amination de son extrémité réductrice (5), sera incorporé à un monomère d'acrylamide (6).



Activation de la fibre synthétique.

La fibre de PET subira ensuite un traitement d'oxydation à l'ozone permettant la création d'hydroxyperoxydes de polymères (Yamauchi *et al*, 1991). La formation des peroxydes entraîne une diminution de la masse molaire moyenne en poids, M_p , initiale du PET. L'efficacité du traitement d'ozonolysation sera quantifiée par détermination de M_p en utilisant la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) après dissolution des fibres de PET dans un solvant organique approprié.

D'autres traitements permettant la génération d'hydroxydes de polymère pourront être utilisés lors de cette étude tels que l'irradiation UV et la torche à plasma (Kulik *et al*, 1995).

Polymérisation des chaînes

Les peroxydes de PET seront décomposés par effet thermique ($T = 65\text{ °C}$) ou red-ox. Les radicaux créés sur la fibre seront les amorceurs de la réaction de polymérisation radicalaire des chaînes greffées.

La polymérisation radicalaire sera réalisée en présence des monomères d'acrylamide contenant comme substituant le pentasaccharide 3'-sulfo-Lewisa (**6**) et par des monomères d'acrylamide non substitués. La copolymérisation en phase homogène, en utilisant comme amorceur le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), de monomères homologues (acrylamide et acrylamide contenant comme substituant le 3'-sulfo-Lewisx) a été étudiée précédemment par Roy et al (Roy *et al*, 1996). Les glycopolymères synthétisés par ces auteurs possédaient une masse molaire approximative de $1,5 \times 10^5$ g/mol.

La masse molaire des copolymères sera également quantifiée par SEC soit après décrochage du polyacrylamide de la fibre, soit après dissolution de la fibre greffée.

Des études préliminaires de mises au point seront menées en utilisant des lactoses à la place du 3'-sulfo-Lewisa pour des raisons évidentes de coût. La nécessité de présence d'espaceurs entre la chaîne de polymère et l'oligosaccharide ainsi que la longueur de ces espaceurs qui sont généralement constitués d'un enchaînement de groupement méthylènes $(-CH_2)_n$ sera ainsi étudiée.

2.2 Modélisation de l'écoulement dans le filtre

Les problèmes de filtration ont fait l'objet de nombreuses études de mathématiques appliquées (en liaison avec l'industrie pétrolière notamment). La filtration du sang est cependant un problème très spécifique (fluide très complexe, filtration de particules colloïdales, milieu fibreux à porosité élevée,...). Pour aborder graduellement ces difficultés, nous pensons procéder ainsi :

- écrire un premier modèle en utilisant des hypothèses simplificatrices (HS)
- définir des modalités de comparaison avec l'expérience pour paramétrer puis tester un tel modèle
- étudier les moyens de relaxer les HS pour se rapprocher d'un modèle plus réaliste

Domaines d'études reliés

Parmi les milieux poreux, les sols et les roches sont certainement ceux qui ont fait l'objet des plus nombreuses études (Chavent *et al*, 1986; Hornung, 1997).

La différence principale entre ce type de matériaux et les filtres qui nous intéressent est la porosité ; elle est généralement de 10 à 20% dans les sols alors qu'elle est de l'ordre de 80% dans les filtres.

Parmi les questions qui se posent classiquement dans la modélisation des milieux poreux géologiques, certaines sont peut-être pertinentes dans notre cas, par exemple :

- Peut-on modéliser l'adhésion des globules blancs aux fibres comme on modélise l'adsorption d'espèces chimiques dans les sols?

- Doit-on modéliser le fait que le sang sature partiellement/totalement les pores du filtre?
- Les filtres actuellement utilisés sont composés de feuilles, ce qui les apparente peut-être à des milieux à double porosité, c'est-à-dire des milieux poreux traversés par des fractures.

Ces points méritent encore réflexion.

Obtention d'un premier modèle

Commençons par faire un certain nombre d'hypothèses simplificatrices qui vont permettre d'établir un premier modèle.

HS 1. *On se place dans des conditions d'écoulement dans lesquelles le fluide occupe tout l'espace dans le filtre.*

Cela signifie donc en particulier qu'on ne prendra pas en compte la phase transitoire pendant laquelle le filtre se remplit de sang.

HS 2. *Adsorption des leucocytes et écoulement peuvent être découplés.*

En clair, cela signifie que l'écoulement serait le même s'il n'y avait pas de leucocytes; cette hypothèse semble justifiée si la taille des leucocytes est petite devant celle des pores, auquel cas les effets d'encombrement stérique et de colmatage ne jouent pas un rôle prédominant.

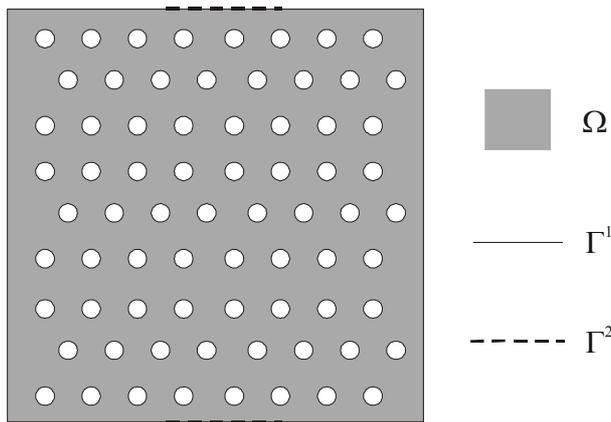
Calcul de l'écoulement

HS 3. *La structure du réseau de fibres n'est pas modifiée par l'écoulement.*

C'est une hypothèse raisonnable lorsque les vitesses d'écoulement sont faibles. Cette condition semble être remplie en pratique.

HS 4. *Le fluide qui transporte les leucocytes est newtonien et incompressible.*

C'est le cas du plasma, mais pas du sang total. Sous les hypothèses (HS 1)-(HS 4), on peut écrire les équations qui régissent l'écoulement; en notant ρ la masse volumique du fluide, μ , sa viscosité dynamique, $u(x, t)$ le champ de vitesse, $p(x, t)$ le champ de pression, on obtient :



$$\left\{ \begin{array}{l} \operatorname{div} u = 0 \quad \text{dans } \Omega_r \\ \rho \left(\frac{\partial u}{\partial t} + (u \cdot \nabla) u \right) = -\nabla p + \mu \Delta u + f \quad \text{dans } \Omega_r \\ u = 0 \quad \text{dans } \Gamma_T^1 \\ (-p + \mu(\nabla u + \nabla u^T))n = g \quad \text{dans } \Gamma^2 \end{array} \right.$$

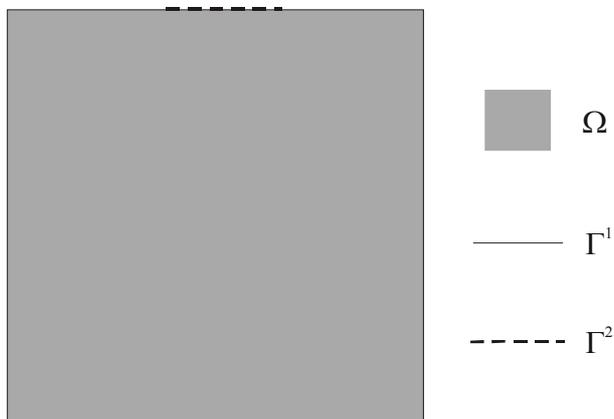
Les forces extérieures f se réduisent pour les filtres standards aux forces de gravitation. Les conditions au bord à l'entrée et à la sortie du filtre (i.e. sur Γ^2) dépendent du mode d'utilisation du filtre. Comme les vitesses d'écoulement sont faibles, on pourra les calculer par un simple argument d'hydrostatique.

HS 5. Le réseau des fibres peut se modéliser par un milieu poreux localement périodique qui conduit à la loi de Darcy après homogénéisation.

Cette hypothèse signifie :

1. qu'on n'a pas besoin de connaître le détail de la disposition des fibres et d'effectuer une simulation numérique sur la totalité du filtre à une échelle microscopique pour calculer l'écoulement macroscopique ; on peut par changement d'échelle se ramener à un modèle d'écoulement macroscopique *homogénéisé* dans lequel on ne « voit » plus les fibres individuelles ; il est des cas pour lesquels on sait effectuer mathématiquement ce changement d'échelle et déduire l'expression mathématique du modèle homogénéisé à partir du modèle microscopique (Hornung, 1997) ;
2. que le réseau des fibres a une structure microscopique telle que le résultat de l'homogénéisation conduit à la loi de Darcy, qui est l'équation la plus utilisée pour la modélisation des milieux poreux.

Sous ces hypothèses



$$\left\{ \begin{array}{l} \operatorname{div} \mathbf{u} = \mathbf{0} \text{ dans } \Omega \\ -\nabla p + M\mathbf{u} + \mathbf{f} = \mathbf{0} \text{ dans } \Omega \\ \mathbf{u} \cdot \mathbf{n} = 0 \text{ dans } \Gamma^1 \\ p \cdot \mathbf{n} = g \text{ dans } \Gamma^2 \end{array} \right.$$

où $M(sr)$ est un champ de tenseurs symétriques dont les coefficients peuvent être calculés à partir d'un calcul à l'échelle microscopique.

Calcul de l'adhésion

Sous les (HS 1)-(HS 5), l'adsorption des leucocytes est modélisée par une équation du type :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla c - \operatorname{div}(\mathbf{A}(\mathbf{u}) \nabla c) = F$$

Le terme $\mathbf{u} \cdot \nabla c$ correspond au transport à la vitesse moyenne (homogénéisée) \mathbf{u} ; le terme, dit de dispersion, $-\operatorname{div}(\mathbf{A}(\mathbf{u}) \nabla c)$ résulte de l'homogénéisation et correspond grosso modo à un transport par les fluctuations de vitesse par rapport à la vitesse moyenne \mathbf{u} . Il reste enfin à modéliser le terme source. On peut pour commencer faire l'hypothèse

HS 6. L'adhésion des leucocytes est régie par une loi d'action de masse du type

$$F = -\lambda(\mathbf{u})c\sigma$$

où $\sigma(x, t)$ désigne la densité volumique de sites libres sur les fibres, qui elle-même vérifie l'équation

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\lambda(\mathbf{u})c\sigma$$

On obtient finalement le système

$$\left\{ \begin{array}{l} \operatorname{div} u = 0 \text{ dans } \Omega \\ -\nabla p + Mu + f = 0 \text{ dans } \Omega \\ u \cdot n = 0 \text{ dans } \Gamma^1 \\ p \cdot n = g \text{ dans } \Gamma^2 \\ \frac{\partial c}{\partial t} + u \cdot \nabla c - \operatorname{div}(A(u) \nabla c) = -\lambda(u) c \sigma \text{ dans } \Omega \\ \frac{\partial c}{\partial t} = -\lambda(u) c \sigma \text{ dans } \Omega \end{array} \right.$$

Si on parvient effectivement à calculer les tenseurs A et M par homogénéisation, la seule grandeur à paramétrer sera la fonction $A(u)$; cela pourra se faire soit par assimilation de données expérimentales, soit par une étude plus fine des mécanismes d'adhésion.

Relaxation des hypothèses simplificatrices

Relaxation de HS1.

Voir les références sur les écoulements en milieu poreux non saturés.

Relaxation de HS2.

Il semble que les effets de colmatage pourraient être pris en compte relativement facilement dans le modèle.

Relaxation de HS3.

En raison des faibles vitesses d'écoulement, cette hypothèse est très réaliste lorsque le sang occupe tout le filtre; dans la période transitoire pendant laquelle le filtre se remplit de sang, elle pourra éventuellement être remise en cause.

Relaxation de HS4.

Il est possible que le caractère non-newtonien du sang puisse être représenté dans une certaine mesure par des lois de comportements macroscopiques qu'on saura homogénéiser, mais ce point reste à démontrer. Sinon, il faudra avoir recours à des modèles micro-macro.

Relaxation de HS5.

La question du calcul des tenseurs de perméabilité M' et de dispersion A pour des milieux fibreux désordonnés est certainement un point difficile et semble être d'actualité puisqu'elle a motivé plusieurs études récentes (Clague *et al*, 1997; Howells, 1998; Feng *et al*, 1999). En raison de la forte porosité des filtres (de l'ordre de 80%), il est possible que les équations homogénéisées modélisant l'écoulement soient plus semblables aux équations de Brinkman qu'à celles de Darcy (Levy, 1983).

Relaxation de HS6.

