



HAL
open science

Études des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement du syndrome de détresse respiratoire post-transfusionnel (TRALI)

Marie- Belle El Mdawar

► To cite this version:

Marie- Belle El Mdawar. Études des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement du syndrome de détresse respiratoire post-transfusionnel (TRALI). Immunologie. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ077 . tel-03270848

HAL Id: tel-03270848

<https://theses.hal.science/tel-03270848v1>

Submitted on 25 Jun 2021

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
UMR_S1255, EFS Grand Est, Université de Strasbourg

THÈSE présentée par

Marie-Belle EL MDAWAR

Soutenue le **22 Octobre 2018**

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Étude des mécanismes cellulaires et
moléculaires impliqués dans le
développement du syndrome de détresse
respiratoire post-transfusionnel (TRALI)**

THÈSE dirigée par :

Monsieur Henri DE LA SALLE DR2, INSERM, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS:

Madame France PIRENNE Professeur, INSERM, Université Paris Est Créteil
Monsieur Benoît HO-TIN-NOÉ CR2, INSERM, Université Paris Diderot

EXAMINATEUR :

Monsieur Paul-Michel Mertes Professeur, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

MEMBRE INVITÉ:

Monsieur Christian GACHET Docteur, DR1, INSERM, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S1255

« Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostases, thrombose, transfusion »

Directeur : Docteur Christian GACHET

Etablissement Français du Sang (EFS) Grand Est

10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France

Tel. : +33 3 88 21 25 25 ; Fax : +33 3 88 21 25 21

Directeur de thèse :

Docteur Henri DE LA SALLE

E-mail : henri.delasalle@efs.sante.fr

À ma mère

REMERCIEMENTS

Quand tout le monde commence à te souhaiter « bon courage pour la dernière ligne droite », tu te dis que c'est vraiment le début d'un tournant important de ta vie. À ce moment précis, tu regardes en arrière et tu vois toutes ces personnes qui étaient là, sur ton chemin, et qui grâce à leur présence, ont participé à l'accomplissement de ton projet.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude au Professeur Bernard Levy pour avoir accepté ma candidature au sein du Master 2 qu'il dirigeait à Paris Descartes, me permettant de commencer mon aventure française ; et qui était d'une aide précieuse par la suite pour continuer mon parcours en thèse. Mes remerciements vont ensuite au Docteur Christian Gachet, directeur de l'UMR_S1255 et de l'EFS Grand-Est, pour m'avoir accueillie au sein de cet établissement où j'ai pu grandir, scientifiquement et humainement, pendant ces quatre dernières années. Merci pour votre soutien, vos conseils et vos remarques qui m'ont permis de m'améliorer.

Mes plus vifs remerciements vont à mon directeur de thèse, Henri de la Salle, pour son encadrement, sa disponibilité et sa confiance tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir fait bénéficier de tes vastes connaissances et de ta rigueur scientifique. Tes conseils, tes questions et tes explications m'ont permis de voir toujours plus loin, et d'accomplir ma formation d'une façon positive et riche en enseignements.

Ma reconnaissance s'adresse aux Professeurs France Pirenne et Paul-Michel Mertes, et à Monsieur Benoît Ho-Tin-Noé, qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse.

Je remercie chaleureusement Béatrice Hechler et Blandine Maître qui m'ont bien accompagnée dans le projet « TRALI ». Ce travail vous doit beaucoup, vous avez consacré beaucoup de temps à me transmettre vos connaissances, et pour les discussions qui ont permis au projet d'avancer. Blandine, merci pour nos échanges et ton soutien infailible ; j'espère que tu trouveras toujours des réserves dans le bureau des doctorants.

Un grand merci à Stéphanie qui m'a appris mes premières manipes, et qui a énormément contribué à ce travail. Merci pour ton aide et ta rigueur, c'était un réel plaisir de travailler avec toi. Je remercie également les étudiants de passage : Geoffrey, Florina et Florian, qui ont apporté chacun leur pierre à l'édifice.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres de l'UMR_S1255 avec qui j'ai pu échanger pendant ces quatre années. Merci pour votre professionnalisme, votre disponibilité et votre accueil chaleureux. J'ai beaucoup appris à vos côtés, tant au niveau scientifique qu'au

niveau personnel, et j'ai pu découvrir la culture alsacienne que je revendique « officiellement » depuis le mois de mai.

À Sylvie et Pascal F. qui ont toujours gardé un œil bien veillant sur moi. Merci pour votre jovialité et votre soutien.

Au personnel de l'animalerie (passé et présent) : Monique, Catherine Z., Pascal M., Kitty, Senay et Florian, qui ont permis un déroulement serein des expérimentations. Je suis consciente de l'énorme quantité de travail que vous avez fournie avec toutes ces souris, un immense Merci.

Aux membres des équipes 1 et 2 : Pierre, Catherine R., Arnaud, Manuela (ex membre), François, Anita, Nathalie, Catherine A., Catherine S., Catherine L., avec qui j'ai échangé lors des réunions d'équipe ainsi que pendant les journées des doctorants, et qui ont participé à l'amélioration de ma réflexion.

À Nico (futur grand fan du Real), Josiane, Catherine B., Véro, Léa, Sébastien, Patricia, Jean-Yves, Amandine, Fabienne, Valérie, Claude, Betty (et son grand sourire), vous avez tous participé, de près ou de loin, à une bonne ambiance de travail, ainsi qu'à bien finir un jeudi de la « lose ». Je remercie également Marie-Jeanne et Simone avec qui j'ai appris la bactériologie et la purification d'anticorps ; je suis tout de même la dernière étudiante à les avoir vues partir à la retraite !

Aux étudiants et post-docs, actuels et passés : Alicia B., Julie, Émilie, Valentin, Clarisse, David (qui nous doit toujours une tarte aux citrons), Laurie, Ségolène, la petite Julie, Alicia A., Laura, Marianne, Margot, Marie Angela, Salima, Élodie, Blandie, Elmina, Morgane, Marion L.B. ... et j'en oublie. Merci pour votre gentillesse, pour les débats enrichissants et tous ces mémorables moments que nous avons pu partager ensemble, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

À Marion, sans qui nos repas au Strauss, même si j'étais bien gâtée niveau sauce, ne seraient qu'une banale routine. Merci pour ta bonne humeur et pour ton écoute quand je me plaignais. Surtout ne change pas !

À Camille, ma partenaire de thèse, de bureau, du café du matin, et ceux du reste de la journée. Une belle amitié s'est installée au fil des jours et j'espère qu'elle durera encore longtemps. Je t'ai pas mal sollicitée pendant la rédaction, et t'étais toujours là à me corriger mes fautes de langage, même si certaines t'ont fait bien marrer. Accroches-toi, t'es la prochaine !

À l'ARMESA qui a financé mon travail, je lui en suis reconnaissante.

Au niveau personnel, je remercie les copains (surtout Bchara et Shree) pour avoir été présents dès le début, pour votre bonne humeur et pour nos soirées qui m'ont aidé à surmonter quelques blues ; nous commençons tous à tourner une page de notre vie, l'un après l'autre. Une pensée particulière au groupe de l'IBMC qui m'a adoptée pour les bières et les barbecues du vendredi.

À Reine, ma double compatriote, j'ai mille et une raisons pour te remercier MAIS je me contenterai de dire que ta présence a rendu des journées bien plus faciles à gérer. Sincèrement, Merci pour tout.

À ma tante et sa famille qui m'ont adopté au cours de mon Master 2, sans eux mon projet en France aurait été plus difficile à concrétiser. Merci d'avoir été là pour moi et m'avoir laissé la chance de réaliser mon rêve.

À mes parents, pour leur amour, leur encouragement, et les valeurs qui m'ont transmises. Sans vous je n'aurais jamais pu en arriver là. J'admire votre courage en me laissant m'envoler de mes propres ailes, loin de vous et de mon village qui m'est très cher « Jezzine ». Merci pour votre confiance et votre soutien inébranlable, j'espère vous rendre toujours plus fiers.

À ma sœur et mon frère qui étaient toujours là pour me remonter le moral par Skype, je vous souhaite de réaliser aussi vos rêves et de vous épanouir dans tout ce que vous faites. Je vous aime tous très fort.

À Nathalie, mon amie d'enfance qui a gardé le contact malgré la distance. Merci d'avoir été toujours là pour prendre de mes nouvelles, pour passer des soirées à discuter de la vie, et pour avoir égayé mes vacances au Liban.

Je vais finir mes remerciements en m'adressant à Adrien, sans qui je ne veux pas imaginer comment tout cela aurait pu être. Merci d'être si patient et si attentionné. « L'amour ne se crie pas, il se prouve », et je pense que nous avons bien réussi le test.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	i
LISTE DES TABLEAUX	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iii
PRÉAMBULE	1
A) INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	2
I) La transfusion sanguine	2
II) Complications pulmonaires de la transfusion sanguine	3
➤ Œdème hydrostatique : TACO (définition).....	3
➤ Œdème lésionnel : TRALI (définition).....	3
III) Les alvéoles pulmonaires et les échanges fluidiques	4
1) Circulation pulmonaire.....	5
2) Structure des alvéoles.....	5
3) Échange fluide en conditions normale et de déséquilibre	6
IV) Les différents types de TRALI	10
1) TRALI immunologique.....	10
1.1. TRALI et anticorps anti-HLA de classe I et II	10
1.2. TRALI et anticorps anti-HNA	11
1.3. TRALI inversés ou atypiques.....	12
2) TRALI non-immunologique.....	13
2.1. La durée de stockage des produits transfusés	13
2.2. Les médiateurs solubles « BRMs »	14
V) Modélisation de la pathogénèse.....	16
1) Modèle de TRALI à deux évènements « two-hit »	16
2) Modèle de seuil ou « threshold model »	17
VI) Épidémiologie du TRALI.....	19
1) Au niveau international.....	19
2) Au niveau français.....	22
VII) Les méthodes de prévention et leur impact sur l'incidence du TRALI.....	23
1) Exclusion des donneuses pour les dons de plasmas.....	23
2) Tests de dépistage des anticorps dans les produits sanguins	23
3) Mélange de plasmas de plusieurs donneurs et traitement par solvant/détergent....	24
4) Leuco-réduction (filtration) et lavage des cellules sanguines	25
5) Utilisation des solutions additives pour les plaquettes	26
➤ Cas de la France.....	26

VIII)	Traitement.....	27
IX)	Mécanismes du TRALI : hypothèses cliniques et validation <i>in vitro</i>	28
1)	Mécanismes proposés pour les anticorps anti-HLA I	30
2)	Mécanisme proposé pour les anticorps anti-HLA II.....	30
3)	Mécanismes proposés pour les anticorps anti-HNA	32
4)	Mécanisme proposé pour les molécules BRMs	32
X)	Modèles animaux	34
1)	Modèles animaux <i>ex vivo</i>	34
2)	Modèles animaux <i>in vivo</i>	35
2.1.	Modèles de TRALI immunologique : en un ou en deux évènements.....	36
➤	Nomenclature du CMH chez la souris	37
2.2.	Modèles de TRALI non immunologique : description et observations.....	41
XI)	Mécanismes du TRALI immunologique : conclusions des modèles <i>in vivo</i>	43
1)	Les neutrophiles, la production des pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) et des espèces réactives de l'oxygène ERO.....	44
1.1.	Neutrophiles	44
1.2.	Les pièges extracellulaires des neutrophiles ou NETs.....	47
1.3.	Les espèces réactives de l'oxygène	47
2)	Les monocytes/macrophages.....	48
3)	Les lymphocytes T : T-régulateurs, cellules dendritiques et IL-10.....	49
4)	Les cellules endothéliales.....	50
5)	Les plaquettes.....	52
6)	Les récepteurs Fcγ.....	52
7)	Système du complément.....	53
8)	Protéine C-réactive (CRP pour C-Reactive Protein)	54
B)	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	56
C)	TRAVAIL DE THÈSE	58
Partie 1	58
I)	INTRODUCTION.....	58
1)	L'ATP dans l'immunité et l'inflammation	58
2)	Les récepteurs purinergiques P2X	59
3)	Les canaux TRP.....	61
3.1.	Le canal TRPC6.....	62
3.2.	Le canal TRPV4.....	62
Article (1) en soumission.....		64
II)	DISCUSSION.....	66

Partie 2	70
I) INTRODUCTION.....	70
1) Les plaquettes : de l'hémostase à l'immunité et l'inflammation	70
1.1. Fonctions hémostatiques	70
1.2. Fonctions homéostatiques.....	70
1.3. Fonctions immunologiques.....	71
1.4. Fonctions homéostatiques en conditions inflammatoires	76
2) Les plaquettes dans l'intégrité vasculaire pulmonaire.....	77
3) Les plaquettes dans le TRALI : une littérature contradictoire.....	79
Article (2) publié.....	82
II) DISCUSSION.....	84
Partie 3	88
I) INTRODUCTION.....	88
1) Les récepteurs Fcγ (FcγRs)	88
2) Le récepteur FcγRIIA : définition, structure et signalisation	90
3) Le récepteur FcγRIIA dans la thrombose, l'immunité et l'inflammation	92
4) Un rôle du FcγRIIA dans le TRALI?.....	94
Article (3)	96
II) DISCUSSION.....	98
D) SUITE DU TRAVAIL ET DISCUSSION GÉNÉRALE	102
I) Rôle des inhibiteurs de P2RX ₁ et TRPC6 dans la pathologie du TRALI : quelles cibles cellulaires ?.....	102
II) Rôle du récepteur FcγRIIA dans la pathologie du TRALI.....	105
E) PERSPECTIVES.....	109
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112

LISTE DES FIGURES

Figure 1 5
Figure 2 6
Figure 3 9
Figure 4 15
Figure 5 17
Figure 6 19
Figure 7 22
Figure 8 29
Figure 9 36
Figure 10 38
Figure 11 41
Figure I 68
Figure II 86
Figure III-1 91
Figure III-2 95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 112
Tableau 221
Tableau 337
Tableau I60
Tableau II-174
Tableau II-275
Tableau III-188
Tableau III-289
Tableau III-389
Tableau III-490

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AABB : American Association of Blood Banks

ALI : Acute Lung Injury

ANSM : Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé

ATP : Adénosine TriPhosphate

BCPC : Buffy Coat Platelet Concentrate

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BNP : Brain Natriuretic Peptide

BRM : Biologic Response Modifiers

CD : Cluster of Differentiation

CGR : Concentrés de Globules Rouges

CINC-1 : Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COX : CycloOXYgénase

CP : Concentrés de Plaquettes

CPA : Concentrés Plaquettaires d'Aphérèse

CRP : C-Reactive Protein

CTL-2 : Choline Transporter-Like protein-2

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

EFS : Etablissement Français du Sang

EGF : Epidermal Growth Factor

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

FcγR : Fcγ Receptor

FDA : Food and Drug Administration

FiO₂ : Fraction Inspirée en Oxygène

fMLP : formylMéthionine-Leucyl-Phénylalanine

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GP : GlycoProtein

GROα : Growth Regulated Oncogene alpha

H-2 : Haplotype-2

HETE : HydroxyEicosaTétraEnoïque

HLA : Human Leukocyte Antigen

HMVEC : Human MicroVascular Endothelial Cell
HNA : Human Neutrophil Antigen
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
IgG : Immunoglobuline G
IHN : International Hemovigilance Network
IL : InterLeukine
ISBT : International Society of Blood Transfusion
ISTARE : International Surveillance of Transfusion-Associated Reactions and Events
KC : Keratinocyte Chemoattractant
LPS : LipoPolySaccharide
lyso-PC : lyso-PhosphatidylCholine
Mac-1 : Macrophage antigen-1
MCP : Mélanges de Concentrés Plaquettaires
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
MIP : Macrophage Inflammatory Protein
MIP-2 : Macrophages Inflammatory Protein-2
NET : Neutrophil Extracellular Trap
NHSBT : National Health Service Blood and Transplant
PAF : Plactelet Activating Factor
PaO₂ : Pression partielle de l'Oxygène
PAOP : Pulmonary Arterial Occlusion Pressure
PAR : Protease-Activated Receptor
PAS : Platelet Additive Solutions
PCPA : Para-ChloroPhenylAlanine
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PF4 : Platelet Factor 4
PFC : Plasmas Fraîchement Congelés
PSGL : P-Selectin Glycoprotein Ligand
PSL : Produits Sanguins Labiles
RANTES : Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RhoA : Ras homolog gene family member A

ROCK : Rho-associated protein kinase
S/D : Solvant/Détergent
sCD40L : soluble CD40 Ligand
SCID : Severe Combined ImmunoDeficient
SDRA : Syndromes de Détresse Respiratoire Aiguë
SHOT : Serious Hazards Of Transfusion
TACO : Transfusion-Associated Circulatory Overload
TAD : Transfusion-Associated Dyspnea
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TLR : Toll-Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor -alpha
TRALI : Transfusion-Related Acute Lung Injury
TRP : Transient Receptor Potential
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

PRÉAMBULE

Le TRALI, de son acronyme anglais « Transfusion-Related Acute Lung Injury », a longtemps été considéré comme la première cause d'accident post-transfusionnel grave. Il s'agit d'un œdème pulmonaire lésionnel pouvant survenir dans les 6 heures qui suivent une transfusion sanguine. Tous les types de produits de transfusion sont mis en cause dans des cas de TRALI, à savoir, les plasmas frais congelés (PFC), les concentrés plaquettaires d'aphérèse (CPA), les mélanges de concentrés plaquettaires (MCP), les concentrés de globules rouges (CGR), ainsi que les immunoglobulines injectables et les produits cryoprécipités. De nombreuses études ont permis d'identifier une cause majeure associée à la présence d'alloanticorps chez les donneurs (surtout chez les femmes multipares), d'où la dénomination de TRALI immunologique. Cette identification a permis de mettre en place des mesures de prévention qui se sont avérées efficaces pour baisser l'incidence du TRALI immunologique devenu un syndrome rare. Selon le dernier rapport de l'ANSM (Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé) sur l'année 2016, sa fréquence est de 1.9 pour 10⁶ produits transfusés.

La pathophysiologie du TRALI étant complexe, une trentaine d'années après sa première description, la compréhension de la séquence d'évènements aboutissant à l'insuffisance respiratoire reste toujours limitée. De plus, les manifestations du TRALI sont hétérogènes, de l'insuffisance respiratoire grave nécessitant une ventilation mécanique, à l'hypoxémie pouvant passer inaperçue, ce qui peut conduire à une sous-estimation des cas reportés.

Des modèles expérimentaux ont été développés afin de comprendre les mécanismes aboutissant à la lésion pulmonaire. Néanmoins, ces modèles, dans la majorité chez la souris, ont abouti à des conclusions contradictoires quant à l'implication des différentes cellules dans la survenue du TRALI, tandis qu'ils reproduisent imparfaitement la physiopathologie humaine.

L'objectif de cette thèse est de préciser les mécanismes du TRALI immunologique expérimental, et de proposer une amélioration des modèles animaux.

Dans cette introduction seront présentées brièvement la transfusion sanguine et les complications pulmonaires qui peuvent en résulter. Ensuite, les différents types de TRALI, la modélisation de ce syndrome, son épidémiologie et son traitement. Puis une description des différents modèles expérimentaux utilisés pour aboutir enfin aux différents mécanismes et cellules décrits pour jouer un rôle dans le développement de cet œdème pulmonaire.

A) INTRODUCTION GÉNÉRALE

I) La transfusion sanguine

La transfusion sanguine consiste en l'administration par voie intraveineuse de l'un des composants du sang : globules rouges, plaquettes ou plasma, que nous appelons produits sanguins labiles (PSL) étant donné leur durée de conservation limitée. Il s'agit de produits irremplaçables car il n'existe pas à l'heure actuelle de produits de substitution. Les PSL sont prescrits dans trois situations majeures : (1) certains cancers (suite au traitement par chimiothérapie), (2) les maladies du sang (thalassémie, drépanocytose, anémie), (3) les hémorragies (toutes causes confondues, surtout pour les interventions chirurgicales à risque hémorragique et/ou sanglantes). En France, les PSL sont produits exclusivement à partir du don de donneurs de sang bénévoles. Ces produits respectent des règles strictes de sélection des donneurs, de transport, d'analyse et de conservation, afin de garantir la sécurité de la chaîne transfusionnelle. L'établissement français du sang (EFS) a le monopole du prélèvement, de la préparation, de la qualification biologique et de la distribution des PSL. En 2016, 3 135 906 PSL ont été distribués dont 80 % de concentrés de globules rouges (CGR), 9.8 % de concentrés de plaquettes (CP) et 10.1 % de plasmas thérapeutiques, selon le dernier rapport d'activité d'hémovigilance de l'ANSM (ANSM 2017). Ces produits sont fabriqués pour 84.7 % à partir de dons de sang total et pour 15.3 % à partir de dons d'aphérèse. L'aphérèse consiste à prélever un constituant de sang : plaquettes, plasma ou leucocytes, en utilisant un automate qui sépare le sang par technique de centrifugation différentielle, permettant ainsi d'obtenir le constituant visé et de restituer le reste au donneur. Cette technique permet d'obtenir une quantité plus importante du produit désiré à partir d'un seul donneur, alors que la préparation des concentrés plaquettaires à partir de la couche leucocytaire issu de don de sang total nécessite des mélanges de plusieurs dons afin d'atteindre les standards fixés pour chaque poche de transfusion. La directive européenne JOCE 2003 réglemente les conditions et le temps de stockages des PSL : les CGR sont conservés jusqu'à 42 jours, à une température fixée légalement entre +2° et +6°C, les CP sont maintenus sous agitation constante entre +20° et +24°C pendant 5 à 7 jours au maximum, tandis que les plasmas thérapeutiques nommés aussi plasmas frais congelés (PFC) sont conservés à une température inférieure ou égale à -25°C durant au maximum un an après la date de prélèvement.

II) Complications pulmonaires de la transfusion sanguine

Bien que la transfusion sanguine soit une activité médicale à très haute sécurité, elle peut comporter un certain nombre de complications, qui varient selon les produits transfusés. Parmi les complications immédiates, nous pouvons citer les réactions fébriles non hémolytiques, les réactions allergiques, les incompatibilités immunologiques, les infections bactériennes, les réactions hypotensives et les complications pulmonaires non infectieuses. Ces dernières se traduisent par des œdèmes pulmonaires qui sont classiquement divisés en œdèmes hydrostatiques et œdèmes de troubles de perméabilité vasculaire (ou lésionnel) (Popovsky 2004, Gajic et al. 2006). La survenue de ces œdèmes sera détaillée dans la partie suivante (voir paragraphe III-3-b, condition de déséquilibre : formation d'œdème).

➤ Œdème hydrostatique : TACO (définition)

Le syndrome de « surcharge circulatoire associée à la transfusion » ou « TACO » (Transfusion-Associated Circulatory Overload) se manifeste suite à une augmentation de la pression hydrostatique capillaire. Il se produit quand le système circulatoire du receveur est dépassé soit par la vitesse de perfusion soit par le volume du produit sanguin transfusé (Li et al. 2011, Narick et al. 2012). Le TACO est caractérisé par l'apparition d'une dyspnée aiguë, accompagnée d'une hypertension, tachypnée et tachycardie (Popovsky 2004). Le liquide d'œdème est un transsudat avec une faible teneur en protéines. Cet œdème hémodynamique est associé, dans la majorité des cas, à une insuffisance ventriculaire gauche (Ozier and Mertes 2009). Une diminution rapide du volume de transfusion et un traitement diurétique sont souvent utilisés avec une amélioration rapide des symptômes. Toutefois, une assistance ventilatoire peut être requise dans certains cas (Gajic et al. 2006, Narick et al. 2012).

➤ Œdème lésionnel : TRALI (définition)

Le terme « syndrome de détresse respiratoire post-transfusionnelle » ou « TRALI » (Transfusion-Related Acute Lung Injury) est utilisé pour la première fois par Popovsky et al. en 1983 (Popovsky et al. 1983). Cependant, suite à une analyse rétrospective, la première description de ce que nous appelons aujourd'hui « TRALI » remonte à l'année 1951 avec les observations cliniques décrites par Barnard (Barnard 1951). D'autres publications des années 70, décrivent aussi des manifestations pulmonaires post-transfusionnelles sous différentes dénominations : œdème pulmonaire transfusionnel sans surcharge circulatoire (Philipps and Fleischner 1966), infiltrats pulmonaires

associés à la transfusion de leucoagglutinines (Ward 1970), hypersensibilité pulmonaire induite par la transfusion d'agglutinines non-HLA (Thompson et al. 1971), infiltrats pulmonaires avec anti-HLA spécifiques (Andrews et al. 1976), œdème pulmonaire non-cardiogénique fulminant au cours d'une chirurgie cardiaque (Culliford et al. 1980). En 1985, Popovsky et al. publient une série de 36 cas observés à la clinique Mayo et dont les critères d'inclusion correspondent à la première définition de TRALI : association d'une détresse respiratoire, d'une hypoxémie et d'une hypotension, sans surcharge circulatoire (et donc non cardiogénique), observable au cours des six premières heures après une transfusion (Popovsky and Moore 1985). En France, la première description d'un cas de TRALI figure dans la thèse de Médecine de Di Mercurio en 1979 (Renaudier et al. 2008).

En 2004, une définition consensuelle du TRALI est adoptée à Toronto : le TRALI est un syndrome dont le diagnostic ne relève pas de tests de laboratoire, mais d'observations cliniques et radiologiques. Il est ainsi défini en tant qu'une nouvelle catégorie d'atteinte pulmonaire aiguë « ALI » (Acute Lung Injury) survenant dans les six heures qui suivent une transfusion sanguine, sans autre facteur de risque d'atteinte pulmonaire (Kleinman et al. 2004, Goldman et al. 2005). Si un facteur indépendant à la transfusion est présent, le syndrome est nommé TRALI « possible », pour indiquer l'incertitude sur sa cause réelle. Cette définition est celle retenue par l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) depuis 2006 (Renaudier et al. 2009).

Des auteurs remarquent par ailleurs que des ALI peuvent survenir tardivement, jusqu'à 72 heures après transfusion et souvent suite à des transfusions massives. Ils proposent donc le terme de TRALI retardé pour les décrire (Marik and Corwin 2008). Néanmoins, dans de telles situations, d'autres facteurs de complication peuvent venir s'ajouter au cours du temps, aussi l'affirmation d'un lien de causalité entre les transfusions et les œdèmes retardés est difficile à établir.

III) Les alvéoles pulmonaires et les échanges fluidiques

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la survenue de ces œdèmes pulmonaires, il est utile de résumer succinctement l'organisation de la circulation pulmonaire, sa relation avec les alvéoles, et les échanges fluidiques qui existent en condition normale et de formation d'œdèmes.

1) Circulation pulmonaire

Chaque poumon reçoit une artère pulmonaire et donne deux veines, supérieure et inférieure. La circulation artérielle suit étroitement le réseau bronchique. Le sang provenant du cœur transite successivement à travers les artères pulmonaires (au niveau des bronches), les artérioles (au niveau des bronchioles) puis un réseau de microcapillaires anastomosés (au niveau des alvéoles) où l'échange gazeux se fait. Ensuite le sang rejoint les veinules pulmonaires, qui en fonction de l'espèce et de la position dans l'arbre vasculaire (proche ou distant des hiles), suivent un chemin indépendant du réseau artériel/bronchique pour rejoindre les veines pulmonaires, et par la suite, retourner au cœur d'où il sera redistribué vers la circulation générale (Figure 1) (Townasley 2012).