Une meilleure connaissance des mécanismes d'adhésion pourra permettre d'affiner la modélisation de la cinétique de ce processus.

Optimisation du filtre

L'objectif est maintenant d'utiliser le modèle homogénéisé ci-dessus (ou un modèle plus sophistiqué obtenu en relaxant certaines hypothèses simplificatrices) pour optimiser le filtre. La méthode pour ce faire est la suivante :

1. identifier des paramètres (p_1, \dots, p_n) par rapport auxquels on va optimiser ;
2. associer à chaque jeu de paramètres (p_1, \dots, p_n) une évaluation chiffrée des

performances du filtre correspondant (un nombre $J(p, \dots, p, \sim)$ qui sera d'autant plus petit que le filtre est bon);

3. utiliser un algorithme d'optimisation pour trouver le minimum de la fonction J .

Dans le langage des mathématiques appliquées, la fonction J est appelée le critère.

Dans le cadre qui nous intéresse, un choix naturel consiste à prendre comme critère le nombre de leucocytes qui sont passés à travers le filtre. Comme paramètres, on pourra prendre par exemple :

- les caractéristiques géométriques du filtre,
- les valeurs des coefficients des tenseurs \mathcal{A} et M en des points représentatifs du filtre.

On sait à l'heure actuelle optimiser des fonctions comportant un très grand nombre de paramètres (plusieurs milliers).

Paramétrisation du modèle. Comparaisons avec l'expérience

Les expériences effectuées au laboratoire de Biologie Vasculaire et Cellulaire permettraient de valider ou d'invalider un tel modèle dans deux situations :

- situation réaliste où on filtre du sang total
- situation académique où on filtre une solution ne contenant que des globules blancs

Outre les résultats expérimentaux déjà disponibles (Barbe *et al*, 2000; Barbe *et al*, 2001), il nous paraîtrait intéressant d'avoir accès à des données plus locales en temps et en espace :

- évolution en fonction du temps du nombre de leucocytes qui traversent le filtre;

- densité de leucocytes ayant adhéré aux fibres en fonction de la position spatiale dans le filtre et de l'orientation des fibres

Chapitre 6

B I B L I O G R A P H I E

1. Absolom D., Zingg W. and Neumann A., Protein adsorption to polymer particles : role of surface properties, *J Biomed Mater Res*, 1987, 21, 161-171
2. Absolom D., Zingg W., Thomson C., et al., Erythrocyte adhesion to polymer surfaces, *J Colloid Interface Sci*, 1985, 104, 51-59
3. Absolom D. R., Thomson C., Hawthorn L. A., et al., Kinetics of cell adhesion to polymer surfaces, *J Biomed Mater Res*, 1988, 22, 3, 215-29
4. Adams R., Evans S., Kooshesh F., et al., The effects of temperature on the filtration of diluted blood through 3 μm and 5 μm filters, *Biorheology*, 1995, 32, 6, 643-653
5. Aigner S., Ramos C. L., Hafezi_Moghadam A., et al., CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin., *FASEB J*, 1998, 12, 12, 1241-51
6. Alcorta I., Pereira A., Sanz C., et al., Influence of the red blood cell preparation method on the efficacy of a leukocyte reduction filter, *Vox Sang*, 1996, 71, 2, 78-83
7. Altieri D. C., Bader R., Mannucci P. M., et al., Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen., *J Cell Biol*, 1988, 107, 5, 1893-900

8. Anderson D. C. and Springer T. A., Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins., *Annu Rev Med*, 1987, 38, 175-94
9. Arnaout M., Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18, *Blood*, 1990, 75, 1037-1050
10. Barbe L., Boval B., Wautier M. P., et al., Human promyelocytic cell line: a convenient tool for studying the molecular basis of WBC filtration, 2000, 40, 10, 1250-1256
11. Barbe L., Boval B., Wautier M. P., et al., An *in vitro* system for testing leucocyte and leukaemic cell line adhesion to filter fibres, *Br J Haematol*, 2001, 115, ...
12. Beaujean F., Segier J., le Forestier C., et al., Leukocyte depletion of red cell concentrates by filtration : influence of blood product temperature, 1992, 62, 242-243
13. Bellón T., López-Rodríguez C., Rubio M. A., et al., Regulated expression of p150,95 (CD11c/CD18; alpha X/beta 2) and VLA-4 (CD49d/CD29; alpha 4/beta 1) integrins during myeloid cell differentiation, *Eur J Immunol*, 1994, 24, 1, 41-7
14. Berg E. L., Magnani J., Warnock R. A., et al., Comparison of L-selectin and E-selectin ligand specificities: the L-selectin can bind the E-selectin ligands sialyl Le(x) and sialyl Le(a)., *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 184, 2, 1048-55
15. Berlin C., Bargatze R. F., Campbell J. J., et al., alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow, *Cell*, 1995, 80, 3, 413-22
16. Bessis M. : Cellules du sang normales et pathologiques. Masson, Paris, 1972.-p. 423-428

17. Brackman D., Lund-Johansen F. and Aarskog D., Expression of leukocyte differentiation antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: comparison with the maturation of normal monocytic and granulocytic bone marrow cells, *J Leukoc Biol*, 1995, 58, 5, 547-55
18. Brackman D., Lund-Johansen F. and Aarskog D., Expression of cell surface antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, retinoic acid and DMSO, *Leuk Res*, 1995, 19, 1, 57-64
19. Brittinger T. E. and Chaplin H. j., Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets, *J Am Med Ass*, 1957, 165, 819-25
20. Bruil A., Beugeling T., Feijen J., et al., The mechanisms of leukocyte removal by filtration, *Transfus Med Rev*, 1995, 9, 2, 145-166
21. Bruil A., Brenneisen L. M. and Terlingen J. G. A., In vitro leukocyte adhesion to modified polyurethane surfaces II Effect of wettability, *J Colloid Interface Sci*, 1994a, 165, 72-81
22. Bruil A., Oosterom H. A., Steneker I., et al., Poly(ethyleneimine) modified filters for the removal of leukocytes from blood, *J Biomed Mater Res*, 1993, 27, 10, 1253-68
23. Bruil A., Sheppard J. I., Feijen J., et al., In vitro leukocyte adhesion to modified polyurethane surfaces: III. Effect of flow, fluid medium, and platelets on PMN adhesion, *J Biomater Sci Polym Ed*, 1994, 5, 4, 263-77
24. Bruil A., Sheppard J. I., Feijen J., et al., In vitro leukocyte adhesion to modified polyurethane surfaces: III. Effect of flow, fluid medium, and platelets on PMN adhesion., *J Biomater Sci Polym Ed*, 1994b, 5, 4, 263-77

25. Bruil A., Terlingen J. G., Beugeling T., et al., In vitro leucocyte adhesion to modified polyurethane surfaces. I. Effect of ionizable functional groups., *Biomaterials*, 1992, 13, 13, 915-23
26. Brunk D. K., Goetz D. J. and Hammer D. A., Sialyl Lewis(x)/E-selectin-mediated rolling in a cell-free system, *Biophys J*, 1996, 71, 5, 2902-7
27. Brunk D. K. and Hammer D. A., Quantifying rolling adhesion with a cell-free assay: E-selectin and its carbohydrate ligands, *Biophys J*, 1997, 72, 6, 2820-33
28. Callaerts A. J., Gielis M. L. and Sprengers E. D., The mechanism of white cell reduction by synthetic fiber cell filters, *Transfusion*, 1992, 33, 2, 134-138
29. Carlos T. and Harlan J., Leukocyte-endothelial adhesion molecules, *Blood*, 1994, 84, 7, 2068-2101
30. Chavent G. and Jaffré J., Mathematical models and finite elements for reservoir simulation single phase, multiphase and multicomponent flows through porous media, 1986,
31. Chenoweth D., Complement Activation in Extracorporeal Circuits, *Ann NY Acad Sci*, 1987, 516, 306-313
32. Chien S., The Microcirculatory Society Eugene M. Landis Award lecture. Role of blood cells in microcirculatory regulation., *Microvasc Res*, 1985, 29, 2, 129-51
33. Chien S., Schmalzer E. and Lee M., Role of white blood cells in filtration of blood cell suspensions, *Biorheology*, 1983, 20, 011-27

34. Clague D. S. and Phillips R. J., A numerical calculation of the hydraulic permeability of the three-dimensional disordered fibrous media, *Phys Fluid*, 1997, 2, 6, 1562-1572
35. Clark R. S., Carlos T. M., Schiding J. K., et al., Antibodies against Mac-1 attenuate neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats, *J Neurotrauma*, 1996, 13, 6, 333-41
36. Comolet R. Rhéologie du sang. In : *Biomécanique circulatoire*. Masson, Paris, 1984.-p. 54-67
37. Cooke B. M., Usami S., Perry I., et al., A simplified method for culture of endothelial cells and analysis of adhesion of blood cells under conditions of flow, *Microvasc Res*, 1993, 45, 1, 33-45
38. Crowley J. P., Wade P. H., Wish C., et al., The purification of red cells for transfusion by freeze-preservation and washing. V. Red cell recovery and residual leukocytes after freeze-preservation with high concentrations of glycerol and washing in various systems., *Transfusion*, 1977, 17, 1, 1-7
39. Curtis A. S., Forrester J. V., McInnes C., et al., Adhesion of cells to polystyrene surfaces, *J Cell Biol*, 1983, 97, 5 Pt 1, 1500-6.
40. Dausset J., Fonseca A. and Brecy H., Elimination de certains chocs transfusionnels par l'utilisation de sang appauvri en leucocytes, *Vox Sang*, 1957, 2, 248-56
41. Dausset J. and Rapaport F. T., Transplantation antigen activity of human blood platelets., *Transplantation*, 1966, 4, 2, 182-93

42. Davey R. J., Carmen R. A., Simon T. L., et al., Preparation of white cell-depleted red cells for 42-day storage using an integral in-line filter, *Transfusion*, 1989, 29, 6, 496-9.

43. de_Fougerolles A. R. and Springer T. A., Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes., *J Exp Med*, 1992, 175, 1, 185-90

44. de_Fougerolles A. R., Stacker S. A., Schwarting R., et al., Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1., *J Exp Med*, 1991, 174, 1, 253-67

45. Diamond M. S., Staunton D. E., Marlin S. D., et al., Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation., *Cell*, 1991, 65, 6, 961-71

46. Diepenhorst P., Sprokholt R. and Prins H. K., Removal of leukocytes from whole blood and erythrocyte suspensions by filtration through cotton wool. I. Filtration technique., *Vox Sang*, 1972, 23, 4, 308-20

47. Dietz L. J., Dubrow R. S., Manian B. S., et al., Volumetric capillary cytometry: a new method for absolute cell enumeration., *Cytometry*, 1996, 23, 3, 177-86

48. Djerassi I., Kim J. S., Suvansri U., et al., Continuous flow filtration--leukopheresis., *Transfusion*, 1972, 12, 2, 75-83

49. Dowbenko D., Andalibi A., Young P. E., et al., Structure and chromosomal localization of the murine gene encoding GLYCAM 1. A mucin-like endothelial ligand for L selectin., *J Biol Chem*, 1993, 268, 6, 4525-9

50. Durig J., Giese A., Schulz-Schaeffer W., et al., Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes, *Br J Haematol*, 2000, 108, 3, 488-95
51. Dykes A., Smallwood D., Kotsimbos T., et al., Transfusion-related acute lung injury (TrALI) in a patient with a single lung transplant, *Br J Haematol*, 2000, 109, 3, 674-6
52. Dzik S., Leukodepletion blood filter : Filter design and mechanism of leukocyte removal, *Transfus Med Rev*, 1993, 7, 2, 65-77
53. Dzik S., Moroff G. and Dumont L., A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte hemocytometry, flow cytometry, and microfluorometry, *Transfusion*, 2000, 40, 5, 513-20
54. Dzik W., Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria, *Immunol Invest*, 1995, 24, 95-115
55. Edelman M., Potter P., Mahaffey K., et al., The potential for reintroduction of tumor cells during intraoperative blood salvage: reduction of risk with use of the RC-400 leukocyte depletion filter, *Urology*, 1996, 47, 2, 179-181
56. English D. and Andersen B. R., Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque, *J Immunol Methods*, 1974, 5, 3, 249-52
57. Erzurum S. C., Kus M. L., Bohse C., et al., Mechanical properties of HL60 cells: role of stimulation and differentiation in retention in capillary-sized pores, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1991, 5, 3, 230-41

- 58.** Feng J. and Weinbaum S., A model for flow through a planar orifice in a fiber-filled medium with application to fenestral pores in biological tissue., *J Fluid Mech* (soumis), 1999,
- 59.** Fleming A., A simple method of removing leucocytes from blood, *Br J Exp Pathol*, 1926, 7, 281-286
- 60.** Forrester J. and Lackie J., Adhesion of neutrophil leucocytes under conditions of flow, *J Cell Sci*, 1984, 70, 93-110
- 61.** Foxall C., Watson S. R., Dowbenko D., et al., The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide., *J Cell Biol*, 1992, 117, 4, 895-902
- 62.** Franklin W., Glaspy P., Pflaumer S., et al., Incidence of Tumor-Cell Contamination in Leukapheresis Products of Breast Cancer Patients Mobilized With Stem Cell Factor and Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) or With G-CSF Alone, *Blood*, 1999, 94, 1, 340-347
- 63.** Furukawa K. S., Ushida T., Sugano H., et al., Effect of shear stress on platelet adhesion to expanded polytetrafluoroethylene, a silicone sheet, and an endothelial cell monolayer., *ASAIO J*, 2000, 46, 6, 696-701
- 64.** Galustian C., Lubineau A., le_Narvor C., et al., L-selectin interactions with novel mono- and multisulfated Lewisx sequences in comparison with the potent ligand 3'-sulfated Lewisia., *J Biol Chem*, 1999, 274, 26, 18213-7
- 65.** Garvin J. E., Factors affecting the adhesiveness of human leukocytes and platelets in vitro, *J Exp Med*, 1961, 114, 51-73
- 66.** Goldsmith H. L. and Spain S., Margination of leukocytes in blood flow through small tubes., *Microvasc Res*, 1984, 27, 2, 204-22

67. Gopalan P. K., Smith C. W., Lu H., et al., Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin, *J Immunol*, 1997, 158, 1, 367-75
68. Gordon E. J., Sanders W. J. and Kiessling L. L., Synthetic ligands point to cell surface strategies., *Nature*, 1998, 392, 6671, 30-1
69. Green P. J., Yuen C. T., Childs R. A., et al., Further studies of the binding specificity of the leukocyte adhesion molecule, L-selectin, towards sulphated oligosaccharides--suggestion of a link between the selectin- and the integrin-mediated lymphocyte adhesion systems., *Glycobiology*, 1995, 5, 1, 29-38
70. Greenberg A. W., Brunk D. K. and Hammer D. A., Cell-free rolling mediated by L-selectin and sialyl Lewis(x) reveals the shear threshold effect., *Biophys J*, 2000, 79, 5, 2391-402
71. Greenwalt T., Gajewski M. and McKenna J., A new method for preparing buffy coat-poor blood, *Transfusion*, 1962, 2, 221-229
72. Grinnel F., Cellular adhesiveness and extracellular substrata, *Int Rev Cytology*, 1978, 53, 65-144
73. Guidoin R., Taylor K. and Bain W. H., Blood filter evaluation., *Biomater Med Devices Artif Organs*, 1977, 5, 4, 317-33
74. Hamburger S. and McEver R., GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils, *Blood*, 1990, 75, 3, 550-554

75. Hammer D. A. and Apte S. M., Simulation of cell rolling and adhesion on surfaces in shear flow: general results and analysis of selectin-mediated neutrophil adhesion, *Biophys J*, 1992, 63, 1, 35-57
76. Handa K., Nudelman E. D., Stroud M. R., et al., Selectin GMP-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le(a) and sialosyl-Le(x), and sulfated glycans modulate this binding., *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 181, 3, 1223-30
77. Hickstein D., Smith A. and Fisher W., Expression of leukocyte adherence-related glycoproteins during differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells, *J Immunol*, 1987, 138, 2, 513-519
78. Hornung U., Homogenization and porous media, 1997,
79. Howells I. D., Drag on fixed beds of fibres in slow flow, *J Fluid Mech*, 1998, 355, 163-192
80. Hynes R. O., Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, 1992, 69, 1, 11-25.
81. Janetzko K., Schlenke P. and Kluter H., The flow rate significantly influences the leukocyte depletion rate during prestorage in-line filtration of platelet concentrates, *Transfus Sci*, 1999, 21, 2, 123-8
82. Kazatchkine M. and Carreno M., Activation of the complement system at the interface between blood and artificial surfaces, *Biomaterials*, 1988, 9, 30-35
83. Ketley N. J., Allen P. D., Kelsey S. M., et al., Modulation of idarubicin-induced apoptosis in human acute myeloid leukemia blasts by all-trans retinoic acid, 1,25(OH)₂ vitamin D₃, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood*, 1997, 90, 11, 4578-87

- 84.** Kikugawa K. and Minoshima K., Filter columns for preparation of leukocyte-poor blood for transfusion, *Vox Sang*, 1978, 34, 5, 281-90.
- 85.** Klein M. A., Frigg R., Flechsig E., et al., A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie., *Nature*, 1997, 390, 6661, 687-90
- 86.** Kogelberg H. and Rutherford T. J., Studies on the three-dimensional behaviour of the selectin ligands Lewis(a) and sulphated Lewis(a) using NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations., *Glycobiology*, 1994, 4, 1, 49-57
- 87.** Kongsgaard U., Wang M. and Kvalheim G., Leucocyte depletion filter removes cancer cells in human blood, *Acta Anaesthesiol Scand*, 1996, 40, 1, 118-120
- 88.** Koshida S., Suda Y., Arano A., et al., An efficient method for the assembly of sulfated oligosaccharides using reductive amination., *Tet Lett*, 2001, 42, 1293-1296
- 89.** Kulik E. A., Ivanchenko M. I., Kato K., et al., Peroxide generation and decomposition on polymer surface., *J Polym Science. Part A Polym Chem*, 1995, 33, 323-330
- 90.** Kwekkeboom J., Buurman D. E., Ploemacher R. E., et al., A nylon wool filter coated with human immunoglobulin for rapid depletion of monocytes and myeloid cells from peripheral blood stem cell transplants, *Exp Hematol*, 1998, 26, 5, 400-8
- 91.** Lalor P. and Nash G. B., Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets, *Br J Haematol*, 1995, 89, 4, 725-32
- 92.** Lang E. V., Lang J. H. and Lasser E. C., Adherence of granulocytes to nylon fibers. Evidence for a plasma granulocyte adherence factor, *Thromb Res*, 1988, 50, 1, 243-8

- 93.** Larsen E., Celi A. and Gilbert G., PADGEM Protein: A Receptor That Mediates the Interaction of Activated Platelets with Neutrophils and Monocytes, *Cell*, 1989, 59, 305-312
- 94.** Larsen E., Palabrica T., Sajer S., et al., PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15), *Cell*, 1990, 63, 3, 467-74
- 95.** Lawrence M., McIntire L. and Eskin S., Effect of Flow on Polymorphonuclear Leukocyte/Endothelial Cell Adhesion, *Blood*, 1987, 70, 5, 1284-1290
- 96.** Lawrence M. B., Kansas G. S., Kunkel E. J., et al., Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E) [published erratum appears in *J Cell Biol* 1997 Apr 7;137(1):261], *J Cell Biol*, 1997, 136, 3, 717-27
- 97.** Ledent E. and Berlin G., Factors influencing white cell removal from red cell concentrates by filtration, *Transfusion*, 1996, 36, 8, 714-8
- 98.** Lei X., Lawrence M. B. and Dong C., Influence of cell deformation on leukocyte rolling adhesion in shear flow., *J Biomech Eng*, 1999, 121, 6, 636-43
- 99.** Levy T., Fluid flow through an array of fixed particles, *Int J Engng Sci*, 1983, 21, 1, 11-23
- 100.** Lim F. and Cooper S., The effect of surface hydrophilicity on biomaterial-leukocyte interactions, *Am Soc Artif Intern Organs Trans*, 1991, 37, M146-M147
- 101.** Lindmark K. and Engstrom K., Analysis of flow acceleration during erythrocyte filtration: dependence of hematocrit and cell rigidity, 1996, 33, 4 & 5, 379-395

- 102.** Lioté F., Boval-Boizard B., Weill D., et al., Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release, *Clin Exp Immunol*, 1996, 106, 1, 13-9
- 103.** Loos J. A. and Wautier J. L., Leukocyte depletion: a biotechnical transfusion story, *Transfus Clin Biol*, 1998, 5, 1, 64-79
- 104.** Lower R., The method observed in transfusing the blood out of one animal into another, *Philos Trans*, 1666, 2, 353-358
- 105.** Lubineau A., Le_Gallic J. and Lemoine R., First synthesis of the 3'-sulfated Lewis(a) pentasaccharide, the most potent human E-selectin ligand so far., *Bioorg Med Chem*, 1994, 2, 11, 1143-51
- 106.** Lubineau A., Malleron A. and LeNarvor C., Chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides using a dendritic soluble support., *Tet Lett*, 2000, 41, 8887-8891
- 107.** MacGregor I., Hope J., Barnard G., et al., Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components., *Vox Sang*, 1999, 77, 2, 88-96
- 108.** Maluf M., The history of blood transfusion, *J Hist Med*, 1954, 2, 59-107
- 109.** Meryman H. T., Transfusion-induced alloimmunization and immunosuppression and the effects of leukocyte depletion., *Transfus Med Rev*, 1989, 3, 3, 180-93
- 110.** Miller G., Ramsden C. and Primrose J., Autologous transfusion : an alternative to transfusion with banked blood during surgery for cancer, *Br J Surg*, 1991, 78, 713-715

- 111.** Moore K., Stults N. and Diaz S., Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells, *J Cell Biol*, 1992, 118, 445-456
- 112.** Morley D. and Feuerstein I., Adhesion of polymorphonuclear leukocytes to protein-coated and platelet adherent surfaces, *Thromb Haemost*, 1989, 62, 3, 1023-1028
- 113.** Müller-Eberhard H., Molecular organization and function of the complement system, *Ann Rev Biochem*, 1988, 57, 321-347
- 114.** Murata T., Effects of sedimentation of small red blood cell aggregates on blood flow in narrow horizontal tubes, *Biorheology*, 1996, 33, 3, 267-283
- 115.** Muylle L., Joos M., Wouters E., et al., Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions., *Transfusion*, 1993, 33, 3, 195-9
- 116.** Myones B. L., Dalzell J. G., Hogg N., et al., Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3., *J Clin Invest*, 1988, 82, 2, 640-51
- 117.** Nakamura Y., Ando K., Muguruma Y., et al., Enrichment of lineage-CD34- cells using a newly developed filter system, *Br J Haematol*, 2000, 108, 4, 801-4.
- 118.** Neumann A., Absolom D. and Francis D., Measurement of surface tensions of blood cells and proteins, *Ann NY Acad Sci*, 1983, 416, 276-298
- 119.** Nishimura T., Kuroda T. and Mizoguchi Y. Advanced methods for leukocyte removal by blood filtration. In : *The role of leukocyte depletion in blood transfusion practice*. Blackwell Scientific, Oxford, Angleterre, 1989.-p. 35-40

120. Nortamo P., Patarroyo M., Kantor C., et al., Immunological mapping of the human leucocyte adhesion glycoprotein gp90 (CD18) by monoclonal antibodies, *Scand J Immunol*, 1988, 28, 5, 537-46
121. Noti J. D., Johnson A. K. and Dillon J. D., Structural and functional characterization of the leukocyte integrin gene CD11d. Essential role of Sp1 and Sp3., *J Biol Chem*, 2000, 275, 12, 8959-69
122. Opelz G., Sengar D. P., Mickey M. R., et al., Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants., *Transplant Proc*, 1973, 5, 1, 253-9
123. Patarroyo M., Prieto J., Rincon J., et al., Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology., *Immunol Rev*, 1990, 114, 67-108
124. Pedrinaci S., Huelin C., Patarroyo M., et al., Studies on CD11a and CD18 molecules with two new monoclonal antibodies: differential myelomonocytic antigen expression of PMA treated HL60 and U937 cell lines, *Hybridoma*, 1989, 8, 1, 13-23
125. Perini F., Vidal R., Ghetti B., et al., PrP27-30 is a normal soluble prion protein fragment released by human platelets, *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 223, 3, 572-7
126. Phillips M. L., Nudelman E., Gaeta F. C., et al., ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex., *Science*, 1990, 250, 4984, 1130-2
127. Pietersz R., Steneker I. and Reesink H., Comparison of five different filters for the removal of leukocytes from red cell concentrates, *Vox Sang*, 1992, 62, 76-81
128. Poncelet P., George F., Papa S., et al., Quantitation of hemopoietic cell antigens in flow cytometry, *Eur J Histochem*, 1996, 40 Suppl 1, 15-32