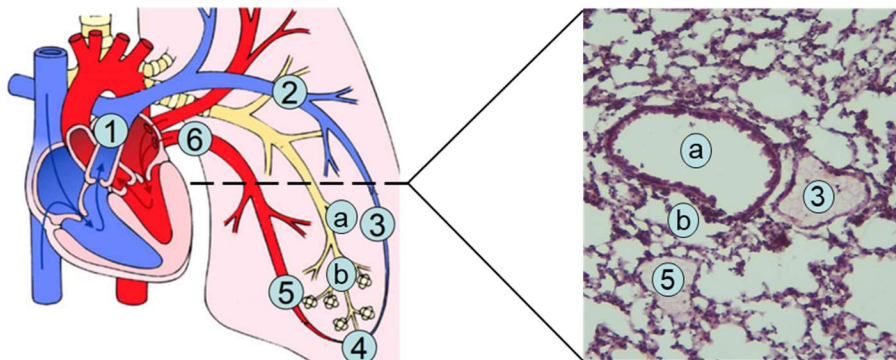


Figure 1 : Organisation générale des poumons

À gauche, Organisation de l'arbre vasculaire : les vaisseaux pulmonaires suivent étroitement l'arbre bronchique chez l'Homme (1, tronc de l'artère pulmonaire ; 2, branche de l'artère pulmonaire ; 3, artérioles ; 4, capillaires ; 5, veinules ; 6, veine pulmonaires ; a, bronchioles ; b, alvéoles). **À droite**, Coupe histologique transversale de poumon de souris, colorée à l'hématoxyline et l'éosine.

2) Structure des alvéoles

Les alvéoles pulmonaires sont des structures minces où se déroulent les échanges gazeux avec le sang. Leur paroi interne est composée de deux types cellulaires, pneumocytes de type I et II. Les premiers tapissent la plus grande partie de la paroi alvéolaire ($\approx 5000 \mu\text{m}^2$), ils sont caractérisés par leur surface étendue et une fine épaisseur qui permet de faciliter les échanges gazeux avec le réseau vasculaire. Les seconds recouvrent environ 10 % de la surface épithéliale alvéolaire (Crapo et al. 1982) et produisent le surfactant, un complexe multimoléculaire formé essentiellement par

des phospholipides (environ 80 % de sa masse molaire), des lipides neutres et des protéines. Le surfactant est nécessaire pour faciliter le déploiement des alvéoles en maintenant une tension superficielle adéquate et augmentant la compliance pulmonaire. Il empêche ainsi l'effondrement des alvéoles durant la phase terminale de l'expiration. Par ailleurs, il participe aussi aux mécanismes de défense antimicrobienne en interagissant avec les pathogènes pour les éliminer, et en modulant les réponses immunitaires. Les macrophages alvéolaires, présents dans la lumière des sacs alvéolaires, assurent une surveillance immunitaire contre les agents pathogènes, ainsi que les neutrophiles après leur recrutement (Han and Mallampalli 2015).

Les alvéoles sont recouvertes d'une fine maille de capillaires, ainsi les cellules épithéliales et les cellules endothéliales pulmonaires s'étendent sur une grande surface formant la paroi alvéolo-capillaire, mince et résistante, au niveau de laquelle se font les échanges gazeux (O_2/CO_2) entre l'air et le sang (Figure 2). Ces cellules sont séparées par la membrane basale résultant de la fusion de la membrane basale des pneumocytes et des cellules endothéliales.

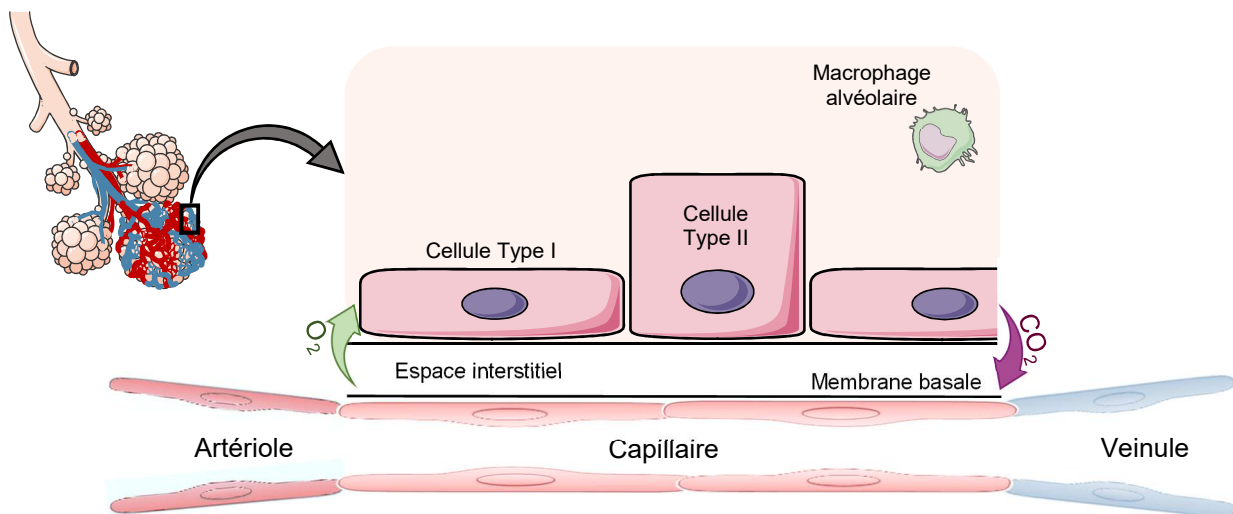


Figure 2 : Structure des alvéoles

3) Échange fluide en conditions normale et de déséquilibre

Des échanges liquidiens existent physiologiquement entre le secteur interstitiel et le secteur capillaire. La meilleure façon de comprendre ces échanges est d'appliquer l'équation de Starling qui permet de décrire les différents facteurs régissant la filtration au niveau de n'importe quelle membrane semi-perméable, y compris la barrière alvéolo-capillaire :

$Q = K_f [(P_{cap} - P_{is}) - \sigma(p_{cap} - p_{is})]$ où Q représente la quantité de liquide filtré, K_f le coefficient de perméabilité de la membrane capillaire (dépend de la conductivité hydraulique et la surface de filtration), P les pressions hydrostatiques et p les pressions oncotiques respectivement de l'espace intracapillaire (cap) et l'espace interstitiel péricapillaire (is). Le coefficient de réflexion σ définit le caractère de perméabilité aux protéines de la membrane capillaire, il varie d'un tissu à l'autre.

a- Condition normale

Dans des poumons sains, la diffusion trans-endothéliale des composants plasmatiques résulte de la balance entre la pression hydrostatique trans-capillaire ($P_{cap} - P_{is}$), qui permet la filtration du fluide des capillaires vers l'espace interstitiel, et la pression osmotique trans-capillaire ($p_{cap} - p_{is}$) qui tend à retenir le fluide à l'intérieur des capillaires. Même en condition physiologique, la force hydrostatique (vers l'extérieur) est supérieure à la force osmotique (vers l'intérieur), résultant en une filtration nette du fluide en dehors des capillaires (Murray 2011). Le liquide ainsi transporté est confiné au plan anatomique dans l'espace interstitiel, à travers lequel il se déplace, en fonction du gradient de pression créé, à partir du site de formation vers le site de résorption par les vaisseaux lymphatiques pulmonaires (Achour K. 2011). Ce liquide canalisé correspond à la lymphe pulmonaire qui rejoint la circulation veineuse soit directement par le canal thoracique (le principal vaisseau lymphatique) ou en transitant par les ganglions lymphatiques (points de relai) (Riquet et al. 1989). Ce processus est appelé drainage lymphatique.

b- Condition de déséquilibre : formation d'œdème

➤ **Définition de l'œdème pulmonaire**

L'œdème pulmonaire résulte de l'accumulation de liquide extravasculaire dans les poumons. En effet, le drainage lymphatique pouvant augmenter jusqu'à dix fois par rapport à sa valeur de base, l'œdème pulmonaire ne survient que si le taux de filtration des liquides dépasse largement le taux de résorption lymphatique (Murray 2011).

En théorie, une dérégulation au niveau de n'importe quel facteur de l'équation de Starling favoriserait l'augmentation de la filtration fluidique. Cependant, au niveau

clinique, deux composantes sont principalement impliquées dans la formation des œdèmes pulmonaires : l'augmentation de la pression capillaire hydrostatique P_{cap} , et la perte de l'intégrité endothéliale qui affecte à la fois le coefficient de perméabilité K_f et le coefficient de réflexion σ . Ces deux types d'altération de la barrière endothéliale permettent de distinguer deux types d'œdèmes pulmonaires : l'œdème hydrostatique et l'œdème lésionnel. En effet, si le dépassement du mécanisme de drainage lymphatique est dû à une augmentation considérable de la filtration suite à l'augmentation de la pression hydrostatique pulmonaire, l'œdème est nommé hémodynamique et il est donc transsudatif. Ce changement de pression peut résulter d'une défaillance du ventricule gauche d'où la nomination œdème cardiogénique qui peut aussi lui être attribué. Par contre, si la dérégulation résulte de lésions endothéliales, l'œdème est dit lésionnel (par augmentation de la perméabilité) et il est donc exsudatif (riche en protéines). C'est le cas des œdèmes formés lors des syndromes de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (Ware and Matthay 2005) dont le TRALI.

Les manifestations cliniques de ces deux types d'œdèmes se chevauchent ; les patients présentant une détresse respiratoire et une diminution de la pression partielle en oxygène. Afin de les différencier, des tests diagnostiques permettent d'orienter vers l'un ou l'autre. La mise en évidence d'une insuffisance ventriculaire gauche indique un œdème hémodynamique. L'élévation du taux du peptide cérébral natriurétique BNP (Brain Natriuretic Peptide) ou de l'un de ces précurseurs, le NT-proBNP, est aussi en faveur d'un tel œdème (Maisel et al. 2002). En effet, le BNP est une neurohormone produite par le myocarde en réponse et proportionnellement à sa dilatation et sa pression intracavitaire (Maeda et al. 1998). La présence des infiltrats bilatéraux diffus à la radiographie pulmonaire, en absence de problème cardiaque, et un liquide bronchoalvéolaire riche en protéines sont en faveur d'un œdème lésionnel. De plus, la mesure de la pression d'occlusion de l'artère pulmonaire PAOP (Pulmonary Arterial Occlusion Pressure) apporte un argument supplémentaire pour le diagnostic, cette dernière étant supérieure à 18 mmHg en cas d'œdème cardiogénique et inférieure ou égale à cette valeur en cas d'œdème lésionnel (Murray 2011).

➤ **Formation : séquence des évènements**

La séquence des évènements aboutissant à la formation de l'œdème pulmonaire est encore mal comprise dans ses détails. Une étude qui date des années 60,

réalisée par Staub et al. sur des chiens, décrit un scénario chronologique de cette formation (Staub et al. 1967). Pour Staub, les premières manifestations de l'œdème pulmonaire se traduisent par une apparition de fluide dans le tissu interstitiel autour des artérioles qui suivent les voies aériennes extra-alvéolaires (bronchioles) (Staub et al. 1967). Quand la fuite du liquide dépasse la capacité du drainage lymphatique, le liquide supplémentaire commence à s'accumuler dans la paroi alvéolaire pour finir par se déverser dans les alvéoles qui se remplissent d'une façon indépendante. En effet, l'examen histologique révèle que certaines alvéoles restent claires (remplies d'air) et d'autres, voisines, apparaissent rosâtres (remplies de liquide) (Figure 3). Ces modifications perturbent la fonction alvéolaire primaire : celle de maintenir un échange gazeux avec les capillaires. Ainsi, la perméabilité à l'oxygène diminue ce qui cause une chute de la pression partielle en oxygène sanguine et entraîne une détresse respiratoire. Des études plus récentes, basées sur des mesures en temps réel du développement de l'œdème pulmonaire dans un modèle expérimental chez le cochon (Gargani et al. 2007) et suite à des transplantations pulmonaires chez l'homme (Pottecher et al. 2017), sont en faveur de ce scénario. Dans ces travaux, l'hypoxémie baisse après que ne soient observées la chute de la compliance respiratoire statique et/ou l'augmentation du volume d'eau extravasculaire dans les poumons, ce qui indique que l'œdème interstitiel précède l'œdème alvéolaire.

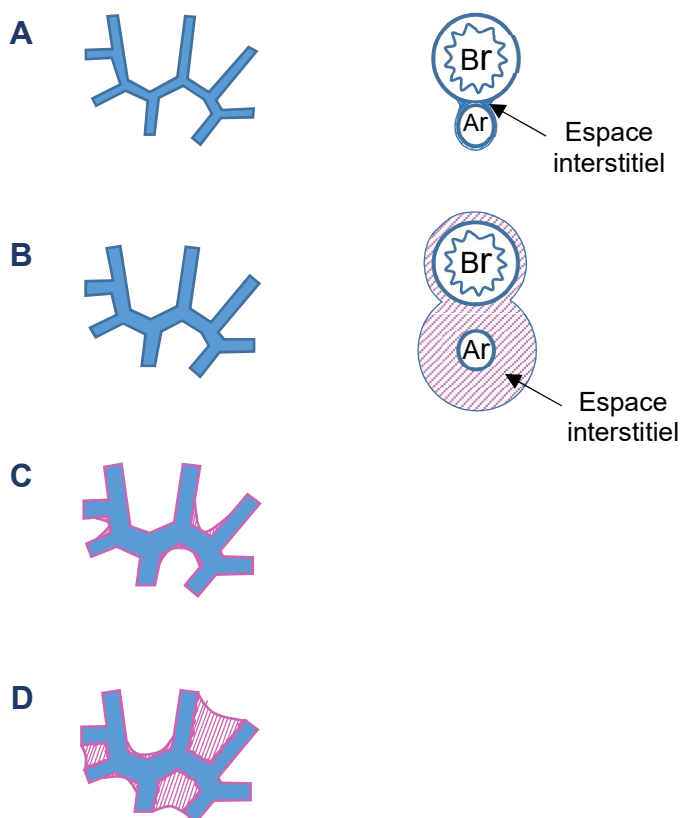


Figure 3 : Représentation schématique de la séquence d'accumulation du liquide durant un œdème pulmonaire aiguë (adaptée de Staub et al. 1967)

A- paroi alvéolaire normale, pas d'excès de liquide dans l'espace tissulaire péri-vasculaire.

B- début de la fuite du liquide vers l'espace interstitiel péri-vasculaire et autour des bronchioles. **C-** l'espace interstitiel saturé, l'œdème augmente dans la paroi alvéolaire et commence à envahir les alvéoles. **D-** remplissage des alvéoles.

Br, bronchiole ; Ar, artériole.

La suite de cette introduction n'abordera que la complication pulmonaire lésionnelle suite à la transfusion : le TRALI.

IV) Les différents types de TRALI

Depuis les années 1990, les TRALI sont classés en immunologiques –résultant d'un conflit immunologique entre le receveur et des alloanticorps présents dans les produits transfusés–, et non-immunologiques dans le cas où nous n'objectivons pas de conflit immunologique.

1) TRALI immunologique

Dans les premières études cliniques de Popovsky et al., en 1983 et 1985, la majorité des cas de TRALI est attribuée à la présence, dans les produits transfusés, d'alloanticorps dirigés contre les cellules du receveur. Ainsi, dans les cinq cas analysés en 1983 et dans 89% des 36 étudiés en 1985, de tels anticorps sont détectés chez les donneurs (Popovsky et al. 1983, Popovsky and Moore 1985). Ces alloanticorps sont dirigés contre les molécules d'histocompatibilité de classe I, HLA-A ou HLA-B (HLA pour Human Leukocyte Antigen), codés par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Par la suite, d'autres spécificités d'alloanticorps ont été identifiées, contre les molécules HLA de classe II (Kopko et al. 2001), ou contre les antigènes des neutrophiles humains « HNA » (Human Neutrophil Antigen) (Bux et al. 1996). Le risque qu'un plasma contenant des anticorps soit la cause du TRALI augmente avec le volume d'anticorps transfusé (la quantité des anticorps et leur avidité contribuant au risque de TRALI) (Toy et al. 2012).

1.1. TRALI et anticorps anti-HLA de classe I et II

Ces alloanticorps sont principalement détectés dans le plasma des femmes qui ont eu des enfants, et qui ont donc développé des alloanticorps contre des variants allogéniques de leurs enfants (Middelburg et al. 2010), et aussi chez des personnes ayant été transfusées ou ayant reçu une greffe d'organe. Chez les mères, les prévalences des anticorps anti-HLA classe I et II augmentent avec le nombre de grossesses (Middelburg et al. 2011). Une étude récente retrouve ces alloanticorps chez des donneurs masculins sans historique d'alloimmunisation apparent, suite à la détection d'anticorps anti-HLA dans 4 % des donneurs testés (12/335) (Nakamura et

al. 2017). Les donneurs peuvent être alloimmunisés contre les molécules HLA I seules, ou simultanément contre les molécules HLA I et II.

Les anticorps dirigés contre les molécules HLA de classe I sont plus rarement impliqués dans des événements de TRALI que ceux reconnaissant les molécules HLA de classe II (Chapman et al. 2009, Middelburg et al. 2011). Une explication proposée est que dans le sang, 90 % des antigènes HLA I sont sur les plaquettes ou sous forme soluble dans le plasma (Kao et al. 1988). Ces molécules solubles peuvent entrer en compétition avec les molécules HLA I exprimées par les leucocytes et les cellules endothéliales du receveur, et ainsi neutraliser l'activité pathogène des alloanticorps (Bux 2011).

1.2. TRALI et anticorps anti-HNA

La première description de réaction d'hypersensibilité pulmonaire suite à une transfusion de plasma contenant des anticorps anti-neutrophiles remonte à 1984 (Yomtovian et al. 1984), période où le terme TRALI n'est pas encore généralisé. Des études sérologiques ultérieures montrent que les anticorps anti-neutrophiles responsables de TRALI ciblent principalement trois récepteurs génétiquement polymorphes (Tableau 2) (Bux et al. 1996, Leach et al. 1998). Il s'agit de, HNA-1 (récepteur de faible affinité aux immunoglobulines G, le FcγRIIIb), HNA-2 (glycoprotéine NB1 ou CD177), et HNA-3a (SLC44A2 ou CTL-2, Choline Transporter-Like protein-2). HNA-1 et 2 ne sont exprimés que par les neutrophiles (Moritz et al. 2009), tandis que HNA-3a est exprimé non seulement par les neutrophiles mais aussi par les monocytes, les lymphocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales pulmonaires (Flesch et al. 2013) (Greinacher et al. 2010). Même si les anti-HNA-1 et anti-HNA-2 sont associés à des cas de TRALI (Reil et al. 2008, Chapman et al. 2009), les anti-HNA-3a restent ceux qui sont le plus fréquemment associés aux TRALI les plus sévères (Davoren et al. 2003, Reil et al. 2008).

Tableau 1: Principaux antigènes des neutrophiles impliqués dans le TRALI

(adapté de la revue d'Hématologie, volume 10, numéro 4, 2004)

Système	Antigène	Ancienne nomenclature	Fréquence antigénique
HNA-1	HNA-1a	NA1	58 %
	HNA-1b	NA2	88 %
	HNA-1c	SH	5 %
HNA-2	HNA-2a	NB1	97 %
HNA-3	HNA-3a	HNA-5b	97 %

1.3. TRALI inversés ou atypiques

Dans de rares cas, des receveurs alloimmunisés peuvent développer un TRALI (éventuellement fatal) après avoir reçu des concentrés de globules rouges contenant des neutrophiles, ou des transfusions de neutrophiles exempts d'alloanticorps (Wolf and Canale 1976, O'Connor et al. 1988, Bux et al. 1996, Sachs and Bux 2003). Dans ces situations, les alloanticorps anti-HLA ou anti-HNA du receveur reconnaissent les antigènes exprimés par les neutrophiles du donneur et ainsi ces derniers sont activés après la transfusion.

L'idée d'un rôle immunologique des neutrophiles dans les complications transfusionnelles remonte aux années 1950, avant même que le terme TRALI ne soit défini. En effet, suite à des expériences de transfusions humaines, Brittingham remarque que l'administration de leucoagglutinines (anticorps qui agglutinent les neutrophiles) dans le plasma d'un donneur, peut être fatale au receveur (Brittingham 1957). Peu de temps après, une 2^{ème} série d'observations révèle que l'élimination des leucocytes constitue un moyen de prévention contre les réactions post-transfusionnelles chez des patients alloimmunisés : des individus polytransfusés (et donc alloimmunisés) ne présentent pas de manifestations indésirables s'ils reçoivent du plasma préparé par centrifugation du sang, mais montrent de nouveau des réactions fébriles et de la fièvre si la fraction cellulaire éliminée par la centrifugation leur est administrée ultérieurement. Ces receveurs avaient bien des alloanticorps dirigés contre les leucocytes (Brittingham and Chaplin 1957). Nous pouvons donc raisonnablement

proposer que ces réactions, inexpliquées à l'époque, constituent les premières manifestations d'un TRALI inversé.

De rares cas de TRALI peuvent se produire suite à une incompatibilité entre le ou les produits transfusés. Un premier cas est celui d'un receveur, homozygote pour l'antigène HNA-1b, qui reçoit une poche de concentrés plaquettaires contenant des leucocytes et des anticorps anti-HNA-1a, préparée à partir de quatre donneurs. Les typages effectués après la survenue du TRALI montrent que deux donneurs expriment l'antigène HNA-1a. Les auteurs proposent donc que la fixation des alloanticorps sur les neutrophiles HNA-1a dans la poche de transfusion est la cause du TRALI (Lucas et al. 2000). Dans un deuxième cas, un patient polytransfusé développe les symptômes d'une détresse respiratoire suite à une transfusion de plaquettes contenant des anticorps anti-HLA qui réagissent non avec les lymphocytes du patient mais avec ceux présents dans une poche de globules rouges transfusée 24 heures plus tôt. Dans la mesure où les poches de globules rouges contiennent des lymphocytes pouvant circuler chez le receveur jusqu'à une semaine après transfusion (Schechter et al. 1977), et en absence de cause alternative, les auteurs en concluent, sans pouvoir le démontrer directement, que le TRALI résulte d'une incompatibilité inter-donneurs (Eastlund et al. 1988).

2) TRALI non-immunologique

Un TRALI qui survient en absence d'alloanticorps dans les produits transfusés –soit que des alloanticorps sont détectés mais leurs cibles sont absentes chez le receveur, soit qu'ils ne sont pas détectés– est classé dans la catégorie des TRALI non-immunologiques (Peters et al. 2015a, Toy et al. 2017). Une hypothèse raisonnable, mais sujet à discussion selon les études cliniques, est que l'altération des concentrés cellulaires en serait la cause.

2.1. La durée de stockage des produits transfusés

Il est certain que durant leur stockage, les produits sanguins cellulaires subissent des changements biochimiques et/ou métaboliques qui, d'une part, affectent la survie et la fonction des cellules après leur transfusion et donc leur qualité transfusionnelle, et d'autre part, altèrent les propriétés biologiques du milieu de conditionnement qui acquiert alors des propriétés pro-inflammatoires. Les paramètres de stockage sont

donc adaptés avec un maximum de 35 à 42 jours pour les globules rouges et 5 à 7 jours pour les plaquettes afin d'assurer une bonne efficacité post-transfusionnelle (Hess 2014). Néanmoins, ces conditions optimisées de stockage n'empêchent pas le vieillissement des concentrés cellulaires, qui produisent au cours du temps des molécules bioactives, regroupées sous le nom de modificateurs de la réponse biologique « BRMs » (Biologic Response Modifiers) (Silliman et al. 1997) (Silliman et al. 2003b).

2.2. Les médiateurs solubles « BRMs »

Le rôle délétère des BRMs vis-à-vis des réactions post-transfusionnelles de faible gravité est documenté (Cognasse et al. 2016, Garraud et al. 2016), mais leur importance dans le TRALI non immunologique fait débat. Des modèles expérimentaux soutiennent ce rôle, d'autres le remettent en question (Silliman et al. 1997, Silliman and McLaughlin 2006, Vlaar et al. 2010a). L'accumulation dans les poches de concentrés plaquettaires ou de globules rouges de sphingolipides (McVey et al. 2017), de lysophosphatidylcholines (lyso-PCs) et de lipides non polaires (l'acide arachidonique et ses dérivés les acides hydroxyeicosatétraénoïques : 5-HETE, 12-HETE et 15-HETE) (Silliman et al. 2011, Peters et al. 2017), est bien documentée. Néanmoins, les études cliniques, rétrospective et prospective, sont contradictoires quant à leur implication dans le développement du TRALI. Ainsi, un groupe américain montre que des lyso-PCs sont présents dans des produits de transfusion ayant provoqué un TRALI chez 10 personnes (Silliman et al. 1997). Inversement, dans une étude prospective comportant 486 patients transfusés dont 16 ont développé un TRALI, un groupe européen observe que la présence des lyso-PCs dans les produits transfusés ne constitue pas un facteur de risque déterminant pour la survenue du TRALI (Vlaar et al. 2011). De même, les américains sont en faveur d'un rôle des lipides non polaires dans la survenue du TRALI (Silliman et al. 2011), alors que les européens ne retrouvent pas ce lien (Peters et al. 2017). Cette discordance pourrait s'expliquer par des différences dans les processus de préparation des produits sanguins et leurs conditions de stockage (Sparrow et al. 2014).

Une comparaison de ces différents cas est présentée sous forme de tableaux récapitulatifs dans la revue de Peters (Peters et al. 2015a) et reprise sous forme modifiée dans la figure 4 afin de ne regrouper que les données des études cliniques.

	Type	Population	Country	Year	Role for aging blood product?		Role for accumulation of LysoPCs?
					RBCs	PLTs	
Silliman 2003	Prospective, active	Hospital	Canada	1991–1995	No	Yes	Yes
Vlaar 2010	Retrospective, active	ICU	The Netherlands	2004–2007	No	No	–
Gajic 2007	Prospective, active	ICU – medical	USA	2005–2007	No	No	Yes
Vlaar 2010	Prospective, active	ICU	The Netherlands	2006–2009	Yes	No	No
Middelburg 2012	Retrospective, passive	National	The Netherlands	2005–2007	No	Yes	–
Toy 2012	Prospective, active	Regional	USA	2006–2009	No	No	No

RBCs = red blood cells, PLTs = platelets.

Figure 4 : Rôle des médiateurs solubles dans la survenue du TRALI suite aux études cliniques (adaptée de Peters et al. 2015a)

Parmi les substances libérées lors du stockage des produits sanguins, la forme soluble du CD40L (sCD40L) s'accumule au cours du temps dans les concentrés plaquettaires (jusqu'à 12 ng/mL) (Phipps et al. 2001, Wenzel et al. 2011). Elle est générée par clivage protéolytique du récepteur membranaire CD40L. Cette molécule peut activer les cellules endothéliales qui expriment son récepteur, le CD40, en induisant l'expression de molécules d'adhésion, et ainsi, par ce rôle pro-inflammatoire, pourrait participer au TRALI. Cependant, sa concentration n'augmente pas de façon significative dans le plasma des personnes transfusées qui ont fait un TRALI, même si les produits responsables du TRALI présentaient des concentrations significativement supérieures à celles dans les produits contrôles (Khan et al. 2006). D'autre part, une seconde étude rétrospective sur des personnes ayant subi une chirurgie cardiaque enregistre plutôt une diminution importante de la concentration plasmatique de sCD40L après chirurgie cardiaque (≈ 280 pg/mL avant vs ≈ 90 pg/mL après chirurgie), qu'il y ait eu ou non TRALI, et ceci suite à une chute dans le compte plaquettaire (Tuinman et al. 2011). Même si le sCD40L, en raison de ses propriétés immunostimulantes, peut présenter une piste intéressante (Tariket et al. 2016), la majorité des études suggère que ce dernier n'est pas impliqué dans la survenue du TRALI (Peters et al. 2015a).

V) Modélisation de la pathogénèse

Pour expliquer la survenue des TRALI, deux modèles de pathogénèse sont proposés.

1) Modèle de TRALI à deux évènements « two-hit »

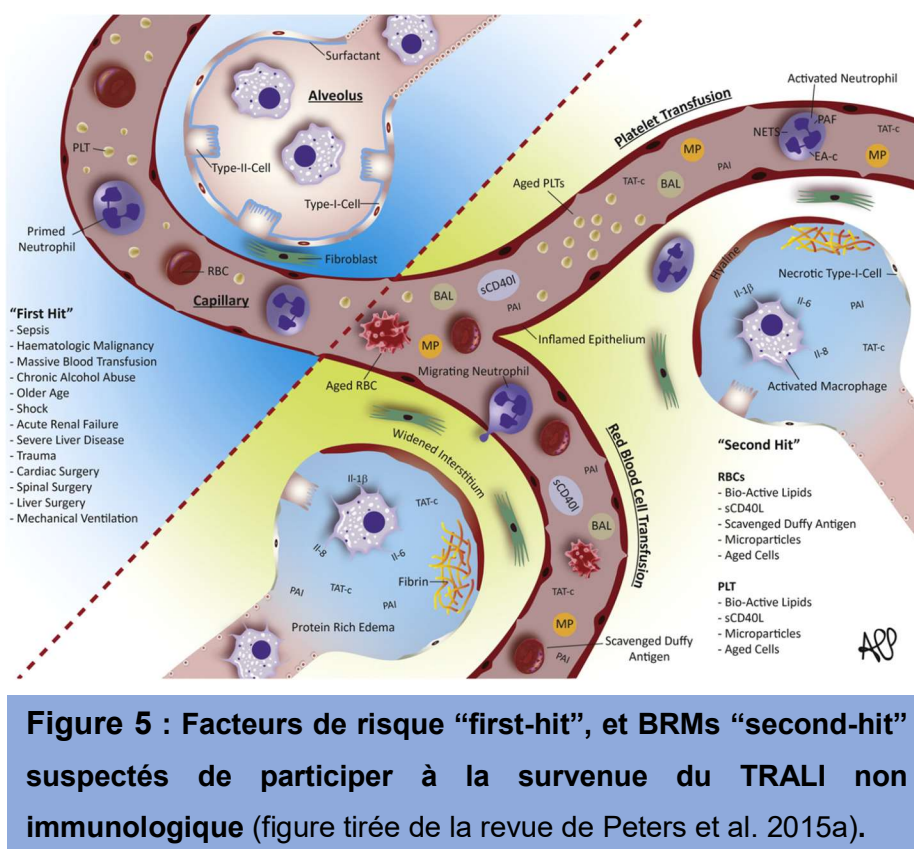
Un premier paradoxe est que la présence d'alloanticorps chez le donneur et l'existence des antigènes correspondants chez le receveur, n'entraînent pas nécessairement un TRALI (Toy et al. 2004). En effet, certains donneurs réguliers alloimmunisés, ont des anticorps contre des antigènes fréquents (anti-HLA classe I et classe II, anti-HNA-3a). Même si le risque de conflit immunologique avec des receveurs est donc théoriquement important, dans les faits, peu de cas de TRALI sont observés, et si tel est le cas, c'est après un nombre relativement important de transfusions (Silliman et al. 2009) (Kopko et al. 2002, Maslanka et al. 2007). Ces observations suggèrent que les conditions physiopathologiques du patient jouent un rôle facilitateur (Van Buren et al. 1990).

Une observation illustrant bien cet état de fait est celle d'une étude rétrospective concernant un donneur impliqué dans un cas de TRALI. Les investigations réalisées suite à ce TRALI, montrent que le donneur possède des alloanticorps anti HLA I et II hautement polyréactifs. Parmi les 103 personnes transfusées avec les produits issus de ce donneur, seulement une a développé un TRALI. Pourtant, parmi les 55 personnes dont le typage HLA est connu, 54 d'entre-elles expriment des molécules HLA reconnues par les anticorps détectés chez le donneur, mais aucune n'a développé de TRALI (Toy et al. 2004).

De même, la présence de molécules bioactives n'entraîne pas forcément un TRALI, et donc, l'état clinique du receveur constituerait un facteur de risque nécessairement associé.

Ces données conduisent Silliman et al. à proposer l'hypothèse selon laquelle le TRALI surviendrait suite à deux évènements ou « two-hit model », le premier évènement étant l'état inflammatoire du patient et le second la transfusion d'un produit sanguin pathologique (Silliman et al. 1997). En accord, les patients admis en unités de soins intensifs, et donc en état clinique critique, présentent un risque accru pour ce syndrome (Gajic et al. 2007). Des études plus larges ont permis de proposer une liste non exhaustive des facteurs de risque pouvant être considérés comme un premier évènement ou « first-hit », à savoir les cancers hématologiques, les maladies cardiovasculaires et chirurgie cardiaque, le sepsis, la pneumonie, l'aspiration gastrique,

les traumatismes, les polytransfusions, la ventilation mécanique, les maladies chroniques du foie et des reins liées à l'alcoolisme, et l'état de choc (Rana et al. 2006, Vlaar et al. 2011, Toy et al. 2012). Cette liste souligne l'absence d'un facteur de risque discriminant, et le fait que nous manquons d'une définition tranchante d'un patient « à risque ». Le deuxième événement ou « second-hit » provoquant le TRALI est la transfusion de produits contenant des alloanticorps ou des BRMs. Un récapitulatif des facteurs prédisposant ainsi que des BRMs qui peuvent être impliqués dans le TRALI non-immunologique sont représentés dans la figure 5, prise de la revue de Peters (Peters et al. 2015a).



2) Modèle de seuil ou « threshold model »

Le modèle en deux événements postule l'existence d'un état pathologique sensibilisant, toutefois, un TRALI peut aussi survenir chez des volontaires sains. Ces accidents transfusionnels sont observés dans deux études indépendantes dont le but est d'établir une méthode permettant de bloquer des processus pathologiques ou indésirables de destruction des cellules par des alloanticorps (par exemple au cours

de processus d'incompatibilité foëto-maternelle ou lors de transfusions réfractaires). Il s'agit d'études expérimentales chez l'Homme qui tente de confirmer *in vivo*, la capacité d'alloanticorps particuliers à bloquer la fonction des récepteurs aux immunoglobulines G (FcγR), propriété établie *in vitro*. Dans le premier un cas, l'injection d'un concentré de gamma globulines chez un volontaire sain provoque un œdème pulmonaire sévère ; il s'avèrera *a posteriori* que la préparation d'immunoglobulines contient des alloanticorps anti-HLA I et II (Dooren et al. 1998). Dans le second cas, un plasma contenant des anticorps anti-HLA II (anti-HLA-DR) est transfusé deux fois à quelques heures d'intervalle à un volontaire, le TRALI se produit rapidement après la deuxième transfusion ; les auteurs proposent que la première transfusion a constitué l'évènement sensibilisant (Flesch and Neppert 2002).

Pour expliquer pourquoi le risque de TRALI immunologique est bien inférieur à la fréquence anticipée de conflit immunologique, et que le TRALI peut avoir lieu chez des personnes en bonne santé, un modèle de dépassement de seuil d'induction d'une réponse ou « threshold model », est proposé en 2007 (Bux and Sachs 2007). Ce seuil pourrait être franchit lorsqu'un produit fortement pathogénique (concentration élevée des alloanticorps, forte affinité/avidité pour leurs antigènes) est transfusé, même si le receveur ne présente pas un état inflammatoire. Inversement, un produit faiblement pathogénique suffirait pour le dépassement de seuil si le receveur se trouve dans un état critique (cellules activées par l'état inflammatoire). Ainsi, ce modèle développe et affine celui à deux évènements : le TRALI dépend aussi de l'état clinique du receveur (l'équivalent du « first-hit ») et de l'activité biologique des médiateurs du TRALI dans le produit transfusé (l'équivalent du « second-hit »). Un schéma représentatif de ce modèle est présenté dans la figure 6, modifiée de Bux et al. 2007 (Bux and Sachs 2007).

Un deuxième groupe propose un modèle plus complexe, en partant du principe de seuil, et qui considère le TRALI comme un évènement multifactoriel et non pas bifactoriel. Il met en avant que plusieurs facteurs de risque peuvent se cumuler pour le franchissement du seuil, ce qui n'est pas clairement proposé par le modèle de Bux (Middelburg and van der Bom 2015).

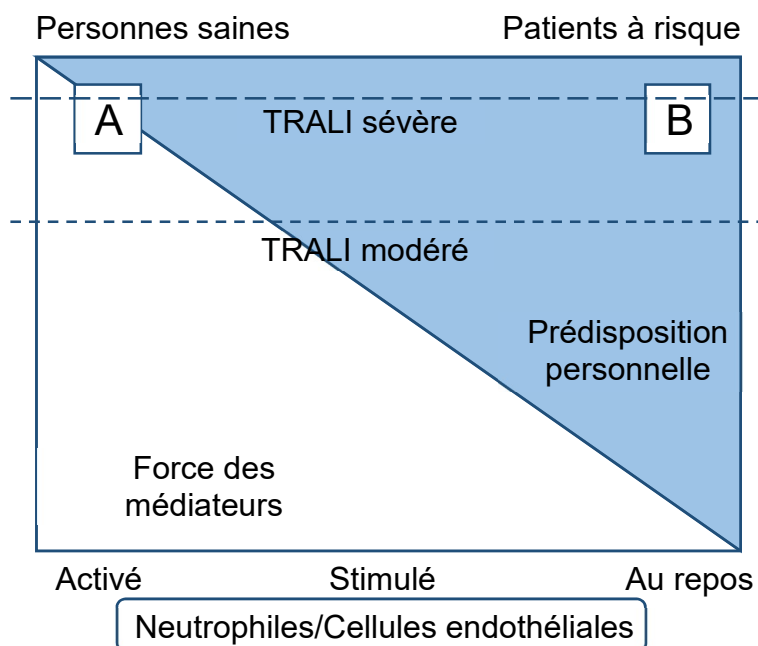


Figure 6 : Modèle de seuil ou « threshold »

Le seuil du TRALI modéré, où l'oxygénation suffit pour le rétablissement, est inférieur à celui du TRALI sévère, où les patients ont besoin d'une ventilation mécanique (lignes horizontales). Pour dépasser ces seuils, plusieurs paramètres sont mis en jeu. Ces paramètres peuvent être résumés en : force des médiateurs transfusés (triangle blanc) et les facteurs de prédisposition personnelle (triangle bleu). La force des produits transfusés dépend de leur capacité à activer les neutrophiles et les cellules endothéliales. Les facteurs de prédisposition couvrent l'état général de morbidité du patient. Ainsi, un produit transfusé qui induit une forte activation des cellules, peut conduire à un TRALI même si les facteurs de prédisposition sont bas, ex. receveur sain (A). D'autre part, chez un patient à risque, la transfusion d'un produit d'une faible force est suffisante pour dépasser le seuil (B).

VI) Épidémiologie du TRALI

1) Au niveau international

La fréquence du TRALI estimée par Popovsky et al. était de 1/5000 produits transfusés (Popovsky and Moore 1985), mais d'autres estimations, en fonction des méthodes d'analyse, sont proposées par la suite. Cette disparité est surtout liée à la différence entre les critères d'inclusion des patients dans le calcul de l'incidence : alors que certaines études prennent en compte tous les patients transfusés confondus, en comptabilisant parmi eux ceux qui ont développé un TRALI, d'autres ne tiennent compte que des patients transfusés ayant subi une intervention chirurgicale, et répertorient aussi les cas de TRALI possibles. Ainsi, pour deux études faites à la même clinique Mayo aux États-Unis, la

première estime que la fréquence du TRALI est comprise entre 1/4 000 et 1/12 000 produits transfusés (Toy et al. 2012), alors que la deuxième évoque une fréquence bien plus importante de 1.3 à 1.4 % (Clifford et al. 2015), mais parmi les patients ayant subi une intervention chirurgicale (non cardiaque, sous anesthésie générale, et ayant été transfusés pendant l'opération). Les cliniciens n'étant pas tous suffisamment familiers avec ce syndrome, il est possible que bon nombre de TRALI non graves (ne nécessitant pas de ventilation mécanique) ne soient pas déclarés aux réseaux d'hémovigilance. En effet, lors d'une étude prospective évaluant les effets de la transfusion de plasmas provenant de femmes multipares (plus de 3 grossesses) comparés à des plasmas contrôles (hommes et femmes nullipares, les 2 groupes sans antécédent de transfusion), les auteurs effectuent des analyses cliniques et immunologiques poussées afin de détecter la moindre réaction post-transfusionnelle (Palfi et al. 2001). Ces analyses montrent que la transfusion de plasmas des femmes multipares augmente d'une façon significative la concentration de TNF- α plasmatique (cytokine pro-inflammatoire) et induit une hypoxémie chez les receveurs. Ces observations sont communes à tous les receveurs, même ceux n'ayant pas développé les signes cliniques permettant de les classer dans la catégorie de personnes ayant eu un TRALI (pas de fièvre ni de frissons, et pas de détresse respiratoire visible) (Palfi et al. 2001), et suggèrent donc la présence de réactions post-transfusionnelles légères qui peuvent passer inaperçues en absence de signes cliniques visibles. De plus, l'accident transfusionnel peut être parfois classé de façon erronée en tant que TACO. La fréquence réelle du TRALI serait ainsi sous-évaluée (Bux 2005).

Les déclarations de TRALI sont par ailleurs très hétérogènes selon les pays et varient aussi de façon drastique selon la méthode d'évaluation appliquée : à l'échelle nationale ou régionale, inclusion ou non des patients de plusieurs hôpitaux et ciblage ou non de groupes spécifiques de patients (Andreu et al. 2018). Cette hétérogénéité est illustrée par le tableau 3 regroupant les chiffres les plus marquants en terme de divergence, et qui montrent clairement que l'incidence du TRALI varie entre les pays, pouvant aller de 2.6/10⁶ à 17.6/10⁶ produits transfusés (adapté de (Andreu et al. 2018)).

Tableau 2 : Incidence de TRALI, données hétérogènes selon les pays (adapté de (Andreu et al. 2018)).

Pays	Année de publication	Nombre de TRALI	Nombre de produits transfusés (PT)	Incidence de TRALI / millions de PT
Canada (sauf Québec)	2013	16	909 595	17,6
Canada (Québec)	2013	4	341 024	11,7
Suisse	2014	5	358 343	14
Pays Bas	2014	6	565 136	10,6
Nouvelle Zélande	2014	1	136 995	7,3
Australie	2013	4	1 062 434	3,8
Royaumes Unis	2014	10	2 758 495	3,6
Allemagne	2014	14	5 337 947	2,6

Le TRALI reste l'une des premières causes de décès suite à des complications transfusionnelles aux États-Unis (34 % des décès suite à des transfusions font suite à un TRALI ou TRALI possible soit 64 décès), comme l'indique le rapport de la FDA (Food and Drug Administration) sur les années 2012 à 2016. Un pic de cas rapportés a été observé entre 2004 et 2007, et il peut être associé à l'émergence de la sensibilisation à ce risque transfusionnel parmi les cliniciens hospitaliers. Cependant, une diminution de son incidence est remarquée à partir de 2012, le nombre de décès à cause d'un TRALI suivant un plateau depuis. Une première raison de cette baisse est la meilleure compréhension des mécanismes du TRALI qui a conduit à la mise en place des mesures de prévention qui seront détaillées plus loin, et ainsi à améliorer les pratiques transfusionnelles ces dix dernières années (FDA 2016). Par ailleurs, un meilleur suivi des receveurs au moment de la transfusion tend à mieux déceler des événements non graves qui étaient négligés auparavant et ainsi, à diminuer le pourcentage de mortalité suite à un TRALI.

2) Au niveau français

Le TRALI est ajouté à la liste des rapports du réseau d'hémovigilance française en 2001, suite à une lettre adressée par la FDA américaine aux différents organismes de la santé dans le monde, alertant sur l'importance du TRALI en tant que réaction grave de la transfusion (Zoon 2011). Les cas reportés suivent la description du consensus de Toronto en 2004 et sont divisés en trois groupes : TRALI anticorps-positifs, TRALI anticorps-négatifs et TRALI possibles. Une analyse fine des données de l'hémovigilance publiée récemment inclut les éléments collectés entre 2007 et 2013 (Andreu et al. 2018). Dans ce rapport, 378 cas de TRALI sont rapportés pour 20 373 181 produits transfusés donnant ainsi une fréquence de $18.7/10^6$. La majorité d'entre eux (66 %) est associée à des transfusions de concentrés de globules rouges. Parmi ces 378 cas, 20 % appartiennent au groupe TRALI immunologique, 26 % au groupe TRALI non-immunologique et 54 % au groupe TRALI possible. Les auteurs ne trouvent pas de différence dans la sévérité du TRALI immunologique en fonction de la spécificité des alloanticorps anti-HLA mis en jeu (anti-HLA classe I ou II ou présence simultanée des deux types d'anticorps) ; la présence des anti-HNA n'étant documentée que dans 12 % des cas, avec un seul cas de TRALI rapporté avec un anti-HNA-3a, aucune information statistique ne peut être associée pour ce type d'alloanticorps.

Il est important de noter qu'à la suite de la mise en place des procédures préventives, une baisse significative est observée depuis 2012 pour atteindre en 2015 une incidence de 6 pour 10^6 produits transfusés (seulement 20 cas de TRALI dont un seul est immunologique) (ANSM 2016), incidence maintenue en 2016 ($6.4/10^6$) (ANSM 2017) (Figure 7).

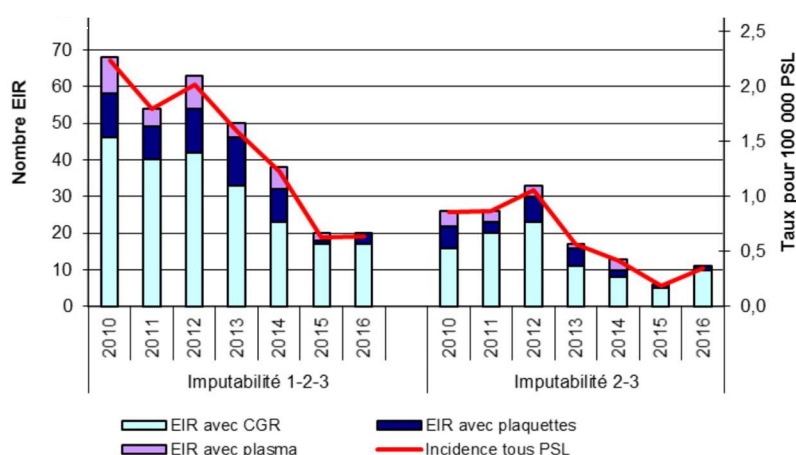


Figure 7 : Rapport ANSM 2016 sur l'incidence de TRALI

EIR : Événements Indésirables Receveurs ; PSL : Produits Sanguins Labiles ; CGR : Concentrés de Globules Rouges

VII) Les méthodes de prévention et leur impact sur l'incidence du TRALI

Les règles de préparation et de distribution des produits de transfusion ne sont pas identiques dans tous les pays, voire entre les régions pour la France de façon temporaire, le temps de valider les innovations, ce qui rend difficile les comparaisons. Une démarche préventive commune est l'éviction des donneurs dont un produit sanguin a été impliqué dans un TRALI. De plus, les efforts pour atténuer la fréquence de TRALI se sont focalisés sur le TRALI immunologique en se basant sur le rôle important de la présence des alloanticorps véhiculés par une classe de donneurs (Peters et al. 2015b) et de la sévérité du TRALI associé (Eder et al. 2007). Dans ce qui suit, une description des différentes mesures de prévention ainsi que de leur impact sur l'incidence du TRALI dans les pays européens (en détaillant à part le cas de la France), les Etats Unis et le Canada.

1) Exclusion des donneuses pour les dons de plasmas

L'étude suédoise sur le potentiel pathologique des plasmas de donneuses multipares qui sont immunisées pendant les grossesses (Palfi et al. 2001) (voir paragraphe VI-a : Épidémiologie du TRALI au niveau international), conduit le « National Blood Service » anglais à introduire en 2003 l'utilisation exclusive des donneurs masculins pour la préparation des plasmas frais congelés (PFC) (male-only plasma strategy). Cette mesure entraîne une diminution drastique du nombre des cas de TRALI déclarés au système britannique d'hémovigilance des transfusions « SHOT » (Serious Hazards Of Transfusion), en passant d'une incidence de $15.5/10^6$ PFC (1999-2003) à $3.2/10^6$ (2004-2006) (Chapman et al. 2009). Par la suite, cette règle est mise en place en 2007 aux Pays Bas, ce qui permet une diminution de 33 % du nombre de TRALI (Wiersum-Osselton et al. 2011, Muller et al. 2015). En Allemagne, l'instauration en 2008-2009 de l'exclusion des femmes ayant eu des enfants des dons de plasmas permet aussi de diminuer l'incidence du TRALI (Funk et al. 2012), tout comme aux États-Unis (Eder et al. 2010, Schmickl et al. 2015) et au Canada (Lin et al. 2012).

2) Tests de dépistage des anticorps dans les produits sanguins

En 2009, l'International Society of Blood Transfusion « ISBT » propose de dépister les anticorps anti-leucocytes dans les produits de transfusion, pour identifier puis exclure les donneurs ou les donneuses alloimmunisés et ainsi diminuer le risque du TRALI immunologique (Immunobiology et al. 2009, Triulzi et al. 2009). Même si le dépistage des anticorps s'avère efficace, cette mesure présente quelques limites au niveau de la

standardisation des méthodes de détection des anticorps entre les différents laboratoires, et il n'existe pas de consensus quant au seuil à partir duquel le produit transfusionnel présente un risque patent. Sans oublier que l'avidité des anticorps participe au risque de TRALI, soulevant la pertinence clinique de tel ou tel anticorps détecté, et que des études montrent que ces alloanticorps sont présents chez une proportion relativement importante de donneurs non exposés à une alloimmunisation (2% anti-granulocytes, 7% anti-HLA). Il existe donc des différences importantes selon les pays vis-à-vis de la mise en œuvre de cette pratique.

Au Royaume-Uni, le dépistage des alloanticorps est en place, par le National Health Service Blood and Transplant « NHSBT », pour sélectionner uniquement les personnes négatives en alloanticorps anti-HLA et anti-HNA pour les dons de plaquettes par aphérèse. Les donneuses testées positives pour la présence des anti-HLA peuvent néanmoins être sollicitées pour un don de globules rouges qui sont repris dans une solution additive et c sont donc appauvris en plasma. Les femmes positives pour la présence des anti-HNA sont exclues de tout type de don à visée transfusionnelle. Cette mesure de dépistage, en plus de l'exclusion des donneuses pour le plasma, permet de diminuer davantage le risque de TRALI (Lucas et al. 2012). Aux Pays Bas et au Canada, cette détection n'est pas mise en routine, (Reesink et al. 2012), la stratégie de plasmas provenant seulement de donneurs hommes pour les dons de plasmas et la préservation des concentrés plaquettaires étant assez efficace pour diminuer le risque. En Allemagne, seules les femmes ayant eu des enfants sont testées, si des anti-HNA sont détectés, elles sont exclues du don de plaquettes et de sang total. Ces mesures préventives se sont avérées efficaces pour diminuer le nombre de TRALI (Funk et al. 2012). Aux États-Unis, Ces mesures, mises en place récemment, ont permis de réduire d'environ 60 % le risque de TRALI associé à la transfusion de plaquettes issues d'aphérèse (Eder et al. 2016).

3) Mélange de plasmas de plusieurs donneurs et traitement par solvant/détergent

Le traitement solvant/détergent (S/D) permet de diminuer le risque d'infections virales. Certains organismes de transfusion ont aussi adopté cette technique pour diminuer le risque du TRALI. En effet, le plasma S/D est formé d'un pool de 500 à 1600 dons, ce qui permet donc de diluer les alloanticorps susceptibles d'être présents dans certains plasmas à transfuser ou de les neutraliser par les antigènes solubles dans le mélange, lorsqu'il s'agit d'alloanticorps anti-HLA de classe I (Muller et al. 2012) ; ces alloanticorps ne sont pas détectables dans les plasmas S/D (Sinnott et al. 2004). En accord, en Allemagne, une

étude s'avère incapable de détecter des alloanticorps anti-HLA et anti-HNA dans 20 lots indépendants de plasmas traités S/D (Sachs et al. 2005). Au Royaume-Uni, aucun cas de TRALI n'est déclaré au service d'hémovigilance SHOT suite à l'utilisation de ces préparations de plasma.

4) Leuco-réduction (filtration) et lavage des cellules sanguines

Les produits sanguins sont filtrés afin de réduire le nombre de leucocytes sous des seuils qui permettent d'éviter l'alloimmunisation, un problème crucial pour les personnes multitransfusées. Cette filtration permet aussi de diminuer le risque de transmission des virus intracellulaires dont le cytomégalovirus et par ailleurs, l'accumulation des cytokines produites par leucocytes, et du sCD40L en raison de l'élimination des plaquettes résiduelles dans les concentrés de globules rouges (Bilgin et al. 2011, Silliman et al. 2011). Cette technique a permis ainsi d'empêcher la survenue du TRALI inversé dû à la reconnaissance des antigènes des leucocytes du donneur par les anticorps du receveur. Une étude rétrospective, sur la période 1994-2007 aux États-Unis, met en évidence une diminution de l'incidence du TRALI (néanmoins statistiquement non significative) suite à la leuco-réduction (Blumberg et al. 2010). Un autre moyen de prévention est le lavage des cellules avant de les transfuser (déplasmatisation). Ce lavage permet d'éliminer les cellules en apoptose, les alloanticorps ainsi que les BRMs qui peuvent s'accumuler lors du stockage (Peters et al. 2015a). Cette idée de lavage pour prévenir du TRALI est suggérée par Silliman, et validée dans un modèle animal de transfusion (Silliman et al. 2014). L'efficacité de cette technique a été testée sur des poches de globules rouges : les BRMs et les débris cellulaires sont éliminés tout en gardant un taux d'hémoglobine libre en-dessous du seuil et une capacité des globules rouges à se déformer (de Vroege et al. 2007). Cette méthode présente néanmoins deux limites, son organisation et son coût. En effet, le lavage peut être envisagé pour des procédures chirurgicales programmées, ce qui ne regroupe pas toutes les transfusions (Silliman and McLaughlin 2006), les poches, une fois lavées, ne peuvent être conservées que pendant 24 heures (Warner et al. 2017), et toute transformation des PSL augmente le risque de rupture de la stérilité puisqu'il faut connecter des poches de transfert et de conservation qui ne sont pas prévues aujourd'hui dans les dispositifs médicaux à usage unique.