129. Popovsky M. A., Transfusion and lung injury., *Transfus Clin Biol*, 2001, 8, 3, 272-7
130. Postigo A. A., Corbi A. L., Sanchez_Madrid F., et al., Regulated expression and function of CD11c/CD18 integrin on human B lymphocytes. Relation between attachment to fibrinogen and triggering of proliferation through CD11c/CD18., *J Exp Med*, 1991, 174, 6, 1313-22
131. Rainger G. E., Buckley C., Simmons D. L., et al., Cross-talk between cell adhesion molecules regulates the migration velocity of neutrophils, *Curr Biol*, 1997, 7, 5, 316-25
132. Rasp F. L., Clawson C. C. and Repine J. E., Platelets increase neutrophil adherence in vitro to nylon fiber, *J Lab Clin Med*, 1981, 97, 6, 812-9
133. Reignier J., Sellak H., Lemoine R., et al., Prevention of ischemia-reperfusion lung injury by sulfated Lewis(a) pentasaccharide. The Paris-Sud University Lung Transplantation Group., *J Appl Physiol*, 1997, 82, 4, 1058-63
134. Report D. N. V., Assessment of the risk of exposure to vCJD infectivity in blood products for the Spongiform Encephalopathy Advisory Committee and the (UK) Department of Health., 1999,
135. Rodgers S. D., Camphausen R. T. and Hammer D. A., Sialyl Lewis(x)-mediated, PSGL-1-independent rolling adhesion on P-selectin., *Biophys J*, 2000, 79, 2, 694-706
136. Rosmarin A. G., Weil S. C., Rosner G. L., et al., Differential expression of CD11b/CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation, *Blood*, 1989, 73, 1, 131-6

- 137.** Roy R., Park W. K. C., Srivastava O. P., et al., Combined glycomimetic and multivalent strategies for the design of potent selectin antagonists., *Bioorganic & Medicinal Letters*, 1996, 6, 1399-1402
- 138.** Sackstein R. and Dimitroff C. J., A hematopoietic cell L-selectin ligand that is distinct from PSGL-1 and displays N-glycan-dependent binding activity., *Blood*, 2000, 96, 8, 2765-74
- 139.** Sako D., Chang X. J., Barone K. M., et al., Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin., *Cell*, 1993, 75, 6, 1179-86
- 140.** Sanders W. J., Gordon E. J., Dwir O., et al., Inhibition of L-selectin-mediated leukocyte rolling by synthetic glycoprotein mimics., *J Biol Chem*, 1999, 274, 9, 5271-8
- 141.** Sasakawa S., Miyamoto M. and Ishikawa Y. The use of Sepacell PL for platelet concentrates. In : *The role of leukocyte depletion in blood transfusion practice*. Blackwell Scientific, Oxford, Angleterre, 1989.-p. 56-63
- 142.** Schmidt R. Comportement des matériaux dans les milieux biologiques. In : *Traité des matériaux*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, 1999.-p. 166-173
- 143.** Shimizu T., Mizuno S., Yamaguchi H., et al., Filtration through a polyester white cell-reduction filter of plasma-poor platelet concentrates prepared with an acetate-containing additive solution, *Transfusion*, 1993, 33, 9, 730-4
- 144.** Skalak R., Hanss M. and Chien S., Indices of filterability of red blood cell suspensions, *Biorheology*, 1983, 20, 3, 311-316

- 145.** Skalak R., Soslowsky L. and Schmalzer E., Theory of filtration of mixed blood suspensions, *Biorheology*, 1987, 24, 35-52
- 146.** Smith J. D., Leitman S. F., Janetzko K., et al., Filtration of RBC units:effect of storage time and temperature on filter performance
The flow rate significantly influences the leukocyte depletion rate during prestorage in-line filtration of platelet concentrates
Update on leucocyte depletion of blood components by filtration, 2000, 40, 5, 521-6.
- 147.** Springer T. A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration, *Annu Rev Physiol*, 1995, 57, 827-72
- 148.** Springer T. A., Miller L. J. and Anderson D. C., p150,95, the third member of the Mac-1, LFA-1 human leukocyte adhesion glycoprotein family., *J Immunol*, 1986, 136, 1, 240-5
- 149.** Srinivasan R. and Ruckenstein E., Kinetically caused saturation in the deposition of particles or cells, *J Colloid Interface Sci*, 1981, 79, 390-398
- 150.** Steneker I. and Biewenga J., Histological and immunohistochemical studies on the preparation of leukocyte-poor red cell concentrates by filtration: the filtration process on cellulose acetate fibers., *Vox Sang*, 1990, 58, 3, 192-8
- 151.** Steneker I. and Biewenga J., Histologic and immunohistochemical studies on the preparation of white cell-poor red cell concentrates : the filtration processes using three different polyester filters, *Transfusion*, 1991, 31, 1, 40-46
- 152.** Steneker I., Pietersz R. N. and Reesink H. W., Leukocyte filtration mechanisms. Factors influencing the removal of infectious agents from red cell concentrates, *Immunol Invest*, 1995, 24, 1-2, 87-93

- 153.** Steneker I., Prins H., Florie M., et al., Mechanisms of white cell reduction in red cell concentrates by filtration : the effect of the cellular composition of the red cell concentrates, *Transfusion*, 1992, 33, 1, 42-50
- 154.** Steneker I., Van L., MJA, Van W., PB, et al., Electronmicroscopic examination of white cell reduction by four white cell-reduction filters, *Transfusion*, 1992, 32, 450-457
- 155.** Stone P. C. and Nash G. B., Conditions under which immobilized platelets activate as well as capture flowing neutrophils, *Br J Haematol*, 1999, 105, 2, 514-22
- 156.** Szufiad P. and Dzik W., A general method for concentrating blood samples in preparation for counting very low numbers of white cells, *Transfusion*, 1997, 37, 3, 277-283
- 157.** Tegoulia V. A. and Cooper S. L., Leukocyte adhesion on model surfaces under flow: effects of surface chemistry, protein adsorption, and shear rate., *J Biomed Mater Res*, 2000, 50, 3, 291-301
- 158.** Thompson N. L. and Lagerholm B. C., Total internal reflection fluorescence: applications in cellular biophysics, *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8, 1, 58-64
- 159.** Todd R. F. d., Griffin J. D., Ritz J., et al., Expression of normal monocyte-macrophage differentiation antigens on HL60 promyelocytes undergoing differentiation induced by leukocyte-conditioned medium or phorbol diester, *Leuk Res*, 1981, 5, 6, 491-5
- 160.** Turner M. L. and Ironside J. W., New-variant Creutzfeldt-Jakob disease: the risk of transmission by blood transfusion., *Blood Rev*, 1998, 12, 4, 255-68

- 161.** Tyrell D., James P., Rao N., et al., Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin., *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88, 10372-10376
- 162.** Uciechowski P. and Schmidt R. E. Cluster report : CD11. In : *Leukocyte typing antigens IV. White cell differentiation antigens.* Oxford University Press, Oxford, New-York, Tokyo, 1989.-p. 543-50
- 163.** Vachula M., Simpson S. and Martinson J., A flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components, *Transfusion*, 1993, 33, 262-267
- 164.** Vachula M., Simpson S. J., Martinson J. A., et al., A flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components [see comments], *Transfusion*, 1993, 33, 3, 262-7
- 165.** van_der_Meer P. F., Pietersz R. N. and Reesink H. W., Influence of temperature, filter wettability, and timing of filtration on the removal of WBCs from RBC concentrates., *Transfusion*, 2001, 41, 4, 540-4
- 166.** van_Dongen J. J. M. and Leenen P. J. M. Leukocyte markers. In : *Immunology - Methods manuals.* Academic Press, Basel, 1997.-p. 2439-2491
- 167.** Vroman L., Methods of investigating protein interactions on artificial and natural surfaces, *Ann NY Acad Sci*, 1987, 516, 300-305
- 168.** Wagner S. J., Friedman L. I. and Dodd R. Y., Approaches to the reduction of viral infectivity in cellular blood components and single donor plasma., *Transfus Med Rev*, 1991, 5, 1, 18-32

- 169.** Wahyono D., Piechaczyk M., Mourton C., et al., Novel anti-digoxin monoclonal antibodies with different binding specificities for digoxin metabolites and other glycosides, *Hybridoma*, 1990, 9, 6, 619-29
- 170.** Wild M. K., Huang M. C., Schulze_Horsel U., et al., Affinity, kinetics, and thermodynamics of E-selectin binding to E-selectin ligand-1., *J Biol Chem*, 2001, 276, 34, 31602-12
- 171.** Williamson L. M., Leucocyte depletion of the blood supply - how will patients benefit?, *Br J Haematol*, 2000, 110, 2, 256-72
- 172.** Wright S. D., Rao P. E., Van_Voorhis W. C., et al., Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80, 18, 5699-703
- 173.** Yamauchi J., Yamaoka A., Ikemoto K., et al., Graft copolymerization of methyl methacrylate onto polypropylene oxidized with ozone., *J Appl Polym Sci*, 1991, 43, 1197-1203
- 174.** Yasutake M., Sumita M., Terashima S., et al., Stem cell collection filter system for human placental/umbilical cord blood processing., *Vox Sang*, 2001, 80, 2, 101-5
- 175.** Yuen C. T., Bezouska K., O'Brien J., et al., Sulfated blood group Lewis(a). A superior oligosaccharide ligand for human E-selectin., *J Biol Chem*, 1994, 269, 3, 1595-8
- 176.** Yuen C. T., Lawson A. M., Chai W., et al., Novel sulfated ligands for the cell adhesion molecule E-selectin revealed by the neoglycolipid technology among O-linked oligosaccharides on an ovarian cystadenoma glycoprotein., *Biochemistry*, 1992, 31, 38, 9126-31

177. Yung L. Y., Lim F., Khan M. M., et al., Neutrophil adhesion on surfaces preadsorbed with high molecular weight kininogen under well-defined flow conditions, *Immunopharmacology*, 1996, 32, 1-3, 19-23
178. Zaiss S. and Bayer A., The influence of calcium on the deformability of human granulocytes, *Biorheology*, 1990, 27, 701-709
179. Zingg W., Neumann A., Strong A., et al., Effect of surface roughness on platelet adhesion under static and under flow conditions, *Can J Surg*, 1982, 25, 16-19

Annexe 1

ENERGIE DE
SURFACE

Lorsque l'on sépare deux corps, leur énergie superficielle (en Joule.m⁻²) est modifiée selon : $U_{ij} = -2 \cdot \gamma_{ij} = \sigma_{ij} + Q_s$. Si $i \neq j$, on parle d'adhésion ; alors que si $i=j$, on parle de cohésion. L'énergie γ_{ij} des surfaces séparées se compose de la chaleur latente de formation Q_s , nécessaire au maintien d'une température de surface constante, et de l'énergie de fission $\sigma_{ij} \approx \sigma_{\max} \cdot \frac{a}{2} \cdot E$ (où σ_{\max} = résistance à la traction ; E = module d'élasticité ; a = constante de maille) qui est une composante mécanique.

L'énergie de surface γ est à l'origine de la formation des gouttes et des déformations auxquelles celles-ci sont exposées. En tenant compte de l'énergie totale $G_t = \gamma_{23} \cdot (A_1 + A_2) - G_{12} \cdot A_2$ du système, on obtient à l'équilibre :

$$\gamma_{23} \cdot (dA_1 + dA_2) - G_{12} \cdot dA_2 = 0$$

Pour une goutte de volume constant ($\cos \theta = dA_1/dA_2$), à l'équilibre ($\theta = \theta_0$)

$$\gamma_{23} \cdot (1 + \cos \theta) = G_{12} = \gamma_{13} + \gamma_{23} - \gamma_{12} \text{ (Equation de Young)}$$

et

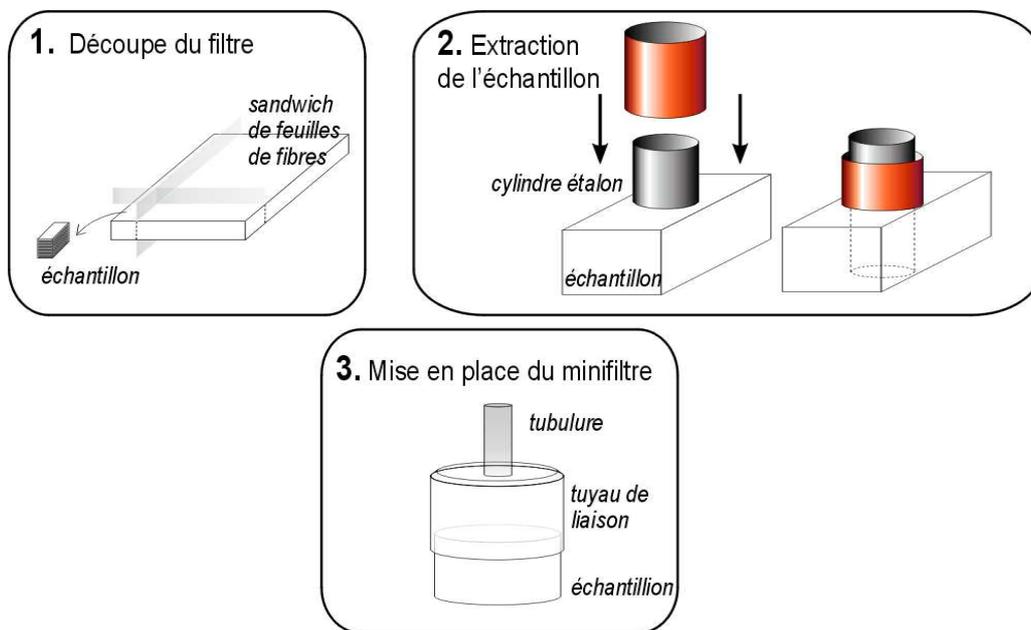
$$G_{12} = \gamma_{23} \cdot (1 + \cos \theta) \text{ (Equation de Young-Dupré)}$$

Si le travail G_{12} est inférieur à zéro, on est en présence d'un phénomène d'adhésion.

L'adhésion est déterminée par deux composantes : une disperse (Van der Waals) et une non disperse (dipôle-dipôle, interaction hydrophile, etc.). De cette manière, l'énergie totale peut être écrite comme $G_t = G^d + G^{nd}$, respectivement $\gamma_t = \gamma^d + \gamma^{nd}$.

Annexe 2

FABRICATION DU
MINIFILTRE



La première étape consiste à extraire les feuilles de fibres du boîtier rigide. Elles se présentent sous la forme d'un parallélépipède homogène constituée de 32 couches dont les 2 premières servent de préfiltre. Cette couche est dégagée de l'ensemble. Ensuite il convient de découper ce pavé de feuilles en cube homogène d'environ 1,5 cm² (étape 1 de la figure). Sur chaque échantillon découpé, un cylindre étalon de 10mm de diamètre en cuivre est positionné (étape 2). On chauffe ensuite « à rouge » un second cylindre de 12 mm de diamètre. Immédiatement après, on laisse coulisser ce dernier sur le cylindre étalon. Après découpage des feuilles par le cylindre chauffé,

on peut récupérer l'échantillon cylindrique de fibres. Le principal avantage de cette technique est l'étanchéité entre chaque couche de fibres, réalisée par la fusion des fibres sur le pourtour de l'échantillon. La dernière étape consiste à assembler les différents éléments du minifiltre (étape 3 de la figure). Un tuyau en plastique de 12 mm de diamètre et 8 mm de longueur environ est utilisé pour connecter l'échantillon de fibres avec la tubulure en silicone (3 mm de diamètre intérieur). L'extrémité supérieure de ce tuyau de liaison est fermée par un disque plastique percé pour accueillir la tubulure. L'étanchéité entre chaque pièce est réalisée par une colle époxy à prise rapide.

A n n e x e 3

PROCEDE DE
NUMERATION
DES CELLULES

Protocole de concentration des filtrats

Ce protocole repose sur la technique de cytométrie utilisant un kit de numération et sur une technique de concentration des filtrats décrite par Szufald (Szufald *et al*, 1997). Les principales étapes sont détaillées ci-après :

- Dans un tube de 50 mL, on ajoute le filtrat (environ 10-12 mL) à 35 mL d'oxalate d'ammonium (concentration 12g/L). Prolonger la lyse pendant 10 min sur un agitateur à bascule.
- Centrifuger à 1000g pendant 15 min.
- Vider le tube et le retourner sur un papier buvard. Laisser s'égoutter 1 à 2 minutes puis essuyer les parois jusqu'au début du cône.
- Dans le cas où la lyse est bien réussie, c'est-à-dire sans avoir un culot « rouge » (d'hémoglobine et de ghosts de globules rouges), on resuspend les cellules du filtrat dans un volume inférieur à 100 μ L (pour le Leucocount) pour pouvoir ajuster facilement le volume final. Cette opération est à faire le plus délicatement possible car les cellules sont très fortement écrasées au fond du tube. Dans le cas contraire, on resuspend avec du RPMi (~10 mL) et on centrifuge à 300g, 7min. On vide le tube, et on répète l'opération décrite ci-dessus.

- Enfin, on suit le protocole de base du kit Leucocount, c'est-à-dire 100µL d'échantillon + 400µL réactif, puis 5 min d'attente dans l'obscurité, à 4°C. Ce mélange est stable pendant 24h à 4°C.

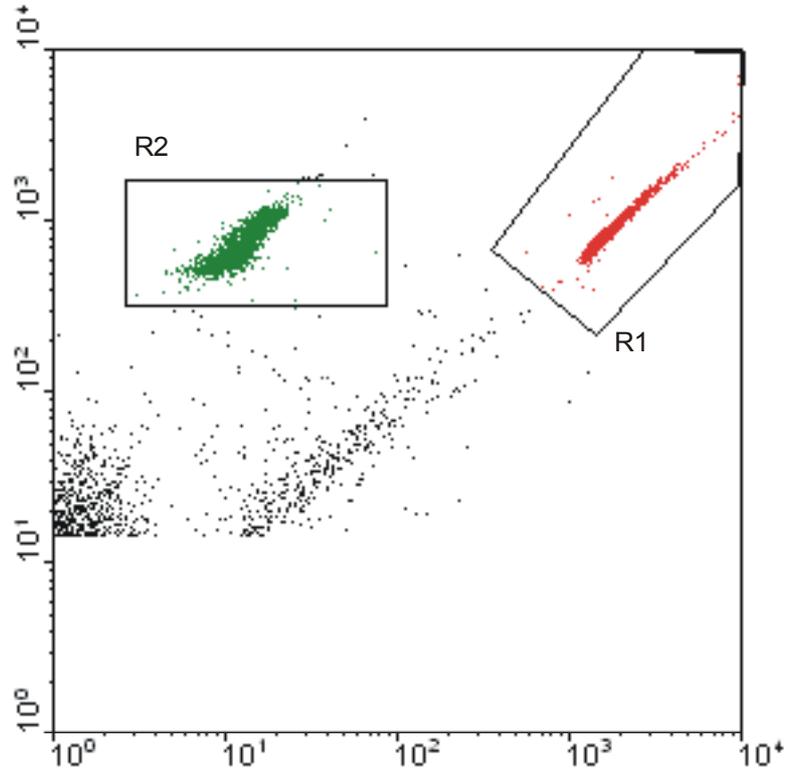
Numération cellulaire par cytométrie en flux

La technique utilisée dans notre étude repose sur la cytométrie et un kit de numération (Leucocount, Becton Dickinson, San José, Californie, USA). Ce kit est constitué d'un tube de 5 mL contenant un nombre connu de billes lyophilisées fluorescentes (environ 50000) qui servent de référence et d'une solution à base d'iodure de propidium, de Rnase, d'agent perméabilisant et de tampon. L'intérêt du kit est sa capacité à discriminer la cible (c'est-à-dire les leucocytes marqués) du bruit de fond et des débris cellulaires. Par ailleurs, une calibration précise du cytomètre permet d'augmenter cette discrimination.

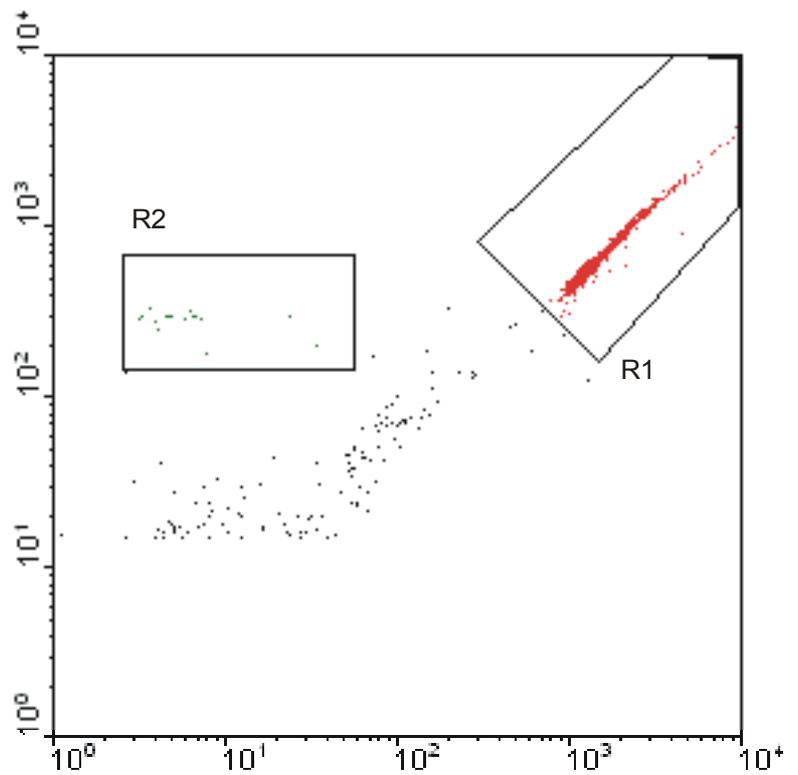
Les figures ci-dessous sont un exemple typique de graphique obtenu après analyse d'un échantillon traité. Les billes de référence émettent de la fluorescence sur deux canaux du cytomètre, FL1 et FL2. Les événements comptés pour la population de billes (région R1) et la population de leucocytes résiduels (région R2) fournissent les informations nécessaires pour le calcul du nombre absolu de leucocytes.

Après acquisition de 10000 événements dans la fenêtre R1 des billes de référence, il

R1 = 10000 événements
R2 = 1679 événements



R1 = 10000 événements
R2 = 16 événements



est possible de calculer la concentration de leucocytes résiduels de l'échantillon par la formule suivante :

$$(\text{événements (R2)} / \text{événements (R1)}) \times (\text{nombre de billes du tube} / \text{volume de l'échantillon } (\mu\text{L}))$$

A titre d'exemple, la première figure correspond à une concentration de 83,9 leucocytes résiduels ; la seconde à une concentration de 0,8 leucocytes résiduels.

A n n e x e 4

C O M P L E M E N T S

D E

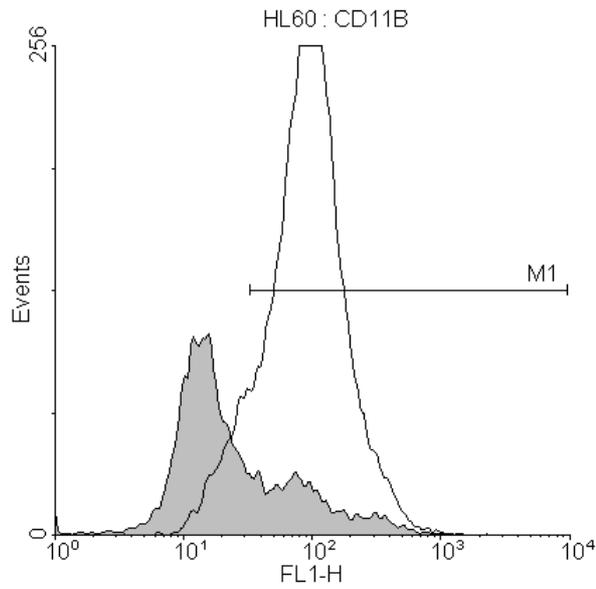
C Y T O M E T R I E

Les résultats présentés ci-dessous regroupent les mesures d'expression des molécules d'adhésion sur l'ensemble des lignées utilisées, réalisées en cytométrie de flux. Ces données complètent les résultats déjà exposés auparavant.