5) Utilisation des solutions additives pour les plaquettes

Les solutions additives des plaquettes « PAS » (Platelet Additive Solutions) sont des solutions isotoniques utilisées pour améliorer les conditions de stockage des plaquettes. Elles sont aussi compatibles avec les traitements photochimiques utilisés pour inactiver les pathogènes dans les concentrés plaquettaires (Murphy 1999, Gulliksson 2003). Ainsi, la quantité de plasma dans les poches de plaquettes PAS est réduite à 30-35%. Sur le plan des réactions post-transfusionnelles indésirables, les solutions additives présentent l'avantage de réduire considérablement la quantité de plasma injectée avec les plaquettes (Cohn et al. 2014). Les quantités de protéines plasmatiques et d'alloanticorps dans les poches PAS sont largement inférieures à ceux de plaquettes issues d'aphérèse (100 % plasma) (Weisberg et al. 2018). Cette mesure devrait logiquement faire baisser l'incidence du TRALI immunologique, même si des TRALI peuvent être provoqués par l'administration d'érythrocytes ou de plaquettes contenant 10 à 20 mL de plasmas résiduels (Win et al. 2008). Les PAS ne sont utilisés au Royaume-Uni qu'à partir de 2015, et ont permis de réduire les réactions allergiques (pas d'étude sur l'incidence de TRALI). Aux Pays Bas, les concentrés plaquettaires provenant de 5 donneurs sont préparés dans un mélange de 30 % plasma et 70 % de PAS (Reesink et al. 2012), permettant de réduire tout type de réactions post-transfusionnelles confondues. Toutefois, dans les faits, cette mesure n'a pas permis de diminuer le risque de TRALI de façon significative, probablement en raison de la bonne efficacité des mesures d'exclusion des donneuses pour la préparation des concentrés plaquettaires (van Hout et al. 2018).

➤ Cas de la France

En France, les individus déjà transfusés sont exclus du don depuis 1997, et donc le risque d'induire un TRALI immunologique à cause de la présence d'alloanticorps, chez ce groupe de personnes, est éliminé. Depuis 1998, tous les concentrés de globules rouges, les plaquettes et les plasmas subissent une leuco-réduction ($<10^6$ leucocytes résiduels par litre pour les CGR et les CP, $<10^4$ leucocytes pour les PFC). De plus, deux mesures préventives majeures sont en place au niveau national depuis 2010 : 1) les plasmas PFC et les concentrés plaquettaires d'aphérèse CPA proviennent uniquement de donneurs hommes, femmes nullipares ou femmes multipares testées négatives pour la présence d'alloanticorps, 2) les dons de sang total de donneuses positives pour la présence d'alloanticorps sont exclusivement destinés aux transfusions de globules rouges.

L'efficacité de ces deux mesures a été validée en comparant la survenue des TRALI entre les périodes antérieure (2007-2009) et postérieure (2011-2013) à leur application (Andreu et al. 2018). En ce qui concerne les TRALI immunologiques, une diminution importante est observée pour les CP d'aphérèse et les PFC (respectivement $21/10^6$ et $15/10^6$, avant, $0/10^6$ après, pour ces deux types de produits), ce qui n'est pas le cas des CP issus de mélange de buffy coats, BCPC (Buffy Coat Platelet Concentrate) ($5.1/10^6$ avant et $4.4/10^6$ après). Néanmoins, tout TRALI confondu (immunologique, non immunologique et TRALI possible), l'impact des mesures de prévention n'est pas significatif ($17/10^6$ avant et $18.1/10^6$ après). Ces mesures ont donc permis de limiter le nombre de TRALI immunologiques. Une meilleure définition des TRALI non immunologiques et possibles, qui peuvent dépendre de l'état pathologique critique du receveur et non pas de la transfusion elle-même, et qui seraient ainsi confondus avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë, permettrait une meilleure interprétation de l'effet des approches utilisées pour réduire l'incidence du TRALI (Andreu et al. 2018).

Il ne faut pas oublier que cette étude ne couvre que les données jusqu'à l'année 2013, en sachant qu'une réelle tendance à la diminution n'est observée qu'à partir de 2012. Un maximum de baisse de l'incidence est observé en 2015 et 2016 d'après les derniers rapports de l'ANSM, pour atteindre l'incidence de $6.4/10^6$ (tout TRALI confondu), comparée à celle de $18.1/10^6$ enregistrée entre 2011 et 2013 (voir paragraphe VI-2, épidémiologie de TRALI au niveau français). Ces mesures se sont donc avérées efficaces à long terme.

VIII) Traitement

Jusqu'à présent, il n'existe pas de traitement spécifique du TRALI ; la prise en charge, une fois la détresse respiratoire installée, est similaire à celle d'un œdème lésionnel du poumon dans le cadre des syndromes de détresse respiratoire aiguë. Les patients nécessitent alors une oxygénothérapie, avec 70% à 90 % des cas qui ont besoin d'une assistance respiratoire par ventilation mécanique, parfois invasive (Moore 2006, Vlaar and Juffermans 2013). Le traitement diurétique ou vasodilatateur n'a pas d'intérêt en absence de signes de surcharge vasculaire parce que l'œdème est lésionnel, et les corticostéroïdes n'ont pas fait la preuve de leur intérêt (Bux 2005, Silliman and McLaughlin 2006) .

IX) Mécanismes du TRALI : hypothèses cliniques et validation *in vitro*

La faible incidence du TRALI et sa survenue imprévisible rendent difficile la mise en place d'études prospectives chez l'Homme. De ce fait, les études sur les mécanismes du TRALI chez l'Homme sont limitées. Il existe des données histologiques de personnes décédées suite à un TRALI, néanmoins ces données sont restreintes, et les observations des coupes de poumons sont parfois contradictoires en raison de l'existence de facteurs confondants associés à l'état du receveur, les mesures de traitement/réanimation mises en place, et le laps de temps entre le décès et les éventuels prélèvements. Alors que certains notent la présence d'agrégats leucocytaires intravasculaires et d'une hémorragie intra-alvéolaire, d'autres ne retrouvent pas ces événements ou ne les notent pas (Dry et al. 1999). Néanmoins, la présence d'œdèmes interstitiels et alvéolaires accompagnée d'une extravasation des neutrophiles dans les espaces interstitiel et aérien, avec une augmentation du nombre de neutrophiles dans la microcirculation pulmonaire et les petits vaisseaux sont communément observées (Silliman et al. 1997, Dry et al. 1999). Les coupes de microscopie électronique sur des prélèvements obtenus huit heures après la mort peuvent montrer la présence de neutrophiles dégranulés en contact direct local avec des parties dénudées de la paroi capillaire (Dry et al. 1999). D'autre part, certains cas de TRALI sont accompagnés d'une diminution transitoire de la numération des neutrophiles dans la circulation sanguine, pointant un rôle possible de ces cellules dans la pathogenèse (Nakagawa and Toy 2004). Ce rôle peut néanmoins être discuté, puisque le TRALI peut se produire chez des personnes neutropéniques (Laufe et al. 1986, Finlayson et al. 2011).

Plusieurs mécanismes de TRALI immunologiques ont été proposés, selon la spécificité des alloanticorps, et un mécanisme de TRALI non-immunologique communs aux BRMs (Sachs et al. 2012) (Figure 8).

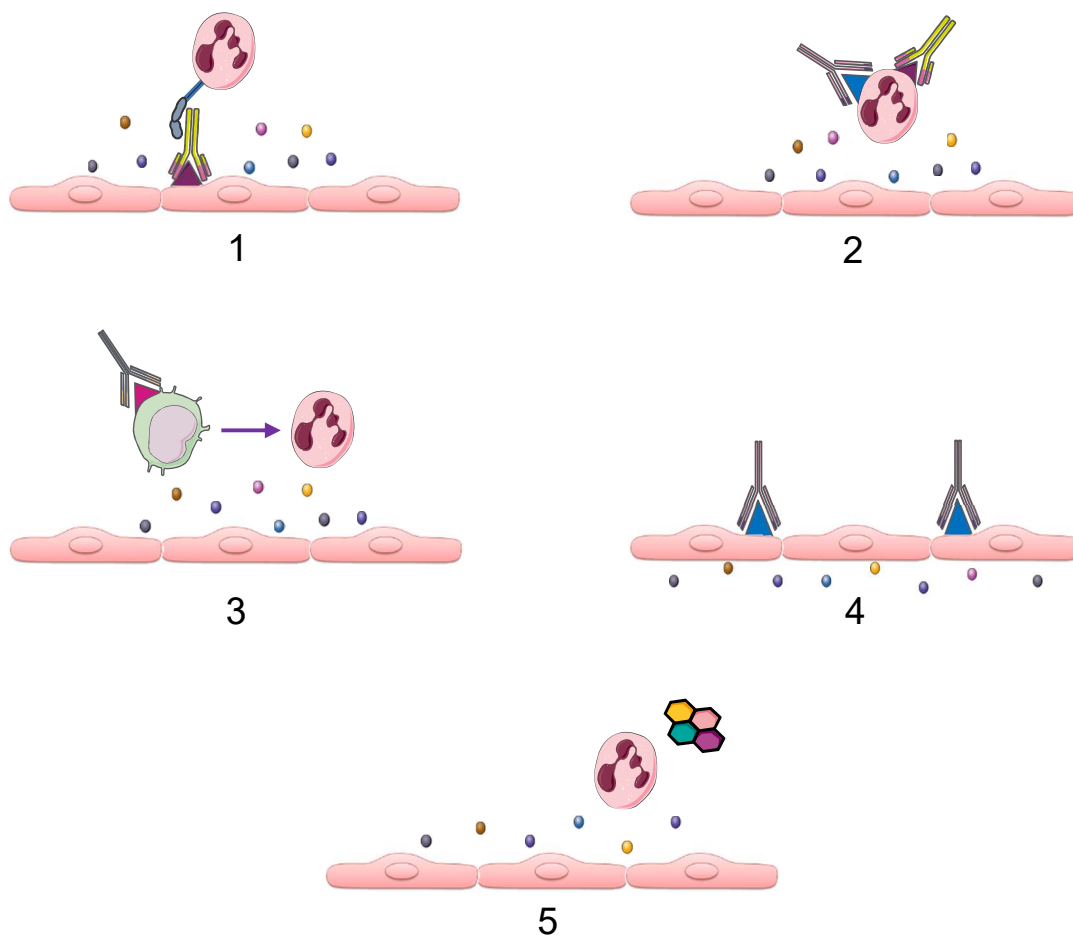


Figure 8 : Les mécanismes proposés pour le développement du TRALI (adaptée de Sachs et al. 2012)

Le TRALI immunologique peut se présenter suivant 4 modèles en fonction de la nature des anticorps mis en jeu. **1)** Les anti-HLA I se lient à leur antigène correspondant sur les cellules endothéliales et, en plus de la possibilité de les activer, permettent aux neutrophiles de se fixer via leurs récepteurs Fcγ ; la liaison des neutrophiles peut ainsi les activer pour libérer des médiateurs altérant la perméabilité vasculaire. **2)** Les anticorps anti-HLA I ou les anti-HNA peuvent se lier directement aux neutrophiles et les activer, entraînant la libération de médiateurs qui perturbent la fonction de la barrière endothéliale. **3)** Les anti-HLA II se lient aux monocytes exprimant les antigènes de classe II. Cette liaison active les monocytes qui libèrent des cytokines qui agissent sur l'activation des neutrophiles et des cellules endothéliales. **4)** Les anti-HNA se lient directement aux cellules endothéliales conduisant à la production des radicaux libres oxygénés qui altèrent la perméabilité vasculaire. **5)** Le modèle de TRALI non-immunologique : des substances libérées et cumulées lors du stockage des produits transfusionnels peuvent activer directement les neutrophiles qui produisent des médiateurs affectant la perméabilité vasculaire.

1) Mécanismes proposés pour les anticorps anti-HLA I

Un exemple instructif de TRALI causé par un anticorps anti-HLA I est celui décrit pour une patiente ayant reçu une transplantation pulmonaire, devenue dyspnéique suite à la transfusion de deux unités de globules rouges, 3 mois après la transplantation. Les examens radiologiques montrent des infiltrats unilatéraux, mais uniquement dans le poumon greffé. Des anticorps anti-HLA-B44 sont présents dans une des unités transfusées, dont l'antigène correspondant est exprimé uniquement dans le poumon transplanté (Dykes et al. 2000). Cet exemple suggère fortement que le TRALI peut être déclenché par la fixation des alloanticorps sur l'endothélium, cette liaison permettrait d'activer les cellules endothéliales ainsi que la rétention et l'activation des neutrophiles conduisant *in fine* à la perte de la perméabilité vasculaire (Figure 8-1).

Les données histologiques pointant vers un rôle des neutrophiles dans la perte de l'intégrité vasculaire ont conduit à des études *in vitro* pour confirmer cette hypothèse. Ce schéma est confirmé par une étude qui analyse les premières étapes du TRALI immunologique sur le plan de l'interaction entre l'endothélium et les neutrophiles. Dans ce travail, des cellules endothéliales vasculaires humaines sont incubées avec des neutrophiles humains (HLA-A2⁻ ou HLA-A2⁺) pré-stimulés par du fMLP (formylméthionine-leucyl-phénylalanine), puis activées avec des alloanticorps anti-HLA-A2 provenant de sérums de femmes multipares (Khoy et al. 2017). En présence des alloanticorps, les neutrophiles HLA-A2⁺, et eux seuls, produisent des radicaux libres oxygénés qui, à leur tour, provoquent la rupture des contacts intercellulaires assurés par la VE-cadhérine et ainsi l'augmentation de la perméabilité de la couche de cellules endothéliales (Figure 8-2).

Ces deux séries d'observations suggèrent donc la présence d'au moins deux mécanismes possibles pour la survenue du TRALI en présence d'alloanticorps anti-HLA I, l'un en activant les cellules endothéliales pour recruter les neutrophiles, et l'autre en activant directement les neutrophiles.

2) Mécanisme proposé pour les anticorps anti-HLA II

L'absence de détection des molécules HLA de classe II sur l'endothélium vasculaire des capillaires pulmonaires et sur les neutrophiles intravasculaires d'un patient décédé d'un TRALI (Kao et al. 2003) suggère que ces cellules ne sont pas directement la cible des alloanticorps anti-HLA II. Toutefois, il n'est pas formellement exclu que dans des conditions inflammatoires, qui induisent l'expression de molécules HLA de classe II,

les anticorps anti-HLA II peuvent se lier directement aux cellules endothéliales de la microcirculation pulmonaire. C'est le cas des patients souffrant d'une fibrose pulmonaire (Komatsu et al. 1989) ou *in vitro*, quand les cellules endothéliales de la microcirculation pulmonaire sont stimulées avec de l'interféron γ (Cunningham et al. 1997).

Les alloanticorps anti-HLA-II de donneurs qui ont été impliqués dans des TRALI peuvent activer *in vitro* les monocytes de même spécificité HLA-II, que ces derniers proviennent des personnes ayant eu le TRALI ou de volontaires sains. Les monocytes ainsi stimulés produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α). Ces cytokines peuvent alors activer les neutrophiles et les cellules endothéliales pour augmenter la perméabilité vasculaire (Kopko et al. 2003). Ce mécanisme sur la pathogénicité des alloanticorps anti-HLA-DR (anti-HLA II) est étayé par trois autres études (Nishimura et al. 2007b, Wakamoto et al. 2008, Sachs et al. 2011). La première montre que la co-culture des cellules endothéliales humaines de la microcirculation pulmonaire (HMVECs) et des monocytes humains, en présence d'alloanticorps anti-HLA-DR provenant de donneurs impliqués dans des TRALI, provoque la production des molécules inflammatoires (leucotriène B4 et TNF- α) ainsi que l'apoptose des cellules endothéliales (Nishimura et al. 2007a). La deuxième, réalisée avec des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) et des HMVEC, montre que les monocytes activés par des anticorps anti-HLA-DR produisent les cytokines TNF α et l'IL-1 β qui sont capables par elles-mêmes d'induire l'apoptose des cellules endothéliales et ainsi une augmentation de la perméabilité de la couche endothéliale (Wakamoto et al. 2008). La troisième étude montre de façon concordante que (i) les plasmas contenant des alloanticorps anti-HLA II activent spécifiquement les monocytes qui expriment les antigènes appropriés, et provoquent alors la libération de médiateurs dont certains (IL-8, GRO α) facilitent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les neutrophiles, (ii) les surnageants sensibilisent effectivement les neutrophiles à produire des ERO en réponse au fMLP, ce qui (iii) augmente la perméabilité des cellules endothéliales HMVECs (Sachs et al. 2011). Ces travaux permettent de proposer une cascade d'évènement par laquelle les anti-HLA DR agirait pour induire un TRALI : leur liaison aux monocytes induisant la production de cytokines qui activent les neutrophiles pour produire les ERO, et finalement la rupture de la barrière endothéliale (Figure 8-3).

3) Mécanismes proposés pour les anticorps anti-HNA

Les alloanticorps anti-HNA sont capables par eux-mêmes de stimuler les neutrophiles : les anti-HNA-2 induisent directement la production d'ERO *in vitro* (Sachs et al. 2006), tandis que les plasmas contenant des anti-HNA-3a provoquent leur agrégation (Berthold et al. 2015). Ces observations permettent de proposer que les anti-HNA sont responsables de la formation d'un œdème suite à l'activation des neutrophiles et la libération de médiateurs qui conduisent à l'augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale (Figure 8-2).

Un modèle *in vitro* en deux événements peut être utilisé pour tester comment ces alloanticorps induisent la rupture de la barrière endothéliale. Les cellules endothéliales sont d'abord stimulées avec des lipopolysaccharides (LPS), provoquant ainsi une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (premier événement) et en conséquence, une meilleure adhérence des neutrophiles sur les cellules endothéliales. Seule la co-culture de ces cellules endothéliales activées avec des neutrophiles (HNA-3a⁺), suivie de l'ajout de plasma contenant des alloanticorps anti-HNA-3a (deuxième événement), entraîne une diminution significative de leur viabilité, 30 minutes après l'incubation avec les anti-HNA-3a (Silliman et al. 2007). Ces données indiquent que les neutrophiles activés sont responsables des dommages endothéliaux conduisant à la perte de l'intégrité de leur monocouche, en présence des anti-HNA-3a.

Une autre étude, plus récente, montre que l'incubation des anticorps anti-HNA-3a avec des cellules endothéliales humaines HNA-3a⁺ (HUVEC et HMVEC) entraîne une diminution de la résistance trans-endothéliale. Cette observation propose donc un deuxième mécanisme pour les anti-HNA-3a, avec la possibilité d'un effet direct sur l'endothélium, indépendant des neutrophiles (Bayat et al. 2013) (Figure 8-4).

4) Mécanisme proposé pour les molécules BRMs

Une étude rétrospective montre que des sérums provenant de patients ayant eu TRALI sont capables de stimuler les neutrophiles pour la production des anions superoxyde, suite à l'activation par la fMLP *in vitro*. Ces résultats ne sont pas retrouvés en utilisant les sérums des mêmes patients avant leur transfusion, ou des patients ayant eu de légères réactions post-transfusionnelles (fébriles ou urticaires) (Silliman et al. 1997). Ces observations suggèrent que la présence d'un composant plasmatique, autre que les anticorps (50 % des échantillons étaient négatifs pour les tests d'anticorps anti-HLA/HNA), est responsable du TRALI. Une caractérisation partielle (extraction et

chromatographie) des sérums responsables de la stimulation des neutrophiles, a permis de mettre en évidence des lipides qui seraient responsables de cette stimulation, et ainsi la cause du TRALI non-immunologique chez ces patients (Silliman et al. 1997).

Une approche *in vitro*, mise en place ultérieurement, étaye cette hypothèse : (i) des HMVECs sont traitées avec du LPS, pour induire la sécrétion de chimiokines (CXCL5, GRO α et IL-8) et l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1), et ainsi favoriser le recrutement et l'adhérence des neutrophiles, (ii) ensuite les neutrophiles et de la lyso-PC sont ajoutés, ce qui provoque des dommages aux cellules endothéliales, et ainsi une baisse de leur viabilité, après une heure d'incubation. L'importance de la stimulation des HMVECs, de l'adhérence et de l'activation des neutrophiles, est confirmée par des expériences de blocage des molécules d'adhésion (ICAM-1 des HMVEC et/ou CD18 des neutrophiles) et des chimiokines, ou de l'inhibition de la production des radicaux libres, qui toutes protègent les cellules endothéliales. Ainsi les auteurs concluent que les neutrophiles adhèrent d'une façon stable sur les cellules endothéliales, et suite à leur activation par les lipides, provoquent la rupture de la couche endothéliale par la production d'ERO (Wyman et al. 2002).

Le rôle du sCD40L (soluble CD40 ligand) dans le TRALI est suspecté, même si les évidences directes manquent (voir paragraphe IV-2.2). Sa fixation sur son récepteur, le CD40, sur les neutrophiles, sensibilise ces derniers à l'activation par le fMLP, qui induit alors la production d'ERO. Comme dans le modèle cellulaire précédent, la viabilité des HMVECs pré-activées par du LPS diminue si elles sont incubées en présence de neutrophiles et du sCD40L (Khan et al. 2006).

Ces données proposent donc un mécanisme commun pour le développement du TRALI non-immunologique, par lequel les BRMs activent les neutrophiles qui produisent des médiateurs augmentant la perméabilité endothéliale (Figure 8-5).

La plupart de ces études illustrent l'hypothèse du modèle à deux évènements « two-hit », par la nécessité d'une stimulation des cellules endothéliales et/ou des neutrophiles, suivie de l'ajout de la molécule responsable du développement du TRALI (anticorps ou substances bioactives), ce qui conduit aux lésions endothéliales. Cette étude rétrospective et ces modèles *in vitro* présentent cependant des limites. La première se contente de pointer une corrélation entre un produit et la survenue de l'œdème, et les secondes se limitent à la nature des cellules/molécules étudiées, en se focalisant sur l'un des aspects du syndrome, sans prendre en compte la multiplicité des réactions physiopathologiques impliquées. Ils ne permettent donc

pas d'étudier comment l'œdème pulmonaire en soi se forme, ce qui est nécessaire pour proposer des traitements préventifs/thérapeutiques. Aussi est-il nécessaire de développer des modèles animaux.

X) Modèles animaux

Les modèles animaux prennent en compte les observations cliniques et les hypothèses qui en ont été dégagées. Ces modèles tentent ainsi de refléter la pathologie humaine, dans l'espoir d'identifier les mécanismes qui régissent la survenue de l'œdème pulmonaire, puis de tester des traitements ciblés. Dans ce qui suit, une description des modèles *ex vivo* et des résultats qui en ressortent, suivie de celle des modèles *in vivo* pour les TRALI immunologiques et non immunologiques respectivement. Vu que le travail de cette thèse est porté sur le TRALI immunologique, les conclusions de ces modèles seront détaillées à part (paragraphe XI).

1) Modèles animaux *ex vivo*

Seeger et al. sont les premiers à décrire un modèle de TRALI utilisant des poumons. Dans ce travail, la perfusion de poumons isolés de lapin, avec des alloanticorps anti-HNA-3a provenant de donneuses multipares, des neutrophiles humains HNA-3a⁺ et du plasma de lapin comme source de complément, provoque la formation d'un œdème sévère. L'œdème pulmonaire a lieu uniquement en présence de ces trois facteurs, et si les neutrophiles expriment l'antigène HNA-3a (Seeger et al. 1990). Ce modèle peut aussi être utilisé avec des poumons de rat perfusés avec des anticorps monoclonaux de souris anti-HNA-2 humains et des neutrophiles humains qui, selon les donneurs, expriment faiblement ou fortement la protéine HNA-2 (HNA-2⁺ ou HNA-2⁺⁺⁺). Avec ce système expérimental, la survenue du TRALI dépend du profil d'expression des molécules HNA-2 ; une augmentation du coefficient de filtration capillaire et du poids des poumons sont observées quand des neutrophiles HNA-2⁺⁺⁺ sont utilisés, mais aucune variation n'est observée avec des neutrophiles HNA-2⁺. Néanmoins, une co-stimulation de ces derniers avec du fMLP est nécessaire et suffisante pour pouvoir induire un œdème. Dans ce modèle, la perfusion des poumons se fait avec un milieu chimiquement défini, sans plasma, donc en absence de complément (Sachs et al. 2006). Le même dispositif expérimental peut être utilisé *ex vivo* pour évaluer le rôle des anticorps anti-HLA II dans la survenue du TRALI. Après une première étape de sensibilisation *in vivo* avec du LPS, les poumons sont isolés, perfusés avec une solution tampon (Krebs Henseleit), puis avec du plasma humain décomplémenté

contenant des alloanticorps anti-HLA II, des monocytes et des neutrophiles humains. Alternativement, le surnageant de monocytes activés *in vitro* par des alloanticorps anti-HLA II est utilisé comme milieu de perfusion. Dans ces deux cas, une augmentation du coefficient de filtration est observée conduisant à la formation d'un œdème pulmonaire ; cet effet requiert à la fois l'activation des monocytes exprimant les alloantigènes appropriés et la présence des neutrophiles (Sachs et al. 2011).

Ces modèles confirment que les alloanticorps anti-HNA ou anti-HLA II peuvent induire un TRALI immunologique si les neutrophiles, qui doivent être pré-stimulés, ou les monocytes expriment les antigènes correspondants.

Le modèle *ex vivo* chez le rat peut être d'ailleurs utilisé pour modéliser le TRALI non immunologique en deux étapes (« two-hit »). Après une étape de sensibilisation *in vivo* avec du LPS, les poumons sont isolés puis perfusés avec du plasma décomplémenté obtenu après centrifugation de concentrés plaquettaires ou érythrocytaires fraîchement préparés ou stockés jusqu'à la date d'expiration des produits (5 jours pour les plaquettes et 42 jours pour les globules rouges). Seule l'utilisation de plasmas de concentrés plaquettaires ou de poches de globules rouges au moment de leur péremption entraîne une augmentation de la pression artérielle pulmonaire, ainsi que la formation d'œdèmes. La perfusion des poumons avec des lipides extraits des plasmas périmés ou des lyso-PCs purifiées d'origine commerciale provoquent aussi la formation d'œdème pulmonaire. Le recrutement des neutrophiles dans les poumons et leur stimulation sont provoqués par la pré-sensibilisation des animaux avec les LPS. Ces résultats sont donc en faveur d'un rôle actif des molécules libérées lors du stockage des cellules sanguines sur l'activation des neutrophiles dans la circulation pulmonaire et la survenue du TRALI (Silliman et al. 1998, Silliman et al. 2003a).

2) Modèles animaux *in vivo*

Un des premiers modèles *in vivo* décrivant la formation d'œdèmes pulmonaires chez un chien suite à une transfusion remonte aux années 1970, avant même que le terme TRALI ne soit défini. Un état de « poumons de choc » est observé après transfusion de sang autologue stocké pendant 21 jours. La filtration des produits sanguins, stockés sur une longue période, pour éliminer les « microagrégats » (leucocytes-plaquettes), diminue les lésions pulmonaires sans toutefois les empêcher totalement ; un autre constituant toxique du sérum serait donc responsable de l'état de choc pulmonaire (Geelhoed and Bennett 1975). Ce travail constituerait le premier exemple de ce qui est appelé aujourd'hui « TRALI non immunologique ».