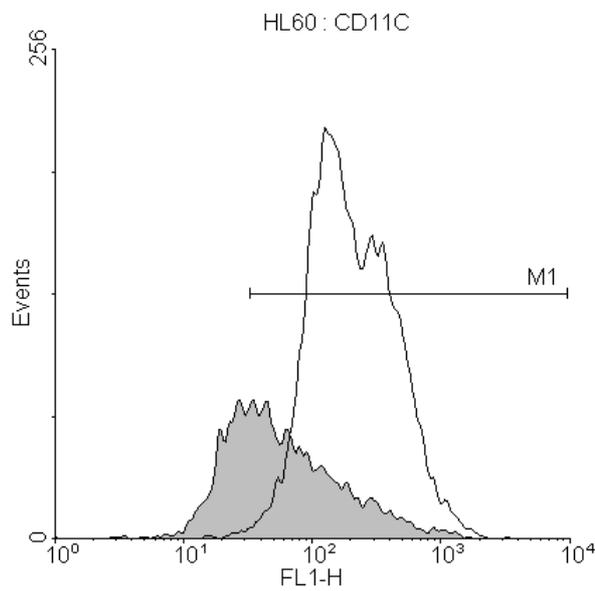
Les graphiques expriment l'intensité de fluorescence (en unité arbitraire de fluorescence). Pour chaque graphique, la valeur d'intensité de fluorescence est explicitée dans un tableau - colonnes *Médiane* ou *GeoMean* (selon la méthode de calcul utilisée). Le pourcentage de cellules positives apparaît aussi dans certains cas pour lesquels un contrôle négatif a été réalisé.

Remarque : les valeurs numériques des tableaux ne sont pas moyennées mais correspondent à des valeurs standards.

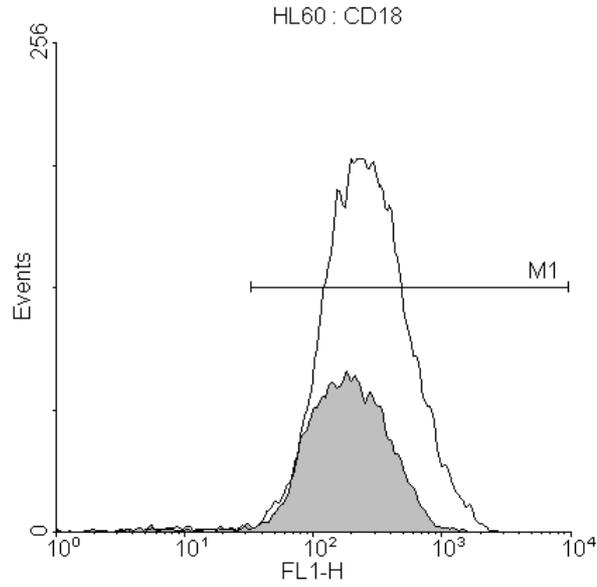
1. Lignée HL60



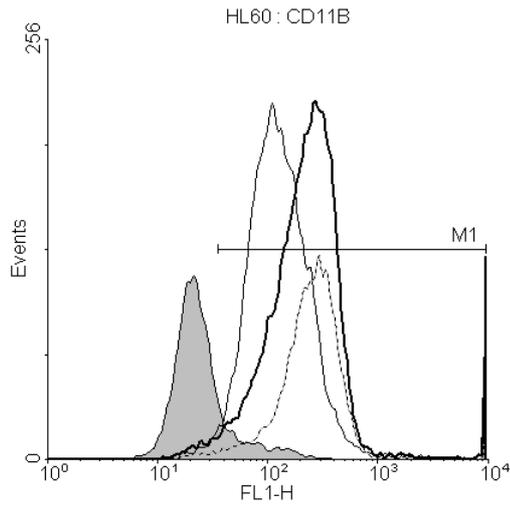
CD11b – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
HL60 témoin	5	14	14
PMA-HL60	90	86	90



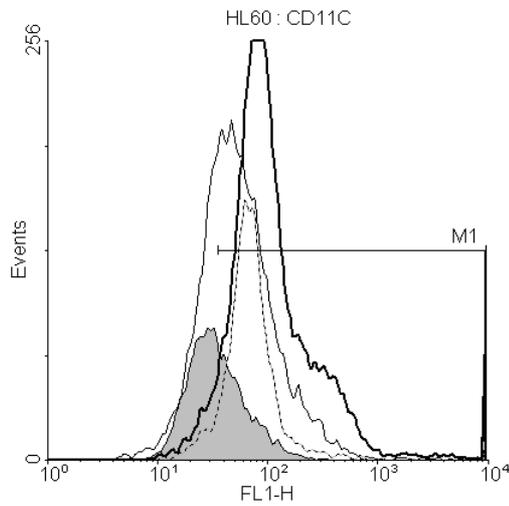
CD11b – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
HL60 témoin	59	50	60
PMA-HL60	99	191	206



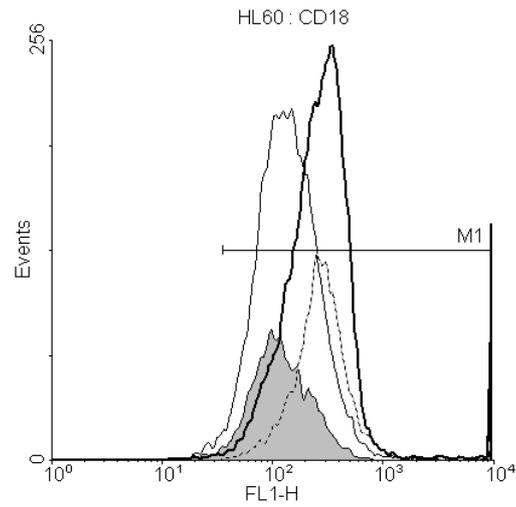
CD18 – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
HL60 témoin	97	184	173
PMA-HL60	99	255	253



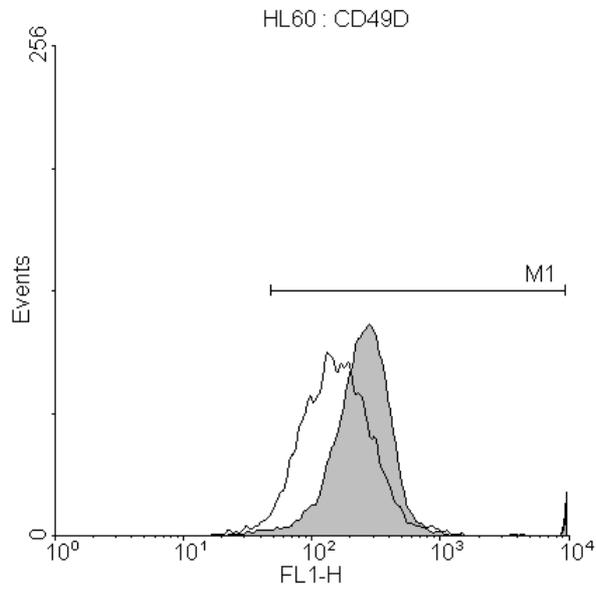
CD11b – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
Cell Témoin (grisé)	20	22	26
ATRA (1µM) (trait fin)	98	124	133
D3 (2.10 ⁻⁸ M) (trait pointillé)	92	191	159
ATRA+D3 (trait gras)	98	229	222



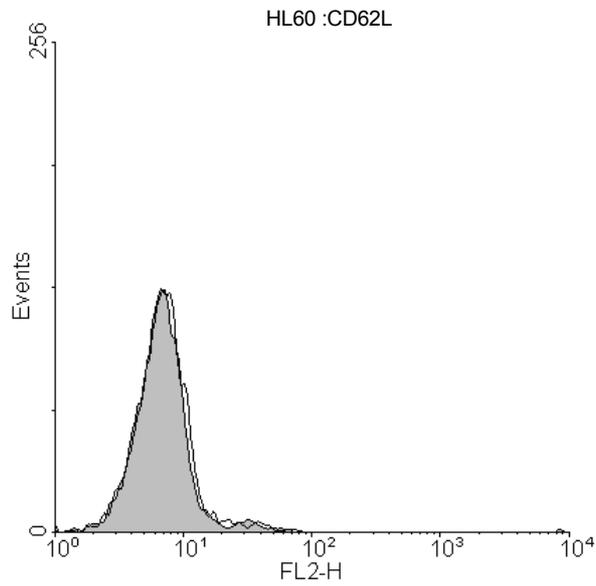
CD11c – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
Cell Témoin (grisé)	45	33	36
ATRA (1µM) (trait fin)	72	50	57
D3 (2.10 ⁻⁸ M) (trait pointillé)	92	67	72
ATRA+D3 (trait gras)	94	90	114



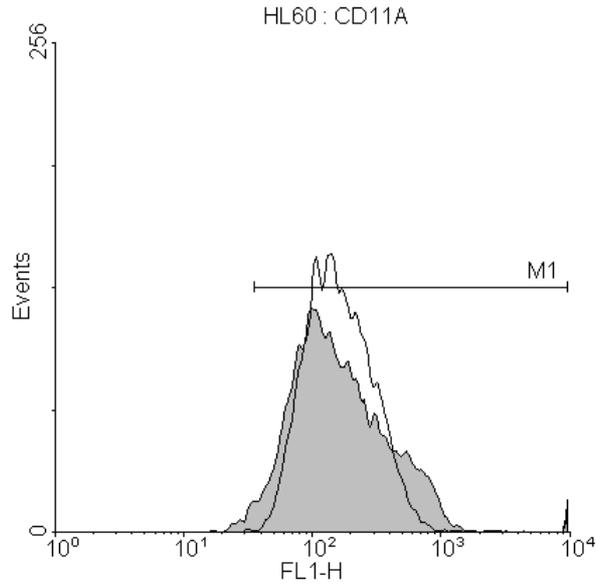
CD18 – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
Cell Témoin (grisé)	97	115	122
ATRA (1µM) (trait fin)	98	138	145
D3 (2.10 ⁻⁸ M) (trait pointillé)	100	274	274
ATRA+D3 (trait gras)	99	274	273



CD49d – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
HL60 témoin	99	255	248
D3-HL60	96	154	164

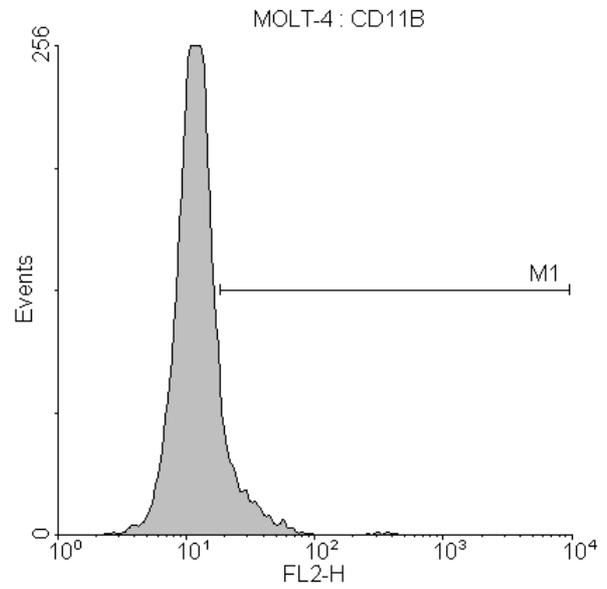
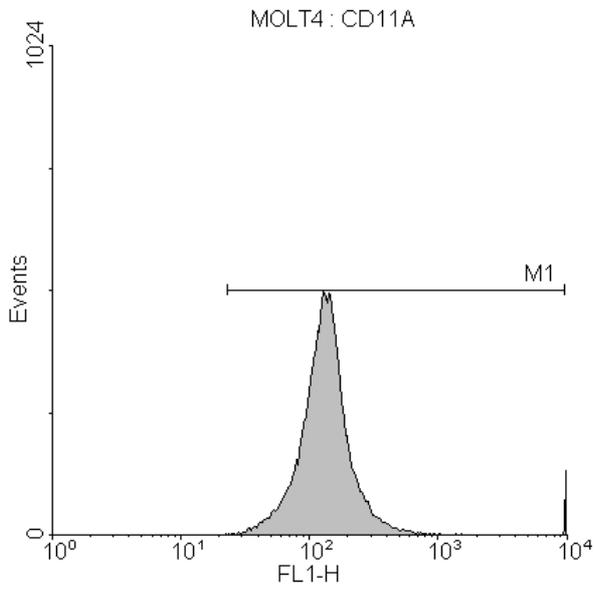


CD62L – PE	Médiane	GeoMean
HL60 témoin	7	7
D3-HL60	7	7

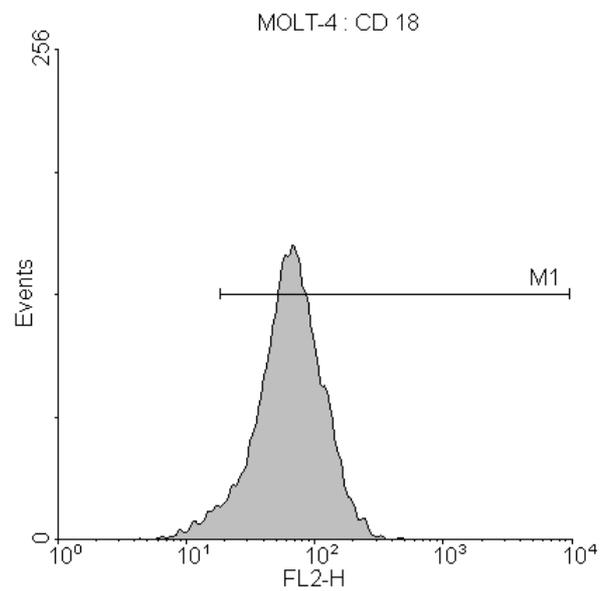
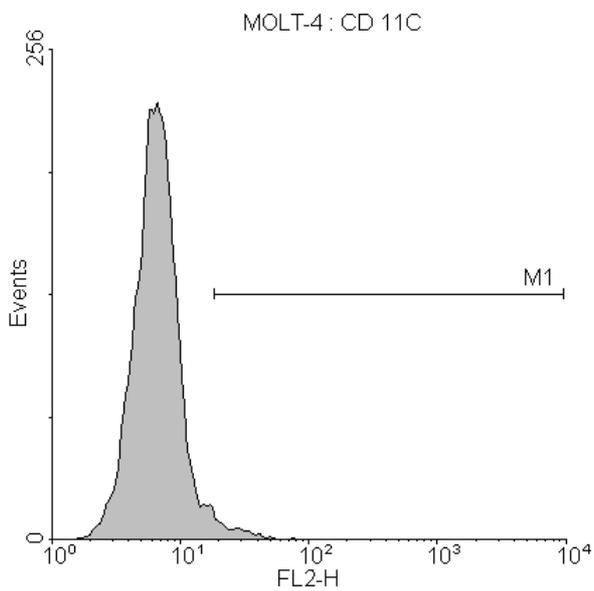


CD11a – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
HL60 témoin	98	143	164
D3-HL60	100	154	166

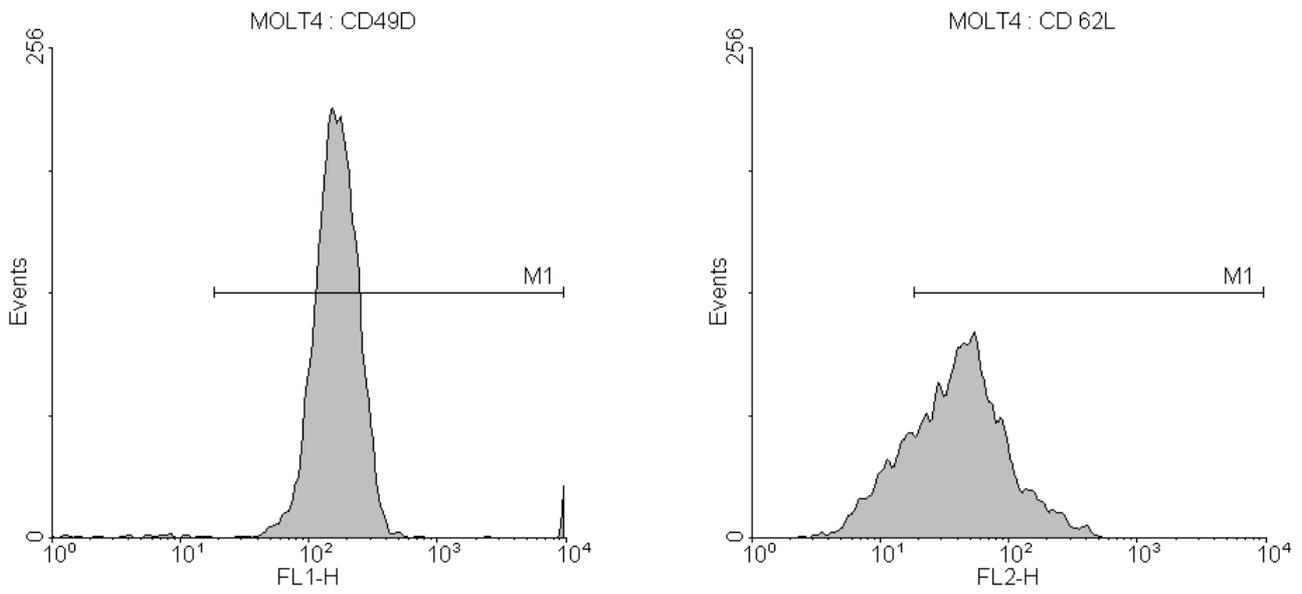
2. Lignée Molt-4



	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
CD11a - PE	100	133	137
CD11b - PE	3	26	28

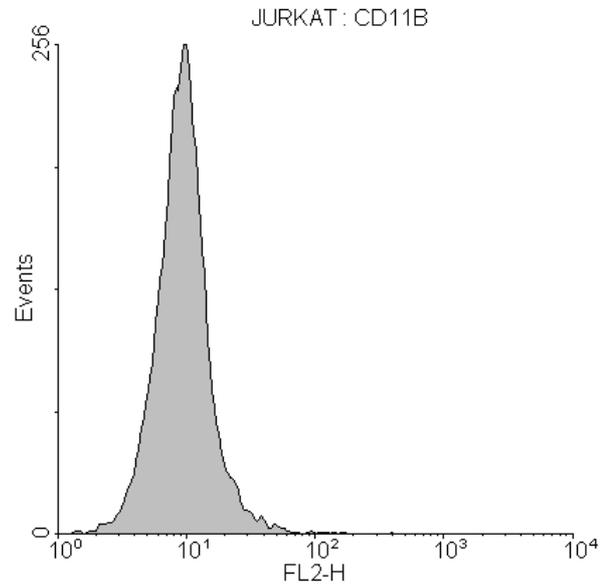
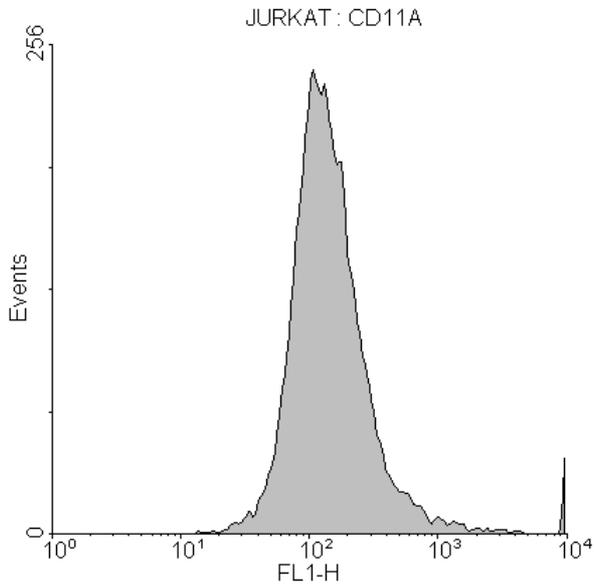


	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
CD11c - PE	13	30	16
CD18 - PE	96	67	68

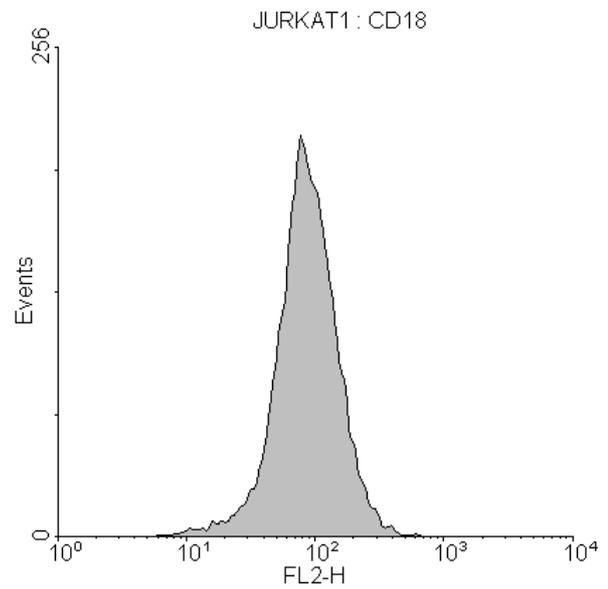
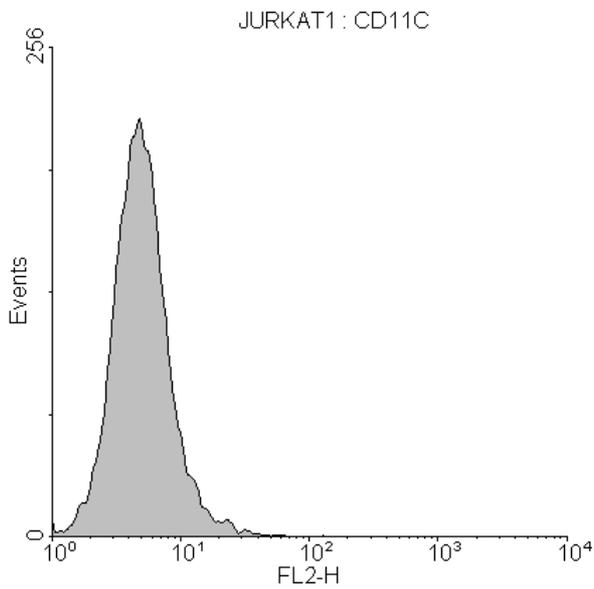


	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
CD49d – FITC	99	165	170
CD62L – PE	79	50	54

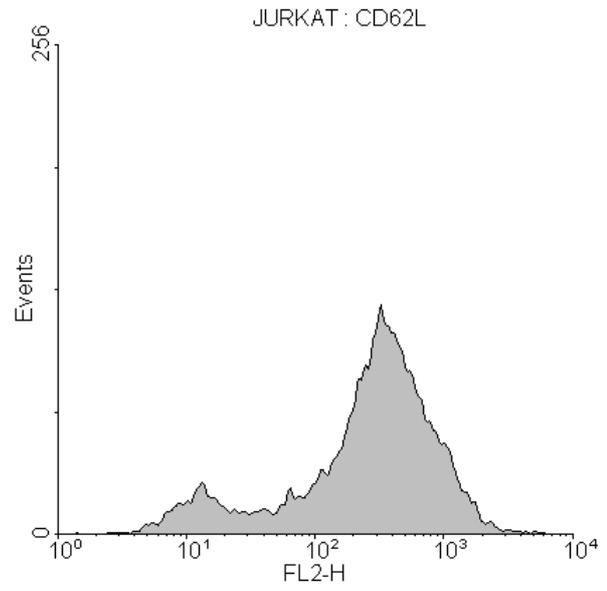
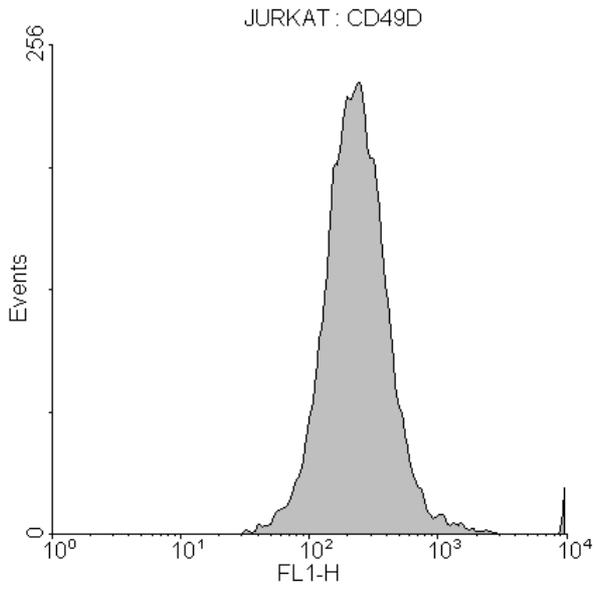
3. Lignée Jurkat