Bien plus tard, à partir des années 2000, plusieurs modèles *in vivo* sont développés pour modéliser le TRALI à l'échelle de l'organisme entier. Ces modèles présentent l'avantage de ne pas comporter d'éléments xénogènes, ce qui permet de s'affranchir des réactions inter-espèces, en utilisant des anticorps dirigés contre les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'espèce utilisée. Ces dispositifs expérimentaux permettent de tester l'importance de la pré-sensibilisation, et des différentes contributions cellulaires et moléculaires à la formation de l'œdème, ouvrant ainsi la possibilité de tester des traitements. Dans un autre ordre d'idées, chez les grands animaux, cela permet de suivre les mêmes paramètres que chez l'Homme, telles la pression artérielle et la saturation en oxygène au cours de l'expérience.

Par la suite, une description des modèles du TRALI immunologique sera présentée (les mécanismes qui en ressortent seront détaillés dans le paragraphe XI : Mécanismes du TRALI immunologique : conclusions des modèles *in vivo*), ainsi que celle des modèles du TRALI non immunologique avec les observations qui en sont tirées.

2.1. Modèles de TRALI immunologique : en un ou en deux évènements

La majorité des études du TRALI immunologique *in vivo* ont été réalisées chez la souris pour des raisons pratiques. Les modèles les plus utilisés sont représentés dans la figure 9, et dans ce qui suit un bref rappel concernant la nomenclature du CMH murin.

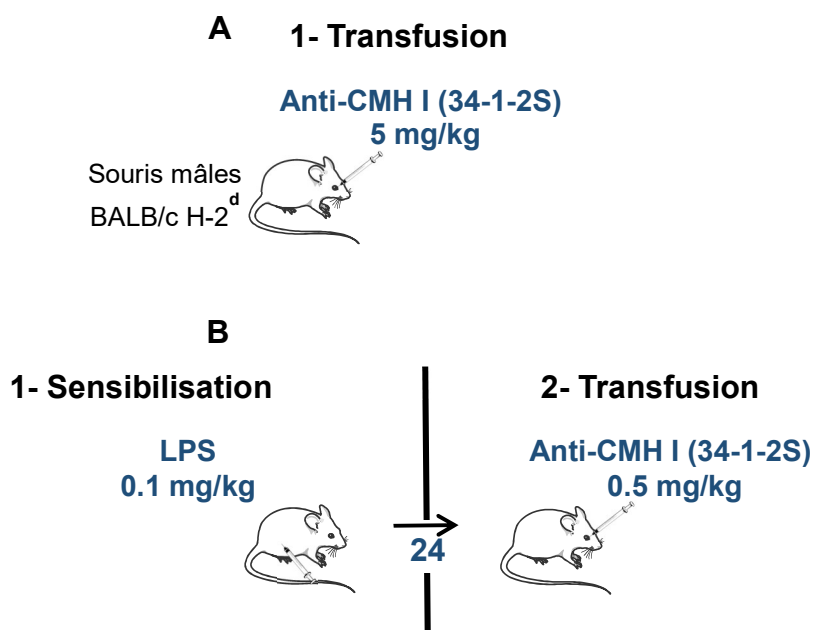


Figure 9 : Principaux modèles murins du TRALI immunologique

A- Modèle à un évènement

B- Modèle à deux-évènements

➤ Nomenclature du CMH chez la souris

Le tableau 3 fournit une correspondance des nomenclatures des molécules du CMH entre l'Homme et les animaux (souris, rat et cochon). Une importance plus particulière est donnée pour la souris (figure 10), dans la mesure où la vaste majorité des études de TRALI immunologiques sont faites chez cette dernière. Le locus attribué au CMH est identifié la première fois chez la souris et il est lié à un gène sur le chromosome 17, à proximité d'un antigène du groupe sanguin appelé antigène II. C'est pourquoi cette région est nommée histocompatibilité-2 ou tout simplement H-2, terminologie que nous trouvons quand nous faisons référence aux molécules du CMH murin. Chez la souris, il existe trois gènes de CMH de classe I, *H-2K*, *H-2D* et *H-2L*, codant les protéines H-2K, D et L, et deux gènes de CMH de classe II nommés *I-A* et *I-E*. Ces gènes sont homologues aux gènes humains HLA-A, HLA-B et HLA-C pour la classe I et HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR pour la classe II. Les variantes des allèles du CMH sont dénommées avec des suffixes en exposant. Elles sont attribuées à tous les gènes du CMH d'une lignée de souris donnée et forment ce que nous appelons 'haplotype' (Abbas 2015). Pour les lignées de souris consanguines BALB/c et C57BL/6, les allèles du CMH sont respectivement « d » ($H-2K^d D^d L^d I-A^d I-E^d$) et « b » ($H-2K^b D^b I-A^b$, allèles nuls pour H-2L et I-E).

Tableau 3 : Molécules du système du complexe majeur d'histocompatibilité

HLA = Human Leukocyte Antigen ; H = Haplotype ; RT = Rat ; SLA = Swine Leukocyte Antigen

Espèces \ Molécules	Classe I	Classe II
Homme	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR
Souris	H-2K, H-2D, H-2L	H-2-I-A, H-2-I-E
Rat	RT1-A, RT1-C, RT1-E, RT1-M	RT1-B, RT1-D
Cochon	SLA-A, SLA-B, SLA-C	SLA-DR, SLA-DQ

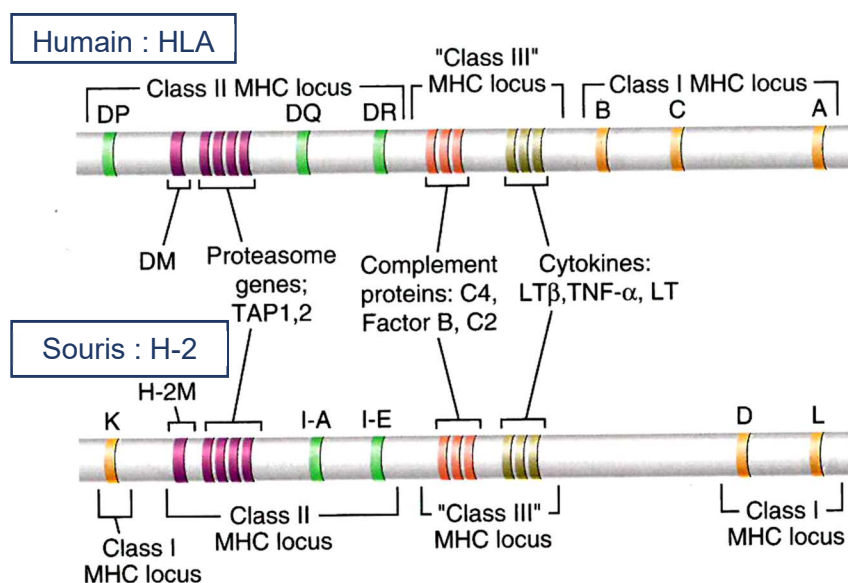


Figure 10 : Comparaison entre les molécules du CMH chez l'Homme et la souris (figure tirée du livre "Cellular and Molecular Immunology", 8^{ème} édition, p.117)

La majorité des modèles de TRALI immunologiques utilisent des anticorps monoclonaux anti-CMH I. Les premières tentatives de modélisation du TRALI dans un modèle murin *in vivo* remontent à des travaux présentés sous forme d'abstracts dans des congrès entre 2003 et 2005. Ils sont fondés sur l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-CMH de classe I murin, le clone « 34-1-2S », une IgG2a-k dirigée contre les molécules H-2K^d D^d (Sheppard et al. 2007) dans des souris BALB/c. Par la suite, les investigations sur le rôle des anticorps anti-CMH I dans la survenue du TRALI *in vivo* chez la souris se sont toutes inspirées de ce modèle en utilisant le même anticorps et des souris d'haplotype H-2^d (Looney et al. 2006, Looney et al. 2009, Fung et al. 2010, Strait et al. 2011, McKenzie et al. 2014, Ortiz-Munoz et al. 2014, Kapur et al. 2015). Cet anticorps monoclonal est le seul, parmi une vingtaine d'autres anti-CMH I testés, à pouvoir induire à lui seul, une réaction similaire au TRALI humain, même si certains autres clones ont la même allospécificité (Sheppard et al. 2007, Logdberg et al. 2009). À noter que cet anticorps peut aussi réagir de façon croisée avec les molécules H-2K^b.

L'induction du TRALI n'est possible que chez les souris mâles alors que le TRALI humain se développe autant chez les femmes que chez les hommes. Une équipe a

réussi à rendre les souris femelles susceptibles au TRALI en leur injectant du LPS par voie intratrachéale, trois jours avant l'injection de l'anticorps anti-CMH I. Mais ce travail n'a été décrit que dans un abstract (Strait et al. 2005) et n'a pas eu de suite. Il est possible que ce modèle soit difficile à maîtriser et reflète mal l'étiologie du TRALI humain ; cette injection intratrachéale de LPS peut effectivement provoquer par elle-même des lésions pulmonaires importantes et ainsi, pour certaines doses, constituer un modèle expérimental d'ALI.

Selon les conditions expérimentales, ou les laboratoires, une première étape de pré-sensibilisation avec du LPS est réalisée afin d'induire un état inflammatoire, comme cela est supposé chez le receveur. Ensuite, 24 heures après cette sensibilisation, la transfusion de produits sanguins contenant des alloanticorps est mimée par une injection en bolus de l'anticorps anti-H-2^d dans la circulation sanguine. Ce modèle se rapproche des cas pathologiques extrêmes de TRALI humains, en raison de la forte mortalité dans l'heure qui suit l'administration des anticorps (Looney et al. 2009). Si cette pré-sensibilisation n'est pas réalisée (modèle à un événement), il est nécessaire d'injecter dix fois plus d'anticorps pour provoquer un œdème pulmonaire, sans entraîner de mortalité chez les animaux (Strait et al. 2011). Cette quantité bien plus importante d'anticorps peut impliquer des mécanismes immunologiques différents, et donc aboutir à d'autres conclusions qui seront décrites ultérieurement.

Il faut noter que l'état sanitaire des animaleries est important dans ces modèles, la mise en évidence de ce problème ayant abouti au développement de protocoles expérimentaux alternatifs. En effet, le modèle originel ne comprend pas de pré-sensibilisation (Looney et al. 2006), l'amélioration des conditions sanitaires de l'animalerie oblige plus tard la même équipe à introduire l'étape de pré-sensibilisation (Looney et al. 2009). L'absence de TRALI en utilisant le protocole originel est aussi constaté par d'autres (Logdberg et al. 2009) ; des différences de conditions microbiennes et environnementales sont invoquées pour l'expliquer. En accord, une étude récente a montré que la composition du microbiote intestinal affecte la survenue du TRALI immunologique suite à l'injection des anticorps anti-CMH I (Kapur et al. 2018).

L'absence de mortalité à de fortes doses d'anticorps (>20 mg/kg) dans des souris de fond BALB/c dans le protocole à un événement a conduit une équipe à tester d'autres lignées de souris, en occurrence la souche immunodéficiente en lymphocytes T et B, la CB.17-SCID (Severe Combined ImmunoDeficient). Ces souris sont homozygotes pour la mutation génétique autosomale récessive, désignée *Prkdc^{scid}*, qui affecte la

différenciation de la lignée lymphoïde (Fung et al. 2010, Kapur et al. 2015). Plus récemment, un modèle de TRALI utilisant des souris d'haplotype H-2^b a été développé. Il présente l'avantage de pouvoir être mis en œuvre avec des souris manipulées génétiquement, la plupart sur un fond C57BL/6 (H-2^b) (Kapur et al. 2017a). L'utilisation de ces animaux a permis de mettre en évidence des mécanismes immunologiques particuliers (décrits dans le paragraphe XI, Mécanismes du TRALI immunologique : conclusions des modèles *in vivo*).

Plusieurs paramètres respiratoires et hémodynamiques sont analysés dans ces modèles pour évaluer cliniquement la survenue du TRALI. Ces différents facteurs sont suivis au cours de l'expérience (température corporelle, numération sanguine, pléthysmographie, mortalité), ou quantifiés en phase terminale sur des échantillons prélevés sur les souris mises à mort (œdème pulmonaire : ratio du poids des poumons avant et après déshydratation, concentration de protéines dans le liquide bronchoalvéolaire, extravasation du colorant injecté en intraveineux ; quantifications histologiques des poumons : histologie pulmonaire générale, recrutement cellulaire, présence de lésions, hémorragie ; pression partielle en oxygène dans le sang aortique ; dosage de cytokines inflammatoires dans le plasma ; recherche de biomarqueurs d'activation cellulaire dans le sang et les poumons).

Des rats peuvent aussi être utilisés en suivant le même principe expérimental, comprenant une sensibilisation avec des LPS puis une injection d'anticorps anti-CMH de classe I de rat. Ce modèle n'a été utilisé que deux fois : la première comme preuve de concept (l'anti-CMH I induit bien un œdème pulmonaire) (Kelher et al. 2009) ; la seconde pour montrer qu'il est possible d'éliminer les anticorps par adsorption sur des filtres spécifiques, ainsi que les lipides (rétention non spécifique), et valider ainsi cette procédure comme moyen de prévention efficace du TRALI (Silliman et al. 2014).

Afin de se rapprocher de l'échelle humaine, un modèle porcin a été développé : les porcs sont sensibilisés avec des LPS, puis après anesthésie, placés sous ventilation mécanique. Après une période de stabilisation des paramètres respiratoires, les animaux reçoivent les anticorps monoclonaux anti-CMH I porcins. L'hypoxie est analysée par la mesure du rapport PaO₂/FiO₂ tout au long de l'expérience (mesure toutes les 30 minutes pendant les 2 heures d'expérience) ; des radiologies avant l'administration des anticorps, et toutes les 30 minutes après, permettent de suivre la progression de l'œdème pulmonaire (Okazaki et al. 2014). Ce modèle n'a pas été repris, probablement à cause de la lourdeur de ces expérimentations et les restrictions de plus en plus fermes sur l'expérimentation animale.

Enfin, il existe un modèle de TRALI en deux-événements, induit par les anticorps anti-CMH de classe II ou anti-HNA-3a, respectivement chez le rat (Kelher et al. 2016) et la souris (Bayat et al. 2013).

2.2. Modèles de TRALI non immunologique : description et observations

À la différence des modèles anticorps-dépendants, les modèles de TRALI provoqués par les BRMs ne se limitent pas à une simple injection dans la circulation sanguine pour mimer la transfusion, mais consistent en une perfusion de produits sanguins sur une durée de 30 minutes. Pour des raisons pratiques, il s'agit surtout de modèles réalisés chez le rat, avec une première étape de sensibilisation par injection de LPS suivie, 2 heures après, d'une transfusion soit de produits sanguins –plasmas provenant de produits stockés jusqu'à la date limite d'utilisation (globules rouges et plaquettes) ou de produits fraîchement préparés–, soit de lipides purifiés (lyso-PCs) (Kelher et al. 2009, Silliman et al. 2010, Vlaar et al. 2010a, Vlaar et al. 2010b, Silliman et al. 2011) (Figure 11).

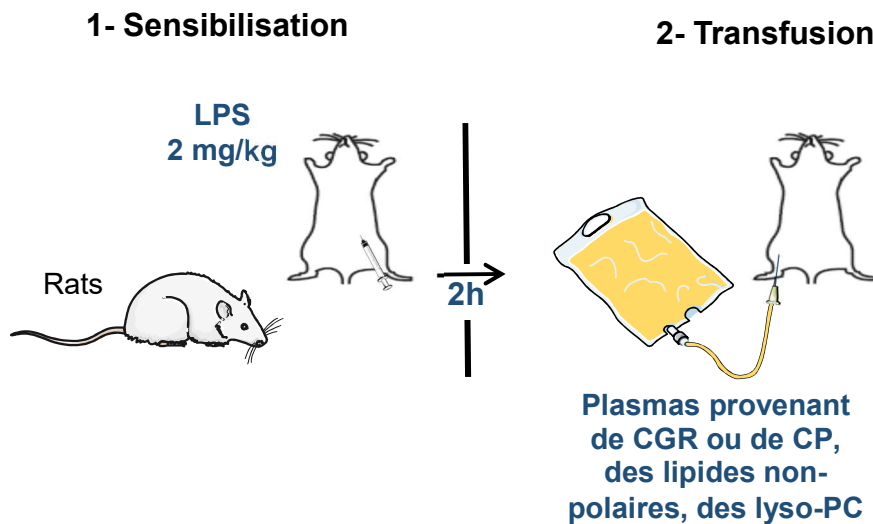


Figure 11 : Modèles animaux du TRALI non immunologique

CGR = Concentrés de Globules Rouges ; CP = Concentrés Plaquettaires

Comme pour les expériences de perfusion de poumons *ex vivo*, l'administration de lyso-PCs ou des plasmas stockés pendant 28 ou 48 jours provoquent la formation d'œdèmes pulmonaires (Kelher et al. 2009). En utilisant un protocole similaire dans son principe, un deuxième groupe rapporte des observations semblables sur l'effet délétère du stockage prolongé des produits. L'administration de produits stockés jusqu'à leur terme provoque des lésions pulmonaires, contrairement à celle de produits fraîchement préparés. Néanmoins, aucune accumulation significative de lyso-PCs n'est constatée dans les poches de globules rouges et de plaquettes de rats ou humains stockées pendant la durée maximale, seule une légère accumulation de ces molécules est mesurée dans les milieux de conditionnement des plaquettes stockées jusqu'à leur terme (5 jours) (Vlaar et al. 2010a, Vlaar et al. 2010b). Les observations de ses deux équipes diffèrent aussi quant à l'implication des lipides non polaires dans le développement du TRALI. Tandis que la transfusion de lipides non polaires extraits des poches de globules rouges, stockés 42 jours, provoque chez le rat la formation d'un œdème pulmonaire (Silliman et al. 2011), la transfusion de produits sanguins –où l'accumulation de lipides non polaires est confirmée au préalable par spectrométrie de masse– n'a heureusement pas d'effet pathologique chez ces volontaires pré-sensibilisés par administration de faibles doses de LPS (Peters et al. 2017). De même, une étude clinique montre que la transfusion de globules rouges autologues stockés pendant 35 jours, à des volontaires ayant reçu une faible dose de LPS (2 ng/kg), n'entraîne pas de modifications respiratoires ou hémodynamiques chez ces derniers (Peters et al. 2016). Ces résultats sont délicats à interpréter puisqu'il ne faut pas oublier que la gravité de l'état du patient est un facteur supplémentaire à prendre à compte et qui n'est pas négligeable dans la survenue du TRALI (Gajic et al. 2007). Un état qui n'est probablement pas représenté de façon appropriée par l'injection de faible dose de LPS dans l'étude de Peters et al., même si un état inflammatoire peut être confirmé chez les volontaires ayant reçu des LPS avant la transfusion (Peters et al. 2016, Peters et al. 2017).

Il est aussi possible d'utiliser des chèvres pour étudier le TRALI non immunologique provoqué par la transfusion de plasmas contenu dans des poches de produits sanguins humains (globules rouges et plaquettes) de durée de stockage récente ou tardive (Tung et al. 2011, Tung et al. 2012). Ce modèle a été développé pour dépasser le modèle avec des petits animaux et pouvoir ainsi suivre des paramètres cliniques qui se rapproche de l'échelle humaine (rythme cardiaque, saturation en oxygène, la concentration de CO₂ en fin d'expiration, pression artérielle pulmonaire, pression veineuse centrale, les pressions systolique et diastolique, et la pression artérielle

moyenne). Cependant, l'utilisation de ce modèle se limite à sa description (preuve de concept), et à la confirmation qu'une sensibilisation avec du LPS est nécessaire pour induire un TRALI suite à la transfusion de plasmas issus des poches de plaquettes et de globules rouges stockées jusqu'à la date d'expiration (Tung et al. 2011, Tung et al. 2012).

Deux autres équipes ont essayé de mimer d'autres facteurs de risque du TRALI en transfusant des globules rouges autologues conservés sur une courte ou une longue durée dans des rats ayant subi une saignée importante (30 % du volume sanguin) pour reproduire les hémorragies suite à un trauma (Nicholson et al. 2011), ou des porcs ayant subi une chirurgie cardiaque (Patel et al. 2013). Dans ces conditions, un œdème pulmonaire se développe si les produits transfusés sont issus d'une longue durée de stockage ; pour les rats, une augmentation de la quantité de protéines dans le liquide bronchoalvéolaire, de la cytokine inflammatoire CINC-1 (homologue de l'IL-8), et de l'accumulation des neutrophiles dans les poumons sont observées, ainsi qu'une mortalité plus importante (Nicholson et al. 2011). Dans le modèle porcin, une diminution de la compliance pulmonaire accompagnée de lésions tissulaires, d'une augmentation de l'activation endothéliale, et des protéines dans le liquide bronchoalvéolaire sont notées (Patel et al. 2013). Néanmoins, il n'y a pas eu de suite pour ces travaux.

XI) Mécanismes du TRALI immunologique : conclusions des modèles *in vivo*

Ces modèles animaux ont été utilisés pour décrypter les mécanismes biologiques impliqués dans la pathophysiologie du TRALI, et chacun a permis de pointer un ou plusieurs types cellulaires impliqués dans la pathogenèse du TRALI. Dans cette partie seront présentées les cellules et les molécules qui ont été décrites pour participer à la pathogenèse du TRALI immunologique, suite aux modèles *in vivo*.

1) Les neutrophiles, la production des pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) et des espèces réactives de l'oxygène ERO

1.1. Neutrophiles

L'hypothèse du rôle pathologique des neutrophiles dans le TRALI découle, en plus des observations de leur accumulation dans les poumons de patients décédés de TRALI (Dry et al. 1999), de l'analyse du passage de ces cellules dans les poumons des animaux, et leur séquestration dans la microcirculation pulmonaire en condition physiologique ou inflammatoire. En effet, lors de leur passage pulmonaire, les cellules sanguines cheminent à travers la microcirculation associée à plusieurs alvéoles (souvent plus de huit) et parcourent ainsi jusqu'à 50 segments capillaires. Le diamètre des microcapillaires pulmonaires varie entre 2 et 15 μm et en moyenne, 50 % d'entre eux sont plus étroits que les neutrophiles sphériques (6-8 μm de diamètre). Effectivement, le ratio des deux axes principaux des neutrophiles, avant et après passage dans les capillaires, mesuré par vidéomicroscopie sur des poumons de chiens, révèlent que les neutrophiles s'allongent au cours de leur passage dans les capillaires et ralentissent. Le temps moyen de passage de ces cellules est donc plus important que celui des érythrocytes, discoïdes et d'un diamètre proche des neutrophiles, mais qui se déforment facilement (Gebb et al. 1995). Ainsi, le temps de transit des neutrophiles est estimé à 26 secondes en moyenne pour 1.4 à 4.2 secondes pour les globules rouges (Doerschuk 2001). En conséquence, cette augmentation du temps du transit est considérée comme responsable d'une accumulation significative d'une population de neutrophiles dite « marginalisée » dans les poumons (Doerschuk 1999). Les auteurs estiment aussi que la circulation pulmonaire abrite environ 28% des neutrophiles, prêts à agir en cas d'activation ou d'inflammation. Ces analyses ont constitué le support d'hypothèses de travail dans les années qui ont suivies, mais nous verrons plus bas qu'elles ont été remises en question plus récemment, en 2014. Les modèles expérimentaux ont donc souvent eu pour dessein d'évaluer la contribution active de ces cellules dans le TRALI.

Dans le modèle expérimental en deux évènements chez la souris, l'inhibition du TRALI par l'induction d'une neutropénie suite à un traitement avec de la vinblastine, ou par immunodéplétion après l'injection de l'anticorps anti-Ly6G/Ly6C (clone RB6-8C5), indique un rôle essentiel de ces cellules (Looney et al. 2006, Looney et al. 2009). Néanmoins, la nécessité des neutrophiles n'est pas confirmée dans un modèle à un évènement, où une neutropénie plus sévère est provoquée en combinant l'injection de

l'anticorps RB6-8C5 (anti-Ly6G/Ly6C) à un traitement avec l'hydroxyurée (agent alkylant) (Strait et al. 2011). Des expériences complémentaires de cette seconde étude suggèrent que l'effet protecteur observé dans le premier travail résulterait plutôt de la consommation du complément, qui joue un rôle essentiel dans ce deuxième modèle (voir plus bas, système du complément) (Strait et al. 2011).

La discordance entre les deux séries de travaux pourrait résulter des différences expérimentales importantes. Le modèle à une étape nécessite dix fois plus d'anticorps, et de ce fait peut être plus dépendant du complément (rôle détaillé ci-dessous). De plus, ce dernier est réalisé sur des souris vigiles alors que le modèle à deux événements est réalisé sur des souris anesthésiées. Ces observations laissent penser que l'anesthésie générale des souris affecterait la survenue de l'œdème pulmonaire. Effectivement, l'anesthésie par un mélange de Kétamine/Xylazine (celui utilisé dans l'étude) est connue pour diminuer la fréquence respiratoire et réduire fortement le débit cardiaque (Erhardt et al. 1984) (Janssen et al. 2004). Cette diminution du débit cardiaque pourrait ralentir le temps de transit des neutrophiles dans la microcirculation pulmonaire, leur laissant le temps de s'activer davantage, d'où leur éventuel rôle important dans ce modèle de TRALI.

Chez le rat, le TRALI provoqué par les anticorps anti-CMH II pourrait aussi dépendre des neutrophiles, puisque leur élimination 24 heures avant l'injection des alloanticorps bloque le TRALI. Dans ce cas, l'étape de sensibilisation induit l'expression des molécules de classe II sur les neutrophiles, qui sont donc activés par les alloanticorps transfusés (Kelher et al. 2016).

L'importance des neutrophiles dans le TRALI est en partie confirmée dans le modèle de TRALI provoqué par les anticorps anti-HNA-3a. Dans ce modèle, le TRALI est moins grave si les souris sont neutropéniques. Ainsi, la sévérité du TRALI provoqué par les anticorps anti-HNA-3a combinerait la contribution non seulement des neutrophiles, mais aussi celle des cellules endothéliales qui seront évoquées plus bas (Bayat et al. 2013).

Les anciennes observations faites chez l'animal sur la rétention des neutrophiles dans les poumons présentent le risque de biais liés aux méthodes de préparation de ces cellules ou de leur marquages avant leur transfusion, et qui peuvent activer les neutrophiles et ainsi augmenter considérablement leur rétention pulmonaire dans les conditions normales, rendant ainsi les observations discutables (Peters 1998). L'utilisation de méthodes mieux maîtrisées, avec des techniques plus sensibles et plus

précises évitant des artefacts de préparation, ont permis d'affiner les conditions du trafic des neutrophiles périphériques dans les poumons chez l'Homme.