	Médiane	GeoMean
CD11a – FITC	133	149
CD11b - PE	9	9

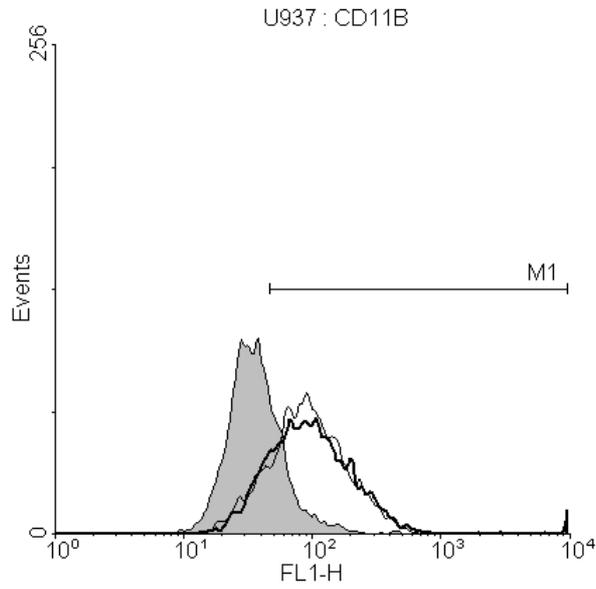


	Médiane	GeoMean
CD11c - PE	5	5
CD18 - PE	87	85

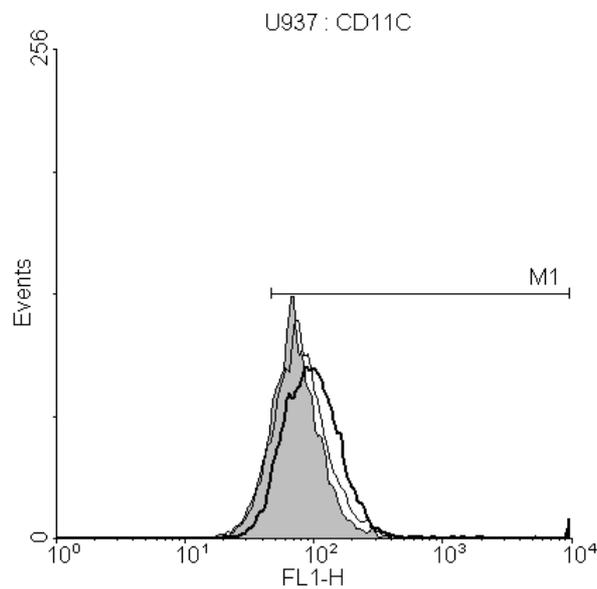


	Médiane	GeoMean
CD49d - FITC	229	238
CD62L - PE	316	230

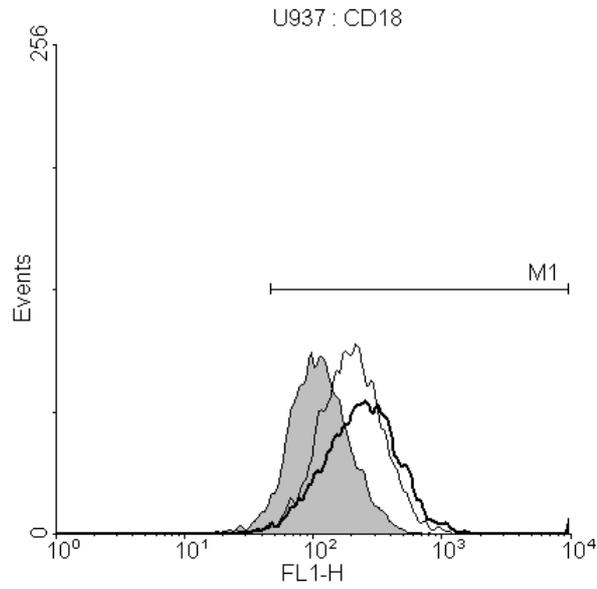
4. Lignée U937



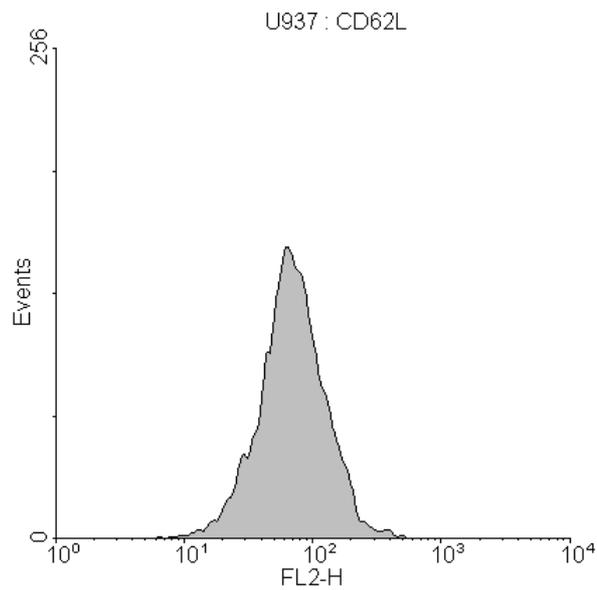
CD11b – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
Cell Témoin (grisé)	29	60	82
ATRA (trait fin)	83	104	117
D3 (trait gras)	83	107	123



CD11c – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
Cell Témoin (grisé)	85	70	74
ATRA (trait fin)	87	86	92
D3 (trait gras)	94	100	107

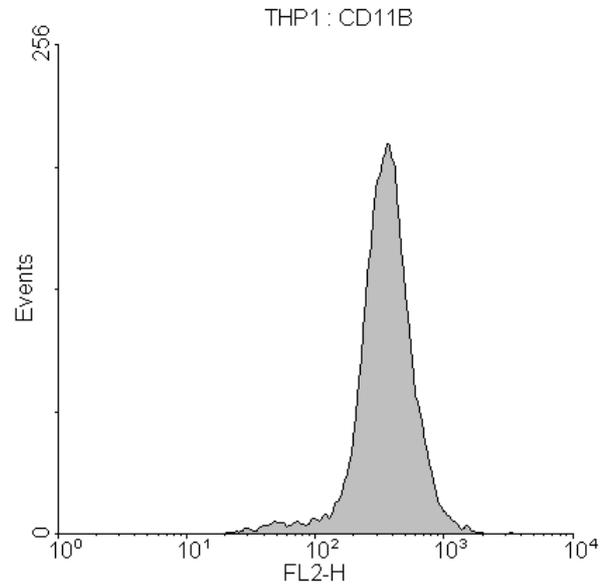
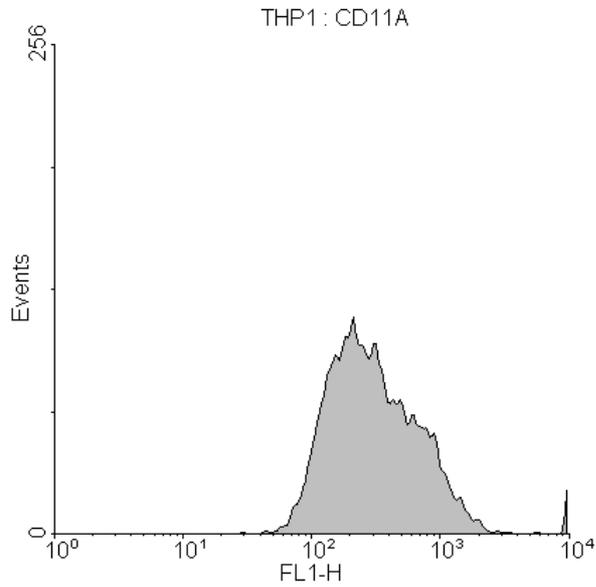


CD18 – FITC	% Cellules Positives	Médiane	GeoMean
Cell Témoin (grisé)	96	115	122
ATRA (trait fin)	99	198	204
D3 (trait gras)	99	246	241

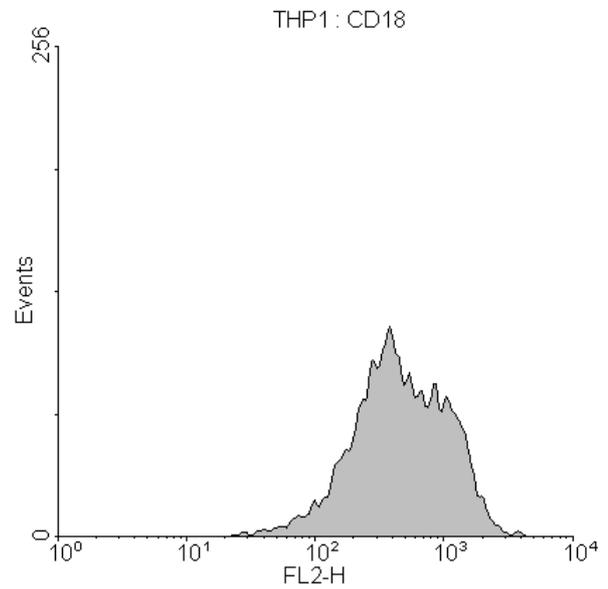
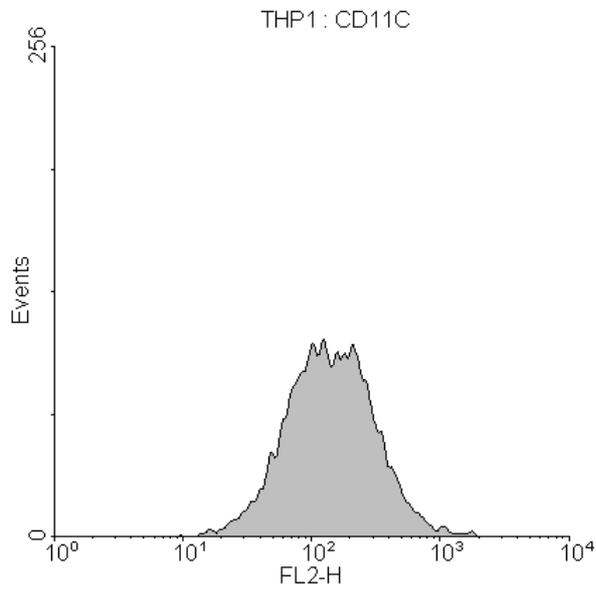


	Médiane	GeoMean
CD62L – PE	70	69

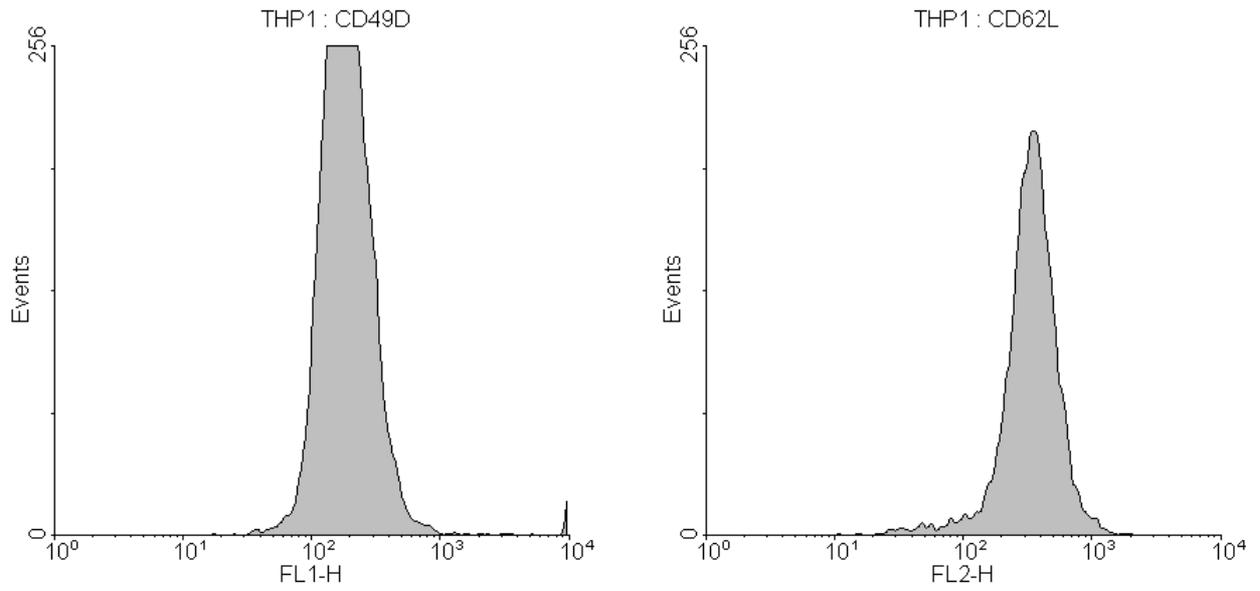
5. Lignée THP-1



	Médiane	GeoMean
CD11a – PE	284	310
CD11b – PE	352	345



	Médiane	GeoMean
CD11c - PE	138	142
CD18 - PE	453	453



	Médiane	GeoMean
CD49d - FITC	184	188
CD62L - PE	340	327