L'observation des neutrophiles injectés après un marquage à l'indium 111 montre que les neutrophiles quiescents traversent la circulation pulmonaire avec seulement 2.3 secondes de retard par rapport aux globules rouges, tandis que moins de 5 % sont retenus dans les poumons. Par contre, si ces neutrophiles sont stimulés au préalable (incubation *in vitro* avec du GM-CSF), 96 % d'entre eux sont retenus dans les poumons 2 minutes après leur injection, et il en reste encore 48 %, 40 minutes après (Summers et al. 2014). Ces observations montrent que les neutrophiles activés sont retenus dans la circulation pulmonaire, sans nécessiter une activation de l'endothélium, puisque les expériences ont été réalisées sur des volontaires sains. Les investigations complémentaires indiquent qu'il existe dans le poumon un processus de désactivation physiologique des neutrophiles marginalisés qui recirculent ensuite sous forme désactivée. Des travaux ultérieurs suggèrent que cette désensibilisation des neutrophiles est provoquée par les contraintes mécaniques associées au passage des neutrophiles dans la microcirculation pulmonaire : ce processus de dépolarisation peut effectivement être provoqué de façon purement mécanique en faisant passer des neutrophiles pré-activés dans un système microfluidique formé de tubes de sections variables, mimant la variation des diamètres des vaisseaux de la microcirculation pulmonaire (Ekpenyong et al. 2017).

Une observation importante est que, chez les patients souffrant du syndrome de détresse respiratoire aiguë, les neutrophiles retenus dans les poumons présentent un défaut de désactivation : chez ces patients, le gradient d'expression de CD62L (molécule d'adhésion clivée après l'activation des neutrophiles) est plus faible sur les neutrophiles de la veine jugulaire, comparés à ceux de l'artère radiale indiquant une activation maintenue des neutrophiles ayant quitté la circulation pulmonaire ; par contre, chez les patients admis en soin pour des chirurgies ou souffrant d'un sepsis sans atteinte pulmonaire (contrôles), les neutrophiles expriment le même niveau de CD62L qu'importe le prélèvement vasculaire, et sont alors désactivés. Les neutrophiles sont donc capables d'alterner un état « amorcé » (qui facilite la production d'ERO après un deuxième signal activateur), et un état quiescent ; les neutrophiles quiescents sont ronds, et après amorçage deviennent polarisés, avec la présence d'un front de migration (« leading edge ») et des pseudopodes (Ekpenyong et al. 2015).

Ces observations indiquent que la désactivation des neutrophiles dans les poumons est inopérante dans le cas des SDRA (Summers et al. 2014), et peuvent expliquer la

sévérité de ces atteintes à cause d'un état d'activation permanent des neutrophiles qui aggrave la réponse défensive initiale.

1.2. Les pièges extracellulaires des neutrophiles ou NETs

Les NETs (Neutrophil Extracellular Traps) sont libérés par les neutrophiles activés et forment un réseau de fibres extracellulaires constituées essentiellement d'ADN, auxquelles sont associées des histones et des enzymes antimicrobiennes provenant des granules telles que l'élastase, la cathepsine G et la myéloperoxidase. Malgré le rôle bénéfique que jouent les NETs dans la défense antimicrobienne, leur formation au mauvais endroit et ou en quantités élevées peuvent être délétères. Ils sont effectivement décrits pour participer à la pathologie de plusieurs maladies inflammatoires (sepsis, infection bactérienne, athérosclérose, auto-immunité : arthrite rhumatoïde et lupus (Papayannopoulos 2018)). De ce fait, ils sont suspectés de participer à la formation des lésions pulmonaires dans le cadre du TRALI immunologique. En effet, l'implication des NETs dans le TRALI, chez l'Homme, est suggérée par la présence de biomarqueurs dans le sérum de patients ayant survécu à un TRALI associés à leur production (ADN et nucléosomes) (Thomas et al. 2012). Dans le modèle à deux événements chez la souris, des NETs dans les tissus pulmonaires peuvent être mis en évidence par immunomarquage sur des coupes de poumons. De plus, l'injection intraveineuse de la DNase I (traitement qui détruit les NETs), cinq minutes avant l'induction du TRALI ou simultanément avec l'anticorps anti-CMH I, protège contre la formation de l'œdème pulmonaire en empêchant la rupture de l'intégrité vasculaire (Caudrillier et al. 2012). Des NETs sont aussi mis en évidence, par une 2^{ème} équipe, dans l'espace alvéolaire des poumons de souris ayant reçu l'anticorps, et l'injection intranasale de la DNase, avant l'induction du TRALI, permet de réduire la sévérité de la pathologie pulmonaire analysée 2h après l'injection de l'anticorps (Thomas et al. 2012). Néanmoins, notre équipe n'a pas été en mesure de détecter des NETS dans le même modèle de TRALI expérimental.

1.3. Les espèces réactives de l'oxygène

Les mécanismes conduisant à la formation des œdèmes pulmonaires lors du TRALI ne sont pas bien compris mais la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) pourrait jouer un rôle important de par leur implication dans la régulation de la perméabilité endothéliale (Fernandez-Borja et al. 2010). Ces ERO sont produits par toutes les cellules en condition homéostatique et davantage en cas d'activation. En

raison de leur rôle potentiellement délétère, l'étude du rôle des ERO produits par les neutrophiles activés dans la formation des lésions pulmonaires, lors de TRALI provoqués par des anticorps anti-CMH I, a été privilégiée.

En 2009, Hidalgo et al. mettent en évidence l'importance, voire la nécessité, de ces molécules dans la formation de l'œdème pulmonaire. D'une part, l'injection du 34-1-2S entraîne une augmentation importante du nombre de leucocytes produisant des ERO et leur recrutement vers l'endothélium vasculaire. D'autre part, administrée avant l'anticorps, la N-acétyl-cystéine (NAC), un piègeur des ERO, empêche la formation de l'œdème pulmonaire (Hidalgo et al. 2009). Par la suite, Strait et al. confirment ce résultat (Strait et al. 2011), tandis que Semple et al. montrent que l'administration d'immunoglobulines intraveineuses, qui exerce un effet protecteur sur les souris (voir paragraphe XI-6 : les récepteurs Fc γ), diminue la production spontanée des ERO par les neutrophiles purifiés de ces souris traitées, ainsi que leur capacité à produire des ERO après une stimulation avec du fMLP, *in vitro* (Semple et al. 2012). Ces observations sont en faveur d'un rôle des ERO produits par les neutrophiles dans la pathogénèse du TRALI, même si la participation active de ces cellules est sujette à caution comme expliqué plus haut (voir paragraphe XI-1-a). Plus récemment, la nécessité des ERO dans la formation des lésions pulmonaires a été confirmée en utilisant un modèle de souris C57BL/6 présentant une déficience génétique complète en gp91^{phox}, une sous-unité nécessaire pour l'assemblage du complexe enzymatique NADPH oxydase qui est responsable de la production de la majeure partie des ERO en cas d'activation cellulaire. Contrairement aux souris sauvages, ces souris déficientes ne développent pas d'œdèmes pulmonaires alors que le recrutement des neutrophiles dans les poumons et l'activité de la myéloperoxydase (principale enzyme libérée par les neutrophiles activés) sont comparables dans les deux types de souris (Kapur et al. 2017a).

Enfin, les ERO produits par les cellules endothéliales pourraient s'avérer importants lors d'un TRALI expérimental provoqué par des anticorps anti-HNA-3a : d'une part les souris neutropéniques font un TRALI (moins sévère que les souris sauvages), d'autre part les souris déficientes en gp91^{phox} sont complètement protégées du TRALI (Bayat et al. 2013).

2) Les monocytes/macrophages

Strait et al. sont les premiers à pointer un rôle des monocytes/macrophages en montrant que l'élimination des monocytes et macrophages, avec du gadolinium (une molécule qui a

de multiples effets) ou des liposomes chargés en clodronate (48 h avant l'injection de l'anti-CMH I), protègent les souris du TRALI immunologique (Strait et al. 2011). L'absence de protection après injection intratrachéale de liposomes clodronate suggère que les macrophages alvéolaires ne jouent pas de rôle dans le TRALI immunologique mais que plutôt, les monocytes sanguins et/ou les macrophages, de localisation tissulaire à déterminer, seraient impliqués.

Une seconde étude montre que l'élimination des monocytes périphériques par une double injection de gadolinium, l'une intraveineuse, l'autre intrapéritonéale, protège d'un TRALI induit 24h après. Néanmoins, l'administration de monocytes spléniques dans ces souris monocytopeniques, juste avant l'injection de l'anti-CMH I, restaure la sensibilité des souris au TRALI (McKenzie et al. 2014). Dans ce modèle, la chimiokine MIP-2 (Macrophages Inflammatory Protein-2), produite par les monocytes, permet le recrutement des neutrophiles dans les poumons, tandis que le blocage de sa liaison sur son récepteur avec un peptide (antileukinate), empêche la formation de l'œdème pulmonaire suite à l'injection du 34-1-2S. Ainsi, les monocytes sont nécessaires pour l'initiation du TRALI en recrutant les neutrophiles qui ensuite, provoquent les lésions pulmonaires (McKenzie et al. 2014), comme mentionné dans la partie 1-a (Neutrophiles).

3) Les lymphocytes T : T-régulateurs, cellules dendritiques et IL-10

Le groupe de Semple a développé un modèle différent de TRALI immunologique en une seule étape dans les souris immunodéficientes CB.17, suffisamment sévère pour être létal sur 40 % des animaux. Cette susceptibilité résulte de l'absence de lymphocytes T matures puisque seul le transfert de lymphocytes T spléniques de souris de génotype sauvage protège ces animaux du développement d'œdèmes pulmonaires, provoqué par l'injection de l'anticorps 34-1-2S (Fung et al. 2010).

Plus récemment, ce même groupe s'est intéressé à identifier la ou les sous-populations de lymphocytes T impliquées, ainsi que le mécanisme par lequel ces cellules agissent pour protéger du TRALI. L'immunodéplétion des lymphocytes T CD4⁺ ou de la sous-population de lymphocytes T-régulateurs (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) d'une part, mais non celle des lymphocytes T CD8⁺ d'autre part, rendent susceptibles au TRALI immunologique les souris BALB/cAnNCrI (résistantes au TRALI dans leur main) (Kapur et al. 2017a). Ce groupe a développé par ailleurs un nouveau protocole permettant d'expérimenter le TRALI dans des souris C57BL/6 d'haplotype H2^b et donc dans les souris génétiquement déficientes qui existent sur ce fond. Les expériences montrent un rôle protecteur des cellules dendritiques et de l'interleukine 10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire sécrétée par ces dernières

et par une partie de lymphocytes T régulateurs, dans la susceptibilité au TRALI expérimental. Ils découvrent ainsi la possibilité d'utiliser cette cytokine pour bloquer le développement du TRALI (Kapur et al. 2017a). Par ailleurs, ils remarquent la présence de faibles concentrations d'IL-10 dans le plasma des patients ayant développé un TRALI (Kapur et al. 2017b).

Cependant, le modèle dans les souris H-2^b utilise des quantités phénoménales d'anticorps : le 34-1-2S à 45 mg/kg –qui réagit aussi de façon croisée avec les molécules H-2K^b, et peut aussi à de telles concentrations avoir des effets non spécifiques– et l'anticorps AF6-88.5.5.3 à 4.5 mg/kg –qui réagit avec les molécules H-2K^b–, injectées en une seule fois dans 600 µL de volume (équivalent à 1/3 du volume sanguin murin). Compte tenu (i) que le niveau d'IL-10 est aussi bas chez les patients transfusés n'ayant pas développé un TRALI (Kapur et al. 2017b), (ii) que d'autres groupes ont observé des œdèmes pulmonaires similaires en présence et en absence des lymphocytes chez des souris sauvages BALB/c et des souris Rag2^{-/-} (absence de lymphocytes B et T matures) (Looney et al. 2006, Strait et al. 2011), (iii) que les déplétions cellulaires ne sont pas très spécifiques dans le modèle avec les souris C57BL/6 et (iv) que la façon dont le TRALI est induit dans ce modèle ne relève en rien de la physiopathologie humaine, ces résultats sont à prendre avec précaution.

4) Les cellules endothéliales

Le rôle des cellules endothéliales dans la survenue du TRALI en tant que cible des alloanticorps n'a pas fait l'objet d'une étude explicite, mais divers arguments indirects convergent vers leur participation. Il faut rappeler que l'importance des cellules endothéliales est suggérée par l'observation d'un cas de TRALI sur un poumon transplanté, le poumon autologue ayant été préservé (Dykes et al. 2000) (voir paragraphe IX-1 : Mécanismes proposés pour les anticorps anti-HLA I).

En étudiant le rôle des récepteurs Fcγ dans le TRALI (détaillé par la suite), Looney et al. déduisent que la liaison des anticorps anti-CMH I sur l'endothélium est nécessaire pour l'induction du TRALI. Alors que les souris déficientes pour la signalisation via les récepteurs FcγR ne développent pas d'œdème pulmonaire après injection du 34-1-2S, le transfert dans ces souris de neutrophiles n'exprimant pas les molécules du CMH I restaure la susceptibilité au TRALI immunologique. Ils proposent ainsi que les anticorps se lient à l'endothélium et que les neutrophiles se fixent via leurs récepteurs Fcγ pour engendrer les lésions pulmonaires (Looney et al. 2006). Cette proposition rejoint le mécanisme proposé dans le paragraphe IX concernant les mécanismes des anticorps anti-HLA I, avec la liaison

des alloanticorps sur les cellules endothéliales qui facilitent la rétention et l'activation des neutrophiles pour induire l'œdème (Figure 8-1).

Au moyen d'expériences de greffe de cellules hématopoïétiques dans des animaux irradiés, Strait et al. concluent aussi que les cellules endothéliales sont des cibles directes nécessaires des alloanticorps : ils constatent que le TRALI n'est possible que si les animaux receveurs expriment l'haplotype H-2^d sur les cellules non-hématopoïétiques (donc les cellules cibles sont très vraisemblablement les cellules endothéliales), tandis que l'haplotype H-2^d des cellules hématopoïétiques n'est pas déterminant (Strait et al. 2011).

La réponse des cellules endothéliales suite à la fixation d'alloanticorps anti-HLA dans le cadre du TRALI n'a pas été explorée, pourtant ces derniers sont connus pour pouvoir exercer des effets directs sur les cellules endothéliales en provoquant des lésions, des thromboses et des rejets de greffe, dans le cadre des transplantations (Iniotaki-Theodoraki 2001). En particulier, certains anticorps anti-HLA peuvent induire des réponses biologiques susceptibles d'entraîner une rupture de la barrière endothéliale : ils activent *in vitro* les cellules endothéliales qui, en réponse, réarrangent leur cytosquelette, expriment des molécules d'adhésion, et sécrètent des cytokines favorisant le recrutement, l'adhérence et l'extravasation des cellules inflammatoires (Valenzuela et al. 2013) (Valenzuela and Reed 2013).

Dans l'étude du TRALI induit par des anticorps anti-HNA-3a, Bayat et al. obtiennent deux résultats en faveur de l'engagement des cellules endothéliales dans le mécanisme du TRALI. D'une part l'incubation des cellules endothéliales humaines *in vitro*, avec des anti-HNA-3a, augmente la perméabilité de la couche cellulaire, d'autre part le TRALI peut être induit dans des souris rendues neutropéniques. Néanmoins, dans cette dernière situation, la sévérité du TRALI est moins importante, ce qui indique que les anti-HNA-3a exercent leur effet pathologique maximal via différentes interactions entre les cellules exprimant l'alloantigène (Bayat et al. 2013).

Ces observations suggèrent donc que les cellules endothéliales constituent une cible pharmacologique pour prévenir la formation des lésions pulmonaires, en renforçant cette barrière ou bloquant les processus conduisant à son activation. Reste à comprendre quelle voie d'activation peut être bloquée en ayant un effet bénéfique dans le cadre du TRALI, et ceci en essayant de transposer les mécanismes d'activation et le rôle des cellules endothéliales dans le maintien de l'intégrité vasculaire mis en évidence dans d'autres modèles (Morsing et al. 2018).

Une étude récente, explorant le mécanisme par lequel l'histamine conduit à la rupture de cette barrière, a montré que l'activation de la molécule RhoA (Ras homolog gene family,

member A) de la famille des petites GTPases, est responsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, l'inhibition de cette dernière, ou de la kinase en aval de sa signalisation, ROCK (Rho-associated protein kinase), permet de bloquer la fuite vasculaire (Mikelis et al. 2015). Ces inhibiteurs sont utilisés *in vivo* et ont permis de prévenir les œdèmes dans des modèles de perméabilité par l'injection d'agonistes (histamine, PAF, VEGF) et des modèles d'anaphylaxie passive et systémique (Mikelis et al. 2015). L'utilisation de ces inhibiteurs, avant l'induction du TRALI, pourrait éviter la perte de l'intégrité vasculaire et ainsi protéger contre la formation de l'œdème. De plus, ce renforcement de la barrière endothéliale permettrait d'éviter une éventuelle aggravation des dégâts cellulaires, médiée par la ventilation mécanique à volume respiratoire élevé, qui est utilisée comme traitement suite à un TRALI (Vlaar et al. 2010c).

5) Les plaquettes

Afin d'éviter de lourdes redondances, le rôle débattu des plaquettes sera détaillé à part, dans le chapitre suivant en rapport avec le travail de la thèse (voir travail de la thèse, partie 2).

6) Les récepteurs Fcγ

Étant donné que les anticorps peuvent se lier d'une façon spécifique à leur antigène correspondant via leur partie variable (Fab), ou d'une façon non spécifique de l'antigène sur les récepteurs aux immunoglobulines G (IgG) via leur partie constante (Fc), le rôle de ces récepteurs FcγRs a été exploré dans le cadre du TRALI immunologique. De plus, les FcγRs peuvent réticuler les anticorps qui reconnaissent leurs antigènes, si ces derniers sont exprimés à proximité (sur la même cellule ou sur des cellules en contact). Ces récepteurs sont exprimés par des cellules du système immunitaire susceptibles de jouer un rôle dans la pathogenèse du TRALI, à savoir les neutrophiles, les monocytes et les macrophages. Suite à leur activation, les FcγRs induisent une cascade de signalisation intracellulaire activant les cellules, pouvant ainsi participer au développement du TRALI ; cependant, leur contribution est controversée. À noter d'ailleurs que le profil d'expression de ces récepteurs est différent entre l'Homme et la souris, avec notamment un gène qui est absent totalement chez la souris, le *FCGR2A*, codant pour le récepteur FcγRIIA. Un aperçu général de l'expression et de la signalisation de ces FcγRs sera détaillé dans le chapitre suivant concernant le travail de la thèse, en se focalisant sur le FcγRIIA (voir travail de la thèse, partie 3).

Leur importance est soulignée par l'absence de TRALI immunologique, provoqué par les anti-CMH I, chez les souris déficientes pour la chaîne gamma commune aux récepteurs aux IgG et aux IgE ($Fc\epsilon r1g^{-/-}$), qui sont déficientes dans la signalisation relayée par tous les $Fc\gamma R$, tandis que le transfert de neutrophiles de souris sauvages (exprimant les $Fc\gamma RIII$ et IV) restaure la susceptibilité au TRALI (Looney et al. 2006). Néanmoins, cette observation n'est pas confirmée dans une autre étude, où seule une légère diminution de la sévérité du TRALI est observée dans les souris $Fc\epsilon r1g^{-/-}$ (Strait et al. 2011). Ces divergences sont difficilement interprétables, le statut sanitaire des animaux de la première étude est reconnu plus tardivement comme non conforme aux bonnes pratiques de laboratoire, pourtant il est essentiel dans la susceptibilité des animaux au TRALI expérimental (Looney et al. 2009).

Dans une autre série d'expériences, des immunoglobulines intraveineuses (IVIgs à 2 g/kg), utilisés classiquement dans le traitement de maladies immunitaires faisant intervenir des anticorps, permettent de réduire la pathogénèse du TRALI dans les souris immunodéficientes CB.17 et les souris BALB/c. Cet effet protecteur impliquerait les récepteurs $Fc\gamma$ (cible des IVIgs injectées) qui sont ainsi bloqués, ce qui empêcherait la liaison du 34-1-2S (Semple et al. 2012). Dans ce même modèle, l'injection de la partie $F(ab')_2$ de l'anticorps 34-1-2S (et donc sans la partie Fc) n'induit pas la formation d'un œdème pulmonaire et n'affecte pas la survie des souris (McKenzie et al. 2014). Un argument aussi en faveur de l'importance des $Fc\gamma R$ dans le TRALI.

7) Système du complément

Le rôle actif du facteur C5a du complément, ou de son récepteur C5aR a été évalué uniquement dans les modèles de TRALI à un évènement. Les premiers travaux montrent que le TRALI se produit d'une façon identique dans les souris BALB/c de génotype sauvage et génétiquement déficientes en C5aR, suite à l'injection du 34-1-2S. Ces résultats indiquent que ce récepteur, ou que l'anaphylatoxine C5a, ne joue pas de rôle essentiel dans le TRALI (néanmoins, les auteurs ne détaillent pas les conditions et les observations expérimentales) (Looney et al. 2006). Des conclusions similaires sont aussi rapportées par une deuxième équipe qui utilise des souris DBA (haplotype H-2^d) déficientes pour le C5 (de nouveau, les auteurs ne détaillent pas les observations expérimentales) (Fung et al. 2010). À l'inverse, une autre équipe, en utilisant des souris BALB/c déficientes pour les molécules C3, C5, C3aR et C5aR du complément, conclut que le développement du TRALI dépend de la génération du C5a et de l'activation subséquente de son récepteur, le C5aR, tandis que le C3aR n'est pas impliqué (Strait et al. 2011). La

faible concentration plasmatique de C5 chez les femelles expliquerait leur résistance au TRALI expérimental ; effectivement, le transfert de plasma de souris mâles sauvages ou déficientes pour le C3 (les deux types ayant le C5), mais non celui de souris déficientes en C5, rend les souris femelles susceptibles au TRALI (Strait et al. 2011).

8) Protéine C-réactive (CRP pour C-Reactive Protein)

Partant du principe que les mécanismes du TRALI impliquent un état inflammatoire et que la protéine C-réactive (CRP), une protéine de la phase aigüe, est un biomarqueur d'états infectieux ou inflammatoire chez l'homme, Kapur et al. proposent que la CRP constitue un acteur du TRALI. En faveur de cette hypothèse, la co-injection de la CRP humaine (10 mg/kg, soit une concentration plasmatique d'environ 125 mg/L) et de l'anticorps 34-1-2S (4.5 mg/kg) provoque des lésions pulmonaires dans les souris BALB/c (résistantes au TRALI à cette dose d'anticorps dans leur main), contrairement à celles qui ont seulement reçu l'injection de l'anticorps (Kapur et al. 2015). Ultérieurement, ils observent une élévation du taux de la CRP chez les patients ayant subi un TRALI (130 ± 103.3 mg/L), ce qui traduit bien leur état inflammatoire. Les auteurs proposent donc de doser la CRP avant les transfusions, ainsi qu'une médication la ciblant pour prévenir du TRALI (Kapur et al. 2016).

Cette protéine ayant de nombreuses fonctions, l'interprétation de ces observations est délicate. La CRP humaine exerce un effet pro-inflammatoire directe sur les cellules endothéliales humaines en augmentant considérablement l'expression des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine) (Pasceri et al. 2000). L'utilisation de la CRP serait plutôt un premier évènement activateur de l'endothélium pour le recrutement et la rétention des cellules inflammatoires (neutrophiles et monocytes), ce qui étaye le modèle en deux étapes déjà proposé, et donc la CRP ne serait pas nécessairement impliquée dans la pathogenèse du TRALI en soi, mais signe de présence d'un facteur de risque.

B) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Dans ce travail, nous proposons d'approfondir les connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le TRALI immunologique. Pour cela, nous avons exploré de nouvelles pistes (le rationnel sera développé dans le chapitre suivant, concernant le travail de thèse), et nous avons revisité, d'une façon plus spécifique, la contribution des cellules suspectées de participer au développement du TRALI.

Nous présentons aussi un nouveau modèle de TRALI chez la souris, rendant possible l'exploration chez l'animal d'un pan de la physiopathologie humaine que les modèles précédents ne permettaient pas d'explorer.

L'objectif de cette thèse était donc de répondre aux trois questions suivantes :

- L'ATP, en tant que molécule alarmine, joue-t-il un rôle dans la formation des lésions pulmonaires au cours d'un TRALI immunologique?
- Quel est le rôle des plaquettes sanguines dans le développement du TRALI immunologique?
- Du fait de l'absence du récepteur humain FcγRIIA chez la souris, son expression par transgénèse affecte-t-elle les réponses liées à l'injection de l'anti-CMH I dans le modèle murin ? En particulier, sa présence sur les plaquettes peut-elle contribuer à la pathogénèse du TRALI ?

Afin de répondre à ces questions, ce travail sera divisé en trois parties :

- 1) Évaluation du rôle du canal calcique ATP-dépendant (P2X₁), et d'autres canaux calciques (TRPC6 et TRPV4) dans le TRALI immunologique (article soumis).
- 2) Étude de l'implication des plaquettes dans la survenue de l'œdème pulmonaire dans un modèle expérimental de TRALI immunologique (article publié).
- 3) Exploration de l'importance du récepteur de faible affinité aux IgG, le FcγRIIA, dans un nouveau modèle expérimental de TRALI (article en préparation).

C) TRAVAIL DE THÈSE

Partie 1 : Évaluation du rôle du canal calcique ATP-dépendant (P2X₁), et d'autres canaux calciques (TRPC6 et TRPV4) dans le TRALI immunologique

I) INTRODUCTION

1) L'ATP dans l'immunité et l'inflammation

L'adénosine 5'-triphosphate (ATP) est présent dans le cytoplasme de toutes les cellules, à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Les cellules sécrètent l'ATP en permanence, mais sa concentration extracellulaire est maintenue à de faibles niveaux (de l'ordre du nanomolaire) par l'action des ATP-diphosphohydrolases (CD39) (Kaczmarek et al. 1996) ; tandis que sa libération est augmentée suite à un stress ou une stimulation cellulaire, ou si les cellules entrent en mort cellulaire programmée ou non (apoptose/nécrose) (Bours et al. 2006) (Elliott et al. 2009). La concentration de l'ATP extracellulaire augmente considérablement dans le microenvironnement des cellules endommagées (de l'ordre du micromolaire), au-delà du seuil d'hydrolyse des enzymes, ce qui permet à l'ATP d'activer ses récepteurs purinergiques P2 (voir paragraphe suivant) et d'exercer ses effets autocrines et paracrines (Praetorius and Leipziger 2009).

Ainsi, l'ATP contribue à la promotion de l'inflammation et l'initiation de la réponse immunitaire, et elle est considérée comme un motif moléculaire associé aux dommages cellulaires ou tissulaires DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern) (Burnstock 2016). En effet, l'ATP joue différents rôles au niveau de la régulation de l'inflammation en agissant sur les cellules immunitaires. Elle augmente l'adhésion des neutrophiles et des monocytes aux cellules endothéliales en stimulant l'expression du complexe d'adhésion CD11b/CD18 (Mac-1 pour Macrophage-1 antigen) (Oryu et al. 1996) (Akbar et al. 1997); elle stimule la production des cytokines inflammatoires par les monocytes/macrophages (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α et MIP-2) (Bours et al. 2006), ce qui augmente par ailleurs la migration des neutrophiles (Kawamura et al. 2012). L'ATP extracellulaire favorise aussi la transmigration des monocytes/macrophages *in vitro*, à travers une monocouche de cellules endothéliales ou un matrigel (Goepfert et al. 2001). L'ATP active d'ailleurs la phagocytose et la production des espèces réactives de l'oxygène par les neutrophiles et les macrophages (Kuroki and Minakami 1989) et retarde leur apoptose (Gasmi et al. 1996), ce qui pourrait entraîner des dégâts

tissulaires si les réactions de défense sont dérégulées. L'ATP extracellulaire est impliquée dans le recrutement et l'activation des neutrophiles dans les poumons des souris, et participe ainsi aux atteintes pulmonaires aiguës (Shah et al. 2014). En effet, l'ATP promeut la migration des neutrophiles *in vitro*, à travers une membrane semi-perméable, et provoque *in vivo*, l'augmentation du nombre de neutrophiles dans le liquide bronchoalvéolaire 24 heures après son administration intratrachéale. De plus, suite à l'injection intratrachéale de LPS, la concentration de l'ATP dans le liquide bronchoalvéolaire est maximale au 3^{ème} jour, en parallèle avec le pic de recrutement des neutrophiles. Ces résultats sont similaires suite à l'administration de la bléomycine. Le rôle pathologique de l'ATP dans ces modèles expérimentaux est confirmé par l'effet protecteur (diminution de l'ATP extracellulaire, de l'influx des neutrophiles, de l'activité de la myéloperoxydase, et de la quantité de protéines dans le liquide bronchoalvéolaire) suite au traitement des souris avec le 2-DG (2-Deoxy-D-Glucose) qui inhibe sa synthèse (Shah et al. 2014).

Ces contributions font donc de l'ATP une molécule alarmine pouvant jouer un rôle majeur dans la pathogénèse du TRALI.

2) Les récepteurs purinergiques P2X

Les multiples actions de l'ATP extracellulaire sont relayées par des récepteurs appelés récepteurs purinergiques P2 qui sont divisés en deux groupes : les canaux cationiques ATP-dépendants P2X, et les récepteurs P2Y couplés à une protéine G. Actuellement, la famille des récepteurs P2 comprend sept sous-types de récepteurs P2X (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ et P2X₇) et huit sous-types de récepteurs P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ et P2Y₁₄) (Burnstock 2007). Ces derniers ne seront pas détaillés puisqu'il ne s'agit pas de l'objet de ce manuscrit.

Les récepteurs P2X (P2RX) sont des canaux cationiques non sélectifs qui s'ouvrent suite à la liaison de l'ATP extracellulaire. Leur topologie consiste en deux domaines transmembranaires, un large domaine extracellulaire glycosylé, et des parties N et C-terminales intracellulaires. Ils sont exprimés dans différentes combinaisons sur les cellules du système nerveux, les cellules vasculaires et les cellules immunitaires, et leur unité fonctionnelle est un trimère qui peut être homomérique ou hétéromérique (Brass et al. 2012). De ce fait, ils participent entre autres, à la transmission synaptique et à la modulation de la réponse immunitaire et inflammatoire (Burnstock 2016). Le tableau I récapitule le profil d'expression de ces récepteurs sur les cellules susceptibles d'être impliquées dans le TRALI, à savoir les cellules vasculaires

(endothéliales et musculaires lisses), les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les plaquettes.

Tableau I : Profil d'expression des P2XRs sur les cellules potentiellement impliquées dans le TRALI (adapté et élargi de (Jacobson and Muller 2016))

Récepteurs P2X	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
Cellules endothéliales	-	-	-	+	-	-	-
Cellules musculaires lisses	+	+	-	-	-	-	-
Monocytes/macrophages	+	-	-	+	+	-	+
Neutrophiles	+	-	-	+	+	-	+
Plaquettes	+	-	-	-	-	-	-

-, non exprimé ; +, exprimé.

L'activation de ces récepteurs conduit à un influx de cations (Ca²⁺ et Na⁺) qui dépolarise les cellules excitables et active des enzymes cytosoliques des autres cellules (Jacobson 2010), régulant ainsi diverses réactions. Par exemple, une stimulation *in vitro* par l'ATP du récepteur P2X₄ des cellules endothéliales entraîne l'augmentation du flux calcique entrant, et par la suite, la fonction endothéliale (production de monoxyde d'azote et de prostacycline causant une vasodilatation) (Yamamoto et al. 2000). Le récepteur P2X₇ contrôle les phases aiguë (24 heures) et chronique (14 jours) de l'inflammation pulmonaire induite chez les souris par l'administration de la bléomycine. En effet, chez les souris déficientes pour ce récepteur, 24 heures après l'induction de l'inflammation, le nombre de neutrophiles présents dans le liquide bronchoalvéolaire, l'activité de la myéloperoxydase, et la quantité de l'IL-1 β (pro-inflammatoire) dans les poumons, sont réduits, tandis qu'à des temps plus tardifs, on observe une diminution du nombre de macrophages et de la quantité de protéines dans le liquide bronchoalvéolaire (Riteau et al. 2010). Le récepteur P2X₇ participe aussi à plusieurs mécanismes impliqués dans l'inflammation tels que la production des espèces réactives de l'oxygène, la phagocytose, la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-18), l'activation des métalloprotéases membranaires (clivage des molécules de la surface cellulaire), et la libération de microparticules (Bartlett et al. 2014).

Parmi ces récepteurs, nous nous sommes intéressés au récepteur P2X₁ (P2RX₁), un canal calcique, qui est le plus largement distribué parmi les P2RX : il est exprimé par les cellules musculaires lisses, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les plaquettes, mais absent sur les cellules endothéliales (Ralevic 2012, Hechler and Gachet 2015). De plus, en utilisant un modèle d'endotoxémie chez la souris, notre équipe a montré que le P2RX₁ régule

positivement l'inflammation systémique évaluée par le dosage plasmatique des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES), le recrutement et l'extravasation des neutrophiles dans les poumons et la coagulopathie. Il contribue ainsi aux dommages tissulaires (pulmonaires et hépatiques), et à la mortalité associés à l'endotoxémie (Maitre et al. 2015).

3) Les canaux TRP

Les canaux TRP (Transient Receptor Potential) représentent une grande famille de récepteurs qui comprend plus de cinquante canaux perméables aux cations. Chez les mammifères, ces canaux sont répartis en six sous-familles sur la base des homologies structurales : TRPC (1-7), TRPV (1-6), TRPM (1-8), TRPP (1-3), TRPML (1-3) et TRPA1 (Vassort and Fauconnier 2008). Même s'ils sont considérés comme des canaux cationiques non sélectifs, certains canaux ont une préférence importante pour les ions bivalents Ca²⁺, et d'autres pour les cations monovalents Na⁺ et K⁺. En régulant les flux ioniques, ces canaux occupent une position majeure dans le contrôle des activités cellulaires qui relaient la régulation du potentiel membranaire et les changements de la concentration calcique intracellulaire, mais jouent aussi un rôle dans des pathologies vasculaires tels l'hypertension artérielle, le stress oxydatif associé au processus d'ischémie et reperfusion ou à la formation d'œdème pulmonaire (Earley and Brayden 2015). Par exemple, plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression des TRPC1/6 chez des rats soumis à une hypoxie chronique, accompagnée d'une augmentation de la contractilité vasculaire, participant ainsi à l'hypertension pulmonaire. Ces observations sont absentes chez les animaux déficients pour ces récepteurs. En effet, l'hypertension pulmonaire est due, en partie, à une contractilité accrue des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire contribuant à l'augmentation de la résistance artérielle pulmonaire. De plus, une augmentation similaire du TRPC6 est observée dans les myocytes artériels pulmonaires chez des patients atteints d'hypertension pulmonaire idiopathique (Earley and Brayden 2015). Dans un modèle d'ischémie/reperfusion du poumon, l'œdème pulmonaire qui en résulte est moins important dans les souris déficientes pour le TRPC6 ; les auteurs montrent que l'activation de ce dernier dépend de la production des espèces réactives de l'oxygène et de la génération du diacylglycérol (Weissmann et al. 2012). Par ailleurs, plusieurs modèles expérimentaux d'œdèmes pulmonaires (par ventilation mécanique, aspiration d'acide, ou suite à une défaillance cardiaque) documentent l'importance du TRPV4 dans la formation de ces œdèmes suite à la diminution ou l'absence de perméabilité vasculaire pulmonaire dans les souris déficientes pour ce canal et soumises aux modèles, ou

traitées avec des inhibiteurs spécifiques avant l'induction (Earley and Brayden 2015). Néanmoins, les mécanismes responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans les poumons, en aval de l'entrée des ions Ca²⁺ suite à l'activation du TRPV4, ne sont pas connus (Villalta and Townsley 2013).

De ce fait, les canaux TRP constituent une cible thérapeutique intéressante pour moduler la perméabilité vasculaire dans des conditions pathologiques. Parmi ces canaux, les contributions des TRPV et des TRPC sont surtout évaluées dans le cadre des études de la perméabilité endothéliale pulmonaire, étant donné que ce sont les seules sous-familles exprimées par les cellules endothéliales dans les poumons (Villalta and Townsley 2013). Nous nous sommes intéressés à deux candidats, TRPC6 et TRPV4, dont le rôle est attesté dans des modèles de lésions pulmonaires et pour lesquels des inhibiteurs sélectifs existent, permettant d'explorer leur éventuel rôle dans l'induction du TRALI.

3.1. Le canal TRPC6

Le canal TRPC6 (Transient Receptor Potential Canonical 6) est exprimé dans plusieurs tissus, en particulier le cerveau, les reins, les vaisseaux et les poumons (Maier et al. 2015) ; il est activé par le diacylglycérol généré suite à l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G, et fait ainsi partie de la famille des canaux activés par la stimulation de récepteurs (Receptor-Operated Channel). Ce canal nous intéresse du fait de ses contributions dans (1) la régulation de la perméabilité vasculaire et l'inflammation (Tauseef et al. 2012), (2) la formation d'un œdème pulmonaire dans un modèle d'ischémie/reperfusion (Weissmann et al. 2012), (3) la vasoconstriction pulmonaire en condition d'hypoxie et l'échange gazeux alvéolaire (Weissmann et al. 2006), (4) la régulation du flux endothélial calcique et la perméabilité des cellules endothéliales en activant la voie de l'enzyme RhoA et en déstabilisant les contacts intercellulaires dans la barrière endothéliale (Singh et al. 2007, Samapati et al. 2012), ainsi que dans (5) la contractilité des cellules musculaires lisses (Dietrich et al. 2005, Gonzalez-Cobos and Trebak 2010).

3.2. Le canal TRPV4

Le canal TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloïde 4) est un mécanorécepteur activé par la chaleur, les contraintes mécaniques ou de cisaillement du flux sanguin, l'hypertrophie cellulaire suite à une rétention d'eau, et par les acides époxyeicosatriénoïques (produit du métabolisme de l'acide arachidonique). Il est exprimé

dans les poumons (Kunert-Keil et al. 2006) (cellules endothéliales, épithéliales et cellules musculaires lisses des voies aériennes), et s'avère impliqué dans la rupture de la barrière épithéliale alvéolaire en régulant le flux calcique (Alvarez et al. 2006). Il joue aussi un rôle délétère dans la formation des lésions pulmonaires induites dans des modèles animaux de ventilation mécanique forcée (Hamanaka et al. 2007), d'aspiration d'acide (Balakrishna et al. 2014) ou d'insuffisance cardiaque (Thorneloe et al. 2012). De plus, le TRPV4 est responsable de la vasoconstriction pulmonaire induite par les agonistes (vasoconstricteurs), comme le montre l'absence de contraction des artères pulmonaires isolées des souris déficientes pour ce récepteur, en présence de sérotonine. Ces souris présentent d'ailleurs une réactivité vasculaire diminuée suite à une hypoxie chronique, contrairement aux souris sauvages qui développent une hypertension pulmonaire dans cette condition (Xia et al. 2013). En outre, le TRPV4 est exprimé par les cellules inflammatoires (neutrophiles et macrophages) où son activation aggrave les dommages cellulaires (Hamanaka et al. 2010, Yin et al. 2016). En effet, l'injection de macrophages de souris sauvages dans des poumons isolés de souris déficientes pour le TRPV4, permet de restaurer le phénotype œdémateux induit par ventilation mécanique forcée (Hamanaka et al. 2010). *In vitro*, la production des espèces réactives de l'oxygène par les neutrophiles de souris déficientes pour le TRPV4, suite à la stimulation par le facteur d'activation plaquettaire, est atténuée. Ces neutrophiles présentent aussi une diminution de l'adhésion aux cellules endothéliales pré-activées par du LPS, et une réduction de leur transmigration (Yin et al. 2016). De plus, dans un modèle de lésions pulmonaires par aspiration d'acide, l'absence de TRPV4 seulement sur les cellules sanguines entraîne une réduction de l'activité de la myéloperoxydase dans les poumons, confirmant le rôle du TRPV4 dans la migration des neutrophiles *in vivo*. Néanmoins, la protection contre l'œdème pulmonaire n'est observée que si le TRPV4 est absent à la fois sur les cellules myéloïdes et celles du parenchyme tissulaire (Yin et al. 2016).

De ce fait, le TRPV4 est une cible intéressante pour agir au niveau des atteintes pulmonaires aiguës, surtout parce qu'il est exprimé par des cellules potentiellement impliquées dans le TRALI, à savoir les cellules endothéliales, les neutrophiles et les macrophages (Morty and Kuebler 2014).

Article (1) en soumission : Contribution majeure du récepteur P2X₁ de l'ATP dans le TRALI.

Title page

Title: Major contribution of ATP-gated P2X₁ ion channel in Transfusion-Related Acute Lung Injury

Short running head: The P2X₁ receptor in TRALI

Authors: Marie-Belle EL MDAWAR*, Blandine MAÎTRE*, Stéphanie MAGNENAT, Christian GACHET, Béatrice HECHLER[§], Henri DE LA SALLE [§]

* Both authors contributed equally to the work

[§] These authors share senior authorship

Attributions: Université de Strasbourg, INSERM, Etablissement Français du Sang (EFS) Grand Est, BPPS UMR_S 1255, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), F-67000

Address for correspondence: UMR_S1255 INSERM, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Grand Est, 10 rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France

email: beatrice.hechler@efs.sante.fr; henri.delasalle@efs.sante.fr

No reprints will be ordered

Sources of support: This work was supported by a project grant from the EFS (APR 2014) and by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique).

Conflict of interest: The authors state that they have no conflict of interest.

Word count: 3526.

ABSTRACT

Background: Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI) is a serious post-transfusion respiratory distress syndrome. The mechanisms of lung edema formation during TRALI still need to be clarified. Since extracellular nucleotides and their P2 receptors participate in inflammatory processes as well as in cellular responses to stress, we investigated the role of the ATP-gated P2X₁ cation channel in antibody-mediated TRALI. **Study design and methods:** A two-hit model of TRALI was used: mice were primed with lipopolysaccharides (LPS) and 24 h later challenged by administering an anti-MHC I antibody. Mice also received the selective P2X₁ receptor (P2RX₁) antagonist NF449 before LPS and/or antibody administration. Lung edema and respiratory distress were evaluated by histologic analyses, measurement of aortic pO₂, protein content of bronchoalveolar lavages and survival. Involvement of P2RX₁⁺ cells was investigated by cell specific depletion or the use of drugs. **Results:** When given before antibody administration, NF449 improved survival while maximal protection was achieved when NF449 was also administered before the sensitization step. Under this later condition, lung periarteriolar interstitial edemas and protein contents in bronchoalveolar lavages were reduced. Monocytes/macrophages, but not neutrophils, and arteriolar lung smooth muscle cells contributed to this effect. Accordingly, inhibition of TRPC6, another cation channel expressed by smooth muscle cells, also reduced TRALI-associated pulmonary interstitial and alveolar edemas. **Conclusion:** These data highlight a key role of receptors on monocytes/macrophages or smooth muscle cells like P2RX₁ or TRPC6 during TRALI. These receptors could represent new pharmacological targets for TRALI clinical handling.

Key words : acute lung injury ; pulmonary edema; purinergic receptors ;macrophages ; smooth muscle cells; transfusion.

INTRODUCTION

Transfusion-related acute lung injury (TRALI) is defined as a non-cardiogenic pulmonary edema occurring during or within 6 hours of blood transfusion.^{1,2} TRALI is the most prevalent remaining cause of transfusion-associated morbidity and mortality³ and there is no satisfactory therapeutic option.⁴ Retrospective studies have pointed to immunological triggers of TRALI, when anti-HLA I, anti-HLA II or anti-HNA alloantibodies are present in the transfused products, or to metabolic triggers, when various components including soluble CD40 ligand, chemokines and lipid metabolites are released during the storage of platelets and/or erythrocytes.⁵ Two circumstances are thought to concur to provoke this syndrome:⁶ an inflammatory state of the receiver (first hit) and the transfusion of a blood product containing allogeneic antibodies from the donor and/or storage-derived metabolites (second hit).

TRALI can be provoked in mice of the H-2^d MHC haplotype in a two-hit procedure mimicking the human pathology. The mice are sensitized by intraperitoneal administration of small amounts of lipopolysaccharide to induce an inflammatory state; 24h later, an anti-MHC I mAb (clone 34-1-2S) is injected, inducing TRALI within minutes.^{7,8} Hematopoietic cells are major effectors of TRALI responses provoked by anti-MHC I antibodies, but the role of the different populations is controverted. Previous studies pointed to a key contribution of neutrophils,⁹ while other works rather indicated a major role of monocytes/macrophages.^{10,11} In addition, we showed that platelets do not play a critical role in experimental TRALI,⁷ in contrast to previous observations.⁸

During acute lung injury, a plethora of stimuli can induce the release of the damage associated molecular pattern adenosine 5'-triphosphate (ATP) from various cell types such as endothelial and immunological cells, platelets and/or stressed erythrocytes. Two classes of

membrane receptors mediate the effects of ATP, the ligand-gated P2X cation channels and the G protein-coupled P2Y receptors.^{12,13} They are expressed in various combinations depending on the cell type, notably by cells participating in vascular homeostasis.¹³⁻¹⁶ ATP receptors positively regulate the recruitment and activation of inflammatory cells¹⁷ or control vascular parameters such as endothelial barrier integrity and hemodynamics.¹⁵ Among these receptors, the P2X1 receptor (P2RX₁) is expressed on numerous cell types involved in vascular homeostasis and/or immunity, namely arterial smooth muscle cells (SMCs), neutrophils, macrophages and platelets and therefore might control inflammatory processes pivotal to the pathogenesis of TRALI. We investigated whether this receptor influences the pathogenesis of TRALI and if so, which P2RX₁⁺ cells could be involved and could potentially represent a biological target relevant to TRALI-associated pathologic responses.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

LPS (*Escherichia coli*, serotype 055: B5) was from Sigma-Aldrich. NF449 (4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis(carbonylimino))) tetrakis-benzene-1,3-disulphonic acid, octasodium salt) and SAR7334 were provided by Tocris Bioscience. Xylazine (Rompun) and ketamine (Imalgene 1,000) were from Bayer and Merial, respectively. Clodronate liposomes (clodronate 5 mg/mL) were purchased from LIPOSOMA. The allogeneic anti-mouse MHC class I (H-2K^d/H-2D^d) mAb (clone 34-1-2S, IgG2a) was from e-Biosciences or Bio X Cell and FITC-labeled anti-Ly6C (clone AL-21) from BD Biosciences Pharmingen. Rat anti-mouse Ly6G (clone 1A8), A700-labeled anti-CD45 (clone 30-F11) and A647-labeled anti-CD11b (clone M1/70) were from Biolegend. Anti-CCR2 (clone MC-21) was kindly provided by Dr. Matthias Mack (University of Regensburg, Germany).¹⁸

Mice

Experiments were performed using 8 to 10 week-old male BALB/c mice purchased from Charles River Laboratories. The mice were housed in the animal facilities of the EFS-Grand Est (agreement N° E67-482-10). Ethical approval for the animal experiments was obtained from the French Ministry of Research, in accordance with the guidelines of the Regional Committee for Ethics in Animal Experimentation of Strasbourg (CREMEAS, CEEA-35).

Two-event TRALI model

A previously described two-hit model was used.⁸ Male BALB/c mice (8 to 10 weeks old) were primed with an intraperitoneal injection of LPS (0.1 mg/kg) 24 h before being anesthetized

(xylazine (20 mg/kg body weight) and ketamine (100 mg/kg body weight)) and challenged with an anti-H-2K^d mAb (clone 34-1-2S, 0.5 mg/kg), its isotype control or saline, injected retro-orbitally. The mice were maintained at 37°C and sacrificed 10 min or 2 h after injection of the anti-MHC I mAb.

Drug administration and specific cell depletion

NF449 (10 mg/kg in saline) was delivered i.v. 5 min prior to LPS sensitization and again 5 min before anti-MHC I mAb injection. In some experiments, the mice received NF449 either before LPS or before the anti-MHC I mAb. SAR7334 (10 mg/kg in saline) was injected retro-orbitally into isoflurane (Vetflurane) anesthetized animals, 30 min before TRALI experiments. Anti-Ly6G antibody (clone 1A8, 5 mg/kg in saline) was delivered i.v. 24 h prior to LPS. Anti-CCR2 antibody (clone MC-21, 0.4 mg/kg in saline) was injected i.p. and clodronate liposomes (2 mL/kg) were injected i.v., 18 h after LPS administration, i.e., 6 h prior to injection of the anti-MHC I mAb.

Leukocyte counts were determined in whole blood collected into EDTA (6 mmol/L) by severing the tail of anesthetized mice, using a Scil Vet ABC automatic cell counter (Scil Animal Care Company) set to murine parameters. The percentages of peripheral neutrophils and inflammatory monocytes were determined as described in Flow cytometry paragraph, the absolute counts of the cells were deduced.

Partial oxygen pressure (pO₂)

The partial oxygen pressure (pO₂) was measured in blood drawn into a syringe containing heparin anticoagulant (50 U/mL) from the abdominal aortas of anesthetized mice, 10 min after anti-MHC I injection, using a Critical Care Analyser (OMNIS S; Roche Diagnostics).

Protein content of bronchoalveolar lavages (BALs)

At 10 min or 2 h after induction of TRALI, a ligation was performed to isolate the left lung (used later for immunohistochemistry), the tracheas of sacrificed mice were exposed and cannulated and 1 mL of sterile PBS solution was injected into the right lung. The bronchoalveolar lavages (BALs) were centrifuged at 13,000 x g for 5 min at 4°C and the supernatants were stored at -80°C. The protein content of BALs was quantified using a bicinchoninic acid assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions with bovine serum albumin (BSA) as the standard.

Immunohistochemistry

At the end of the experiments, the left lungs of the mice were removed and fixed in 4% paraformaldehyde overnight. The fixed samples were washed in PBS and maintained in 10% and then 20% sucrose solutions, each time for 24 h, before being snap-frozen in optimal cutting temperature (OCT) embedding medium. Sections (8 µm) were stained with hematoxylin and eosin before histological examination. The areas occupied by edema and by the arterioles were quantified using Image J software on images acquired with a Leica DMLB microscope and the ratio was calculated. The investigator was blinded to the various experimental groups.

Flow cytometry

Briefly, after TRALI experiments, the lungs of the mice were perfused with 10 mL of PBS, excised, minced and digested for 30 min with collagenase type 4 (500 U/mL) and DNase I (0.02 mg/mL) (Worthington) in PBS. After incubation, the cells were washed in PBS and then labeled with directly conjugated anti-CD45, -CD11b, -CD11c, -CD24, -Gr1, -CD170, -F4/80 and -MHC class II mAbs (see Supplementary Methods for details).

Cell depletions were controlled by flow cytometric analysis of blood cells stained with directly conjugated anti-CD45, -CD115 and -CD11b mAbs, or with anti-CD45 and anti-Ly6C mAbs to determine the percentages of neutrophils and inflammatory monocytes, respectively.

Flow cytometric data were acquired on a Fortessa-X20 flow cytometer (BD Biosciences) and the cell populations were analyzed using BD FACSDiva software.

RESULTS

The P2X₁ receptor antagonist NF449 decreases the severity of experimental TRALI

To explore the role of P2RX₁, we used an experimental TRALI model consisting of administration of the anti-MHC I mAb 34-1-2S (anti-H-2K^d, -H-2D^d, 0.5 mg/kg) in LPS-sensitized H-2^d BALB/c mice, taking advantage of the availability of the selective P2RX₁ antagonist NF449.^{19,20} NF449 displays good selectivity for the P2RX₁ with respect to other P2 receptor subtypes and potently antagonizes (IC₅₀=5.8 ± 2.2 μM) the P2RX₁-mediated calcium influx induced by α,β-methyleneadenosine 5'-triphosphate (α,βMeATP) in murine platelets.²⁰⁻²²

BALB/c mice were treated with NF449 (10 mg/kg, i.v.) or vehicle (saline) prior to LPS injection (0.1 mg/kg, i.p.) and anti-MHC I antibody challenge (0.5 mg/kg, i.v.). Ten minutes later, the features of experimental TRALI, such as lung edema and the drop in blood oxygenation, can be measured whereas survival is evaluated within a 2 h time frame. Lung edema is evaluated by quantifying the proteins in bronchoalveolar lavages and respiratory distress by the measure of the partial oxygen pressure (pO₂) in aortic blood as previously described.⁷ After 10 min, the protein content of BALs was significantly lower in NF449-treated than in saline-treated animals (Figure 1A, left panel). Accordingly, histological analyses of lung tissues revealed larger areas of interstitial periarteriolar edema in saline-treated mice as compared to those receiving NF449 (Figure 1B, C), while no edema was observed in the proximity of the post-alveolar microcirculation (Supplementary Figure 1). Nevertheless, pO₂ dropped similarly in both groups (Figure 1A, right panel).

Within the two hours following antibody injection, 56% of the control mice (treated with saline) died, while this percentage fell to 16% in mice receiving NF449 (Figure 1D, left panel). The protein content of BALs was significantly increased in saline-treated mice challenged with the anti-MHC I antibody as compared to non-challenged mice (Figure 1D, right panel). On the other

hand, treatment with NF449 reduced the protein concentration in BALs by more than two-fold (Figure 1D, right panel). Altogether, these results indicated that in mice, NF449 reduces the tissue damage provoked by immunological TRALI, which allows better survival.

NF449 needs to be administered before each step of experimental TRALI to provide maximal protection

We then investigated whether NF449 needed to be administered at each step of the two-hit experimental TRALI model, i.e., before LPS sensitization and/or before anti-MHC I mAb challenge, to reduce its pathology. The survival of the animals that received saline or NF449 prior to LPS sensitization only was similar (Figure 2A). Therefore, administration of NF449 exclusively before LPS sensitization did not improve survival.

In contrast, when NF449 was delivered only before the anti-MHC I antibody challenge, 33% of the mice died as compared to 60% of saline-receiving animals (Figure 2B). Interestingly, whereas the whole survival curves of saline- and NF449-treated mice revealed no significant differences, survival at the 120 min endpoint was significantly improved in those receiving NF449 (n=32, * p=0.0384, χ^2 test). Thus, treatment with NF449, before antibody administration only, improved survival, while maximal reduction of the severity of experimental TRALI required administration of NF449 also before the sensitization step.

The protective effect of NF449 does not rely on neutrophils and inflammatory monocytes

Subsequently, we evaluated the contribution of P2RX₁⁺ immunological cells to TRALI, namely neutrophils, monocytes and macrophages. Neutrophils can be selectively depleted for at least three days by treatment with the anti-Ly6G mAb 1A8.²³ This antibody was administered 24 h before LPS sensitization and flow cytometric analyses performed 48 h later, before anti-MHC I

injection, confirmed their depletion (Supplementary Figure 2A). The pathology of TRALI at the 10 min time point was similar in 1A8-treated and untreated mice, as assessed by the measure of the protein concentration in BALs and the pO₂ (Figure 3A).

We next tested whether NF449 still has a protective effect on survival in neutropenic animals over a 2 h time course. In the absence of NF449 treatment, neutrophil depletion did not modify the severity of immunological TRALI in terms of survival at the 2 h endpoint (Figure 3B left panel). In contrast, 80% of mice treated with NF449 survived regardless of the neutrophil count (Figure 3B, left panel). Accordingly, the protein content of BALs was similarly elevated after TRALI in neutropenic and non-neutropenic mice that did not receive NF449 (Figure 3B, right panel), but significantly decreased in NF449-treated animals (Figure 3B, right panel). These results indicated that neutrophils do not play a major role in experimental TRALI and hence that other cell types must be responsible for the contribution of P2RX₁ to TRALI.

Then, we used clodronate liposomes, which eliminate all types of monocytes and also macrophages.²⁴ To allow inflammation to proceed, the liposomes were delivered 18 h after LPS, i.e., 6 h before anti-MHC I mAb injection. Flow cytometric analyses confirmed that this procedure depleted tissue macrophages and peripheral monocytes (Supplementary Figure 3A and B). Under these conditions, immunological TRALI was totally abolished. Indeed, 10 min after anti-MHC I administration, the protein content of BALs was dramatically reduced in clodronate-treated mice as compared to control animals (Figure 4A, left panel) and no interstitial edema was observed on histological preparations (Figure 4A, right panel).

We then attempted to evaluate the specific contribution of monocytes. Monocytes can be divided into two main subtypes, the patrolling and the inflammatory monocytes. The former weakly express Ly6C and are CCR2⁻, whereas the latter are Ly6C⁺ and CCR2⁺ and represent the major subclass of blood monocytes (80% of monocytes in BALB/c mice, data not shown). This

pattern allows the depletion of the inflammatory monocytes, whereas there is no available treatment to specifically deplete patrolling monocytes in BALB/c mice. The administration of the anti-CCR2 mAb MC-21, 18 h after LPS treatment, i.e., 6 h before the anti-MHC I mAb, resulted in the depletion of inflammatory monocytes (Supplementary Figure 2B), in accordance with previous studies.¹⁸ This cell specific depletion did not modify the development of TRALI as assessed by measurement of the protein content of BALs (Figure 4B, left panel) and the aortic pO₂ (Figure 4B, right panel). We could therefore conclude that inflammatory monocytes are dispensable for the initiation of experimental immunological TRALI.

Altogether, these findings strongly indicate that activation of patrolling monocytes and/or macrophages triggers the pathology of TRALI and that their P2RX₁ could contribute to TRALI.

The protective effect of NF449 is consistent with a contribution from P2RX₁ expressed on lung periarteriolar smooth muscle cells

The development of pulmonary periarteriolar edemas during TRALI early biological responses might be driven in part by the pulmonary arterial pressure. The blood pressure in the lung pre-capillary arterioles is controlled by SMCs. Contraction of these cells is positively regulated by P2RX₁ present on their surface²⁵ and their deficiency prevents the development of pulmonary arterial hypertension.²⁵ Thus, the reduced edema areas in NF449-treated mice could be due to the inhibition of periarteriolar SMC contraction. Interestingly, inhibition of another cation channel, the TRPC6 calcium channel, which is expressed by pulmonary SMCs, also inhibits pulmonary arterial hypertension and the associated edema during acute lung injury.²⁶ We therefore tested the effects on TRALI of SAR7334, a specific inhibitor of TRPC6. SAR7334 was administered i.v. 30 min before the anti-MHC I mAb and TRALI responses were analyzed 10 min later. Remarkably, the quantity of proteins in BALs was reduced in animals receiving the inhibitor

(Figure 5A, left panel). Histological analyses of the lungs revealed that the extent of the periarteriolar edema was diminished after SAR7334 treatment (Figure 5B, right panel). Thus, inhibition of the TRPC6 calcium channel expressed by SMCs reduced the formation of TRALI-associated lung edema. These findings strongly suggest that the P2RX₁ present on lung periarteriolar SMCs could also contribute to the protective effect of NF449.

DISCUSSION

Our present study shows that NF449 reduces the severity of TRALI in mice, indicating a major contribution of the P2X₁ receptor. Maximal reduction of the experimental TRALI features required treatment with NF449 before the sensitization step with LPS and before administration of the anti-MHC I mAb. However, NF449 treatment before injection of the anti-MHC I mAb only, also resulted in a significant improvement in the survival of the animals.

Here we used different treatments and pharmacological approaches in BALB/c mice (H-2^d) rather than genetically modified mice in C57BL/6 (H-2^b). Of note, a model of TRALI in C57BL/6 mice was recently proposed,²⁷ but it requires very large amounts of the mAb 34-1-2S (45 mg/kg) and consequently large volumes of intravenously injected antibody (600 µL). Thus, although this model is promising in that it enables the use of transgenic mice, the particular experimental conditions make the interpretation of the results unsure.

Our results suggest that P2RX₁ controls different mechanisms at each step of the two-hit model. LPS responsive cells, namely monocytes or macrophages, which express P2RX₁,²⁸ were most likely the primary targets of NF449 in the first hit. The role of P2RX₁ on these cells during LPS sensitization remains to be clarified.

In the second step, the protective effect of NF449 could be related to all cell types expressing the P2RX₁ and participating in vascular homeostasis. Endothelial cells (ECs) and platelets were not considered, since ECs do not express P2RX₁, while platelets are dispensable for the initiation of TRALI.⁷ We first explored the role of neutrophils since P2RX₁ has been shown to contribute to neutrophil responses by amplifying chemotactic signals,^{29,30} although their role in TRALI is still under debate.^{9,11} Here, their immunodepletion did not modify the features of

experimental TRALI at the 10 min or 2 h time points. Our data concur to exclude a major role of neutrophils during the initiation of anti-MHC I antibodies-induced TRALI.

Monocytes and macrophages were depleted with clodronate liposomes 18 h after LPS i.e., at least 6 h after the maximum concentration of inflammatory cytokines in the blood had been reached.³¹ Six hours later, the vast majority of monocytes and tissue macrophages had been eliminated and immunological TRALI was completely abolished. Furthermore, immunodepletion of CCR2⁺ inflammatory monocytes, using the same time frame, did not influence the development of TRALI, indicating that inflammatory monocytes are not key players in this syndrome. Of note, genetically deficient animals cannot be used to investigate the role of these cells in the two-hit model of TRALI since monocytes and macrophages are essential for the production of inflammatory cytokines induced by LPS. Our findings are in agreement with previous studies exploring TRALI under different experimental conditions.^{10,11} Our results suggest that activation of a subpopulation of lung macrophages or dendritic cells could disrupt the integrity of the endothelial barrier in their close proximity. Alternatively, distal Kupffer cells or splenic macrophages could participate in TRALI, as observed in other ALI models.³²

Interstitial lung edemas were observed in the pre-microcapillary arteriolar spaces but not in the post-alveolar circulation. Remarkably, the protective effect of NF449 was associated with a reduction of such interstitial edemas. These observations are consistent with previous reports showing that alveolar edema occurs when periarteriolar edema exceeds a threshold, which led to propose that plasma leaks through periarteriolar SMCs before flooding into the alveoli.³³ Recent investigations based on real time analyses of the development of lung edema in pigs (oleic acid induced ALI)³⁴ or in man (post-reperfusion ALI after lung transplantation)³⁵ support this hypothesis: the extravascular lung water volume increased before a defect in blood oxygenation

could be measured. These observations strongly suggest that, during TRALI, interstitial edema could also precede alveolar edema.

The modulation of lung periarteriolar edema by NF449 suggested that P2RX₁⁺ vascular SMCs could also represent a target of this drug. Indeed, stimulation of these cells induces vasoconstriction in a P2RX₁-dependent manner, resulting in pulmonary arterial hypertension, which is in part responsible for edema formation.²⁵ Of note, in a rat model of TRALI, transfusion of the plasma from aged erythrocyte concentrates was accompanied with an increase of pulmonary arterial blood pressure.⁶ TRPC6 is another calcium channel expressed by SMCs which positively controls vasoconstriction, pulmonary arterial hypertension and edema formation.^{26,36} Remarkably, we showed that the TRPC6 inhibitor SAR7334 also reduced the accumulation of proteins in BALs and the extent of the periarteriolar edema provoked by TRALI. Our observations are important as they could represent the first example of a protective effect *in vivo* of a specific TRPC6 inhibitor.²⁶ TRPC6 is also expressed by ECs and regulates, *in vitro*, the permeability of lung ECs. In the absence of tissue-specific TRPC6-deficient animals, the hierarchy of the contributions of TRPC6 on these cells and SMCs to TRALI remains to be further studied. Thus, we cannot formally exclude that inhibition of endothelial TRPC6 also contributes to the protective influence of SAR7334. Taken together, these findings strongly support a similar implication of TRPC6 and P2RX₁ on lung periarteriolar SMCs in immunological TRALI.

TRALI is an acute respiratory distress syndrome. Currently, the mainstay of treatment for patients remains general supportive care, including fluid resuscitation, oxygenation or mechanical ventilation.³⁷ No pharmacological agents able to improve its outcome have yet been identified. Although therapies like corticosteroids, nitric oxide, exogenous surfactants, antioxidants and blockade of cytokines or the arachidonic acid cascade have displayed promising protective effects in animal models, these results have failed to translate positively in human clinical studies.³⁷

Nevertheless, studies indicate that the administration of IL-10 or CRP inhibitors could represent promising therapeutic or prophylactic therapies against TRALI.³⁸ Our findings now suggest that, by reducing interstitial lung edema, P2RX₁ and TRPC6, could represent additional pharmacological targets for TRALI management.

In conclusion, our work shows that antagonists of cation channels, like P2RX₁ or TRPC6, can reduce the pathogenesis of TRALI. These receptors could represent new targets for pharmacological approaches for the management of TRALI. These results also open up the perspective of negatively controlling the very early steps of ischemia-reperfusion associated ALI observed after lung transplantation,³⁵ which would be of considerable interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank M. Freund and her collaborators for animal care and J. Mulvihill for revising the English of the manuscript.

They also thank Véronique Heim for technical assistance.

REFERENCES

1. Kleinman S, Caulfield T, Chan P, et al. Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 2004;44: 1774-89.
2. Muller JY. [TRALI: from diagnosis to prevention]. *Transfus Clin Biol* 2005;12: 95-102.
3. Toy P, Gajic O, Bacchetti P, et al. Transfusion-related acute lung injury: incidence and risk factors. *Blood* 2012;119: 1757-67.
4. Otrrock ZK, Liu C, Grossman BJ. Transfusion-related acute lung injury risk mitigation: an update. *Vox Sang* 2017;112: 694-703.
5. Tariket S, Sut C, Hamzeh-Cognasse H, et al. Transfusion-related acute lung injury: transfusion, platelets and biological response modifiers. *Expert Rev Hematol* 2016;9: 497-508.
6. Silliman CC, McLaughlin NJ. Transfusion-related acute lung injury. *Blood Rev* 2006;20: 139-59.
7. Hechler B, Maitre B, Magnenat S, et al. Platelets are dispensable for antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in the mouse. *J Thromb Haemost* 2016;14: 1255-67.
8. Looney MR, Nguyen JX, Hu Y, et al. Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2009;119: 3450-61.
9. Looney MR, Su X, Van Ziffle JA, et al. Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2006;116: 1615-23.

10. McKenzie CG, Kim M, Singh TK, et al. Peripheral blood monocyte-derived chemokine blockade prevents murine transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Blood* 2014;123: 3496-503.
11. Strait RT, Hicks W, Barasa N, et al. MHC class I-specific antibody binding to nonhematopoietic cells drives complement activation to induce transfusion-related acute lung injury in mice. *J Exp Med* 2011;208: 2525-44.
12. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006;58: 281-341.
13. Coddou C, Yan Z, Obsil T, et al. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 2011;63: 641-83.
14. North RA, Jarvis MF. P2X receptors as drug targets. *Mol Pharmacol* 2013;83: 759-69.
15. Ralevic V. P2X receptors in the cardiovascular system and their potential as therapeutic targets in disease. *Curr Med Chem* 2015;22: 851-65.
16. Vial C, Hechler B, Leon C, et al. Presence of P2X1 purinoceptors in human platelets and megakaryoblastic cell lines. *Thromb Haemost* 1997;78: 1500-4.
17. Corriden R, Insel PA. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 2010;3: re1.
18. Bruhl H, Cihak J, Plachy J, et al. Targeting of Gr-1+,CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56: 2975-85.
19. Hechler B, Magnenat S, Zighetti ML, et al. Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriyl)bis-

- (carbonylimino)))tetrakis -benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt]. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314: 232-43.
20. Kassack MU, Braun K, Ganso M, et al. Structure-activity relationships of analogues of NF449 confirm NF449 as the most potent and selective known P2X1 receptor antagonist. *Eur J Med Chem* 2004;39: 345-57.
 21. Braun K, Rettinger J, Ganso M, et al. NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;364: 285-90.
 22. Hulsmann M, Nickel P, Kassack M, et al. NF449, a novel picomolar potency antagonist at human P2X1 receptors. *Eur J Pharmacol* 2003;470: 1-7.
 23. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, et al. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 2008;83: 64-70.
 24. Abou Elela S, Nazar RN. Role of the 5.8S rRNA in ribosome translocation. *Nucleic Acids Res* 1997;25: 1788-94.
 25. Visovatti SH, Hyman MC, Goonewardena SN, et al. Purinergic dysregulation in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016;311: H286-98.
 26. Malczyk M, Erb A, Veith C, et al. The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature. *Front Immunol* 2017;8: 707.
 27. Kapur R, Kim M, Aslam R, et al. T regulatory cells and dendritic cells protect against transfusion-related acute lung injury via IL-10. *Blood* 2017;129: 2557-69.
 28. Lopez-Lopez C, Jaramillo-Polanco J, Portales-Perez DP, et al. Two P2X1 receptor transcripts able to form functional channels are present in most human monocytes. *Eur J Pharmacol* 2016;793: 82-8.

29. Lecut C, Frederix K, Johnson DM, et al. P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation. *J Immunol* 2009;183: 2801-9.
30. Maitre B, Magnenat S, Heim V, et al. The P2X1 receptor is required for neutrophil extravasation during lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia in mice. *J Immunol* 2015;194: 739-49.
31. Huang H, Liu T, Rose JL, et al. Sensitivity of mice to lipopolysaccharide is increased by a high saturated fat and cholesterol diet. *J Inflamm (Lond)* 2007;4: 22.
32. Savas C, Ozogul C, Karaoz E, et al. Splenectomy reduces remote organ damage after intestinal ischaemia-reperfusion injury. *Acta Chir Belg* 2003;103: 315-20.
33. Staub NC. Pulmonary edema. *Physiol Rev* 1974;54: 678-811.
34. Gargani L, Lionetti V, Di Cristofano C, et al. Early detection of acute lung injury uncoupled to hypoxemia in pigs using ultrasound lung comets. *Crit Care Med* 2007;35: 2769-74.
35. Pottecher J, Roche AC, Degot T, et al. Increased Extravascular Lung Water and Plasma Biomarkers of Acute Lung Injury Precede Oxygenation Impairment in Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation. *Transplantation* 2017;101: 112-21.
36. Earley S, Brayden JE. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev* 2015;95: 645-90.
37. Vlaar APJ, Juffermans NP. Transfusion-related acute lung injury: a clinical review. *The Lancet* 2013;382: 984-94.
38. Semple JW, McVey MJ, Kim M, et al. Targeting Transfusion-Related Acute Lung Injury: The Journey From Basic Science to Novel Therapies. *Crit Care Med* 2018;46: e452-e8.

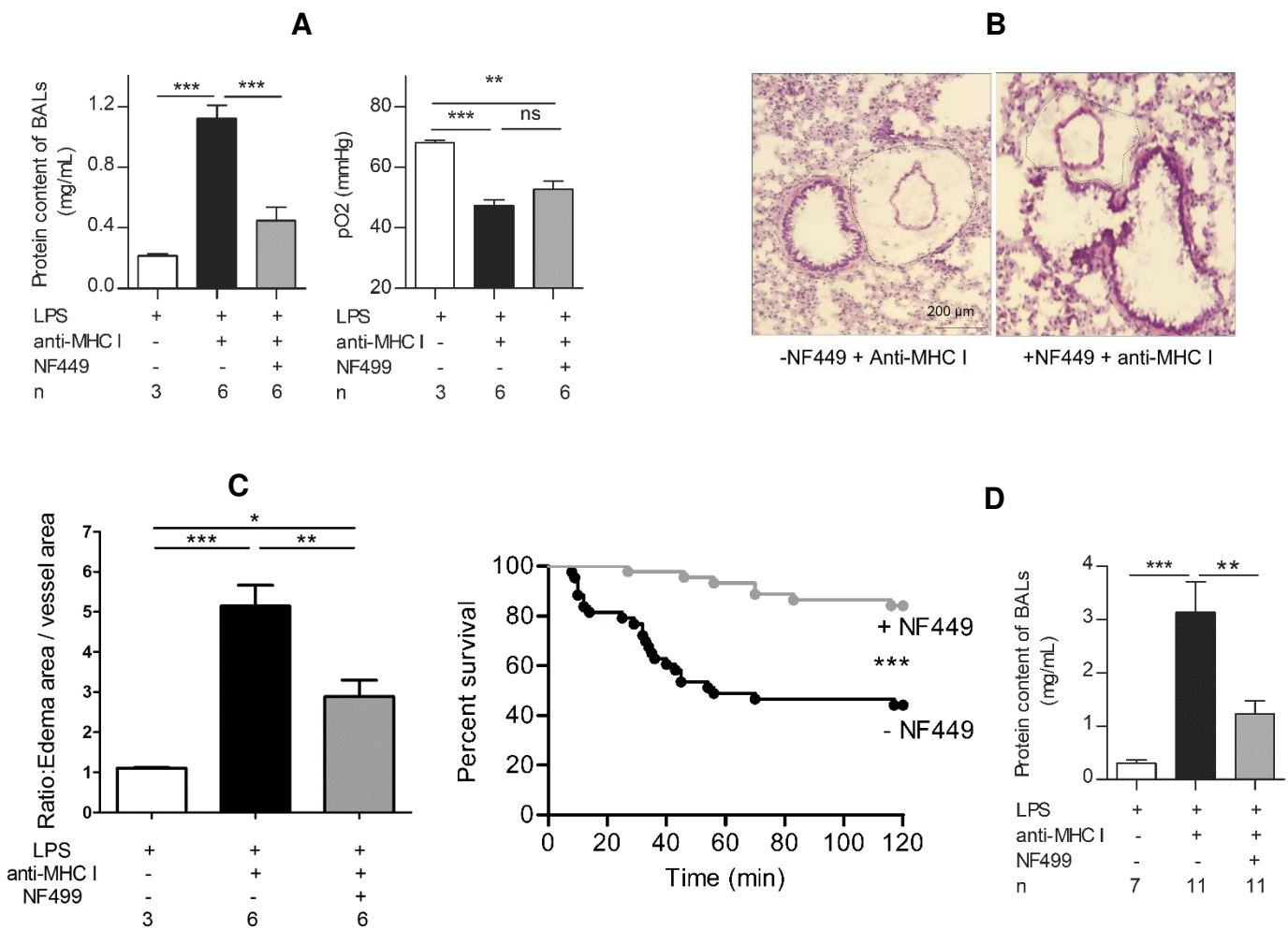


Figure 1-1. NF449 protects mice against experimental TRALI at early and late stages

NF449 (10 mg/kg, i.v.) was administered prior to LPS injection (0.1 mg/kg, i.p.) and prior to anti-MHC I antibody challenge (0.5 mg/kg, i.v.). The pathogenesis of TRALI was analyzed 10 min after anti-MHC I mAb injection (**A, B, C**) or 2 h later (**D**). In histograms, the numbers of animals are indicated (n). (**A**) **Left panel:** analysis of protein concentrations in BALs using a BCA assay, mean \pm SEM (***) $p < 0.001$. **Right panel:** pO₂ in aortic blood, mean \pm SEM (ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (**B**) Representative lung sections stained with eosin and hematoxylin showing periarteriolar edema. (**C**) Ratio of the area of vessels and periarteriolar edema to that of vessels, mean \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (**D**) **Left panel:** Kaplan-Meier survival plots for mice treated with NF449 or vehicle (saline solution) (n=20, *** $p < 0.0001$, log-rank test). **Right panel:** analysis of protein concentrations in BALs using a BCA assay, mean \pm SEM (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

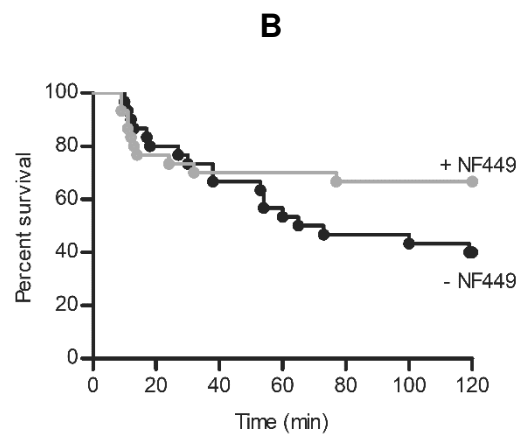
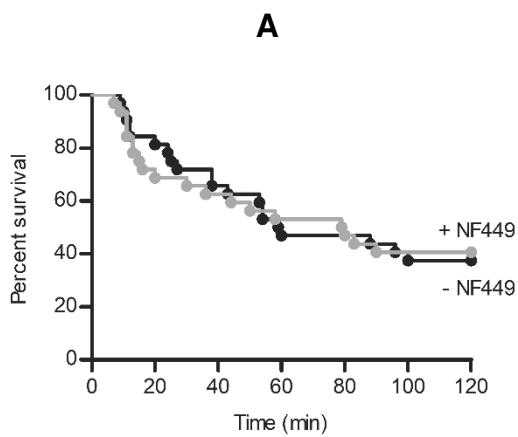


Figure 1-2. NF449 needs to be administered before each step of experimental TRALI to provide maximal protection

(A) Effect of the administration of NF449 (10 mg/kg, i.v.) before LPS injection only (0.1 mg/kg, i.p.). Kaplan-Meier survival plots for mice treated with NF449 or vehicle (saline solution) (n=30, ns p>0.05, log-rank test). **(B)** Effect of the administration of NF449 (10 mg/kg, i.v.) before anti-MHC I antibody challenge only (0.5 mg/kg, i.v.). Left panel: Kaplan-Meier survival plots for mice treated with NF449 or vehicle (saline solution) (n=32, ns p>0.05, log-rank test). Statistical analysis of survival at the 2-hour endpoint indicated a significant protective effect of NF449 (n=32, * p=0.0384, χ^2 test).

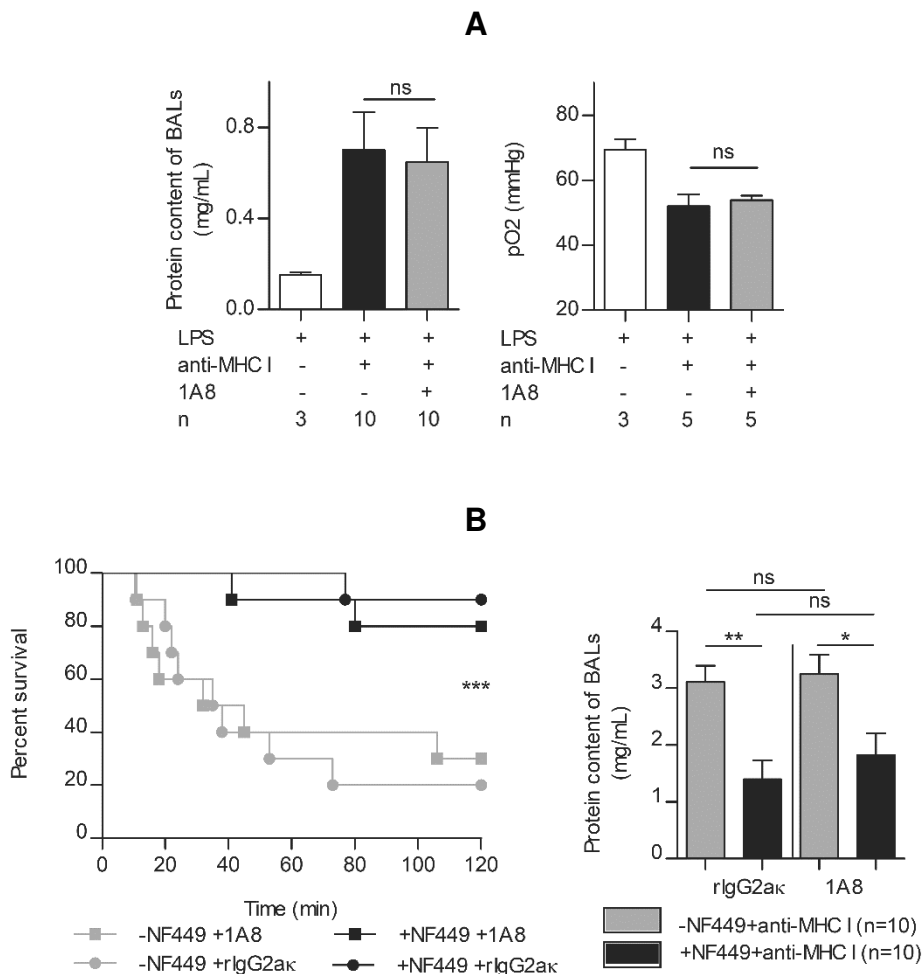


Figure 1-3. Neutrophil depletion does not prevent the development of TRALI, whereas treatment with NF449 does

(A) The mAb 1A8 (5 mg/kg, i.v.), or rlgG2ak, was administered 24 h before LPS (0.1 mg/kg, i.p.) and the pathogenesis of TRALI was analyzed 10 min after anti-MHC I mAb challenge (0.5 mg/kg, i.v.). **Left panel:** protein concentrations in BALs, mean \pm SEM (ns $p > 0.05$). **Right panel:** pO_2 in aortic blood, mean \pm SEM (ns $p > 0.05$). **(B)** The mAb 1A8, or rlgG2ak, was injected 24 h before LPS, NF449 (10 mg/kg, i.v.) was delivered prior to LPS injection and prior to anti-MHC I mAb challenge (0.5 mg/kg, i.v.) and the pathogenesis of TRALI was analyzed 2 h later. **Left panel:** Kaplan-Meier survival plots for mice treated or not with 1A8 and/or NF449 (** $p < 0.001$, log-rank test, -NF449 vs +NF449). **Right panel:** protein concentrations in BALs, mean \pm SEM (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). In histograms, the numbers of animals are indicated (n).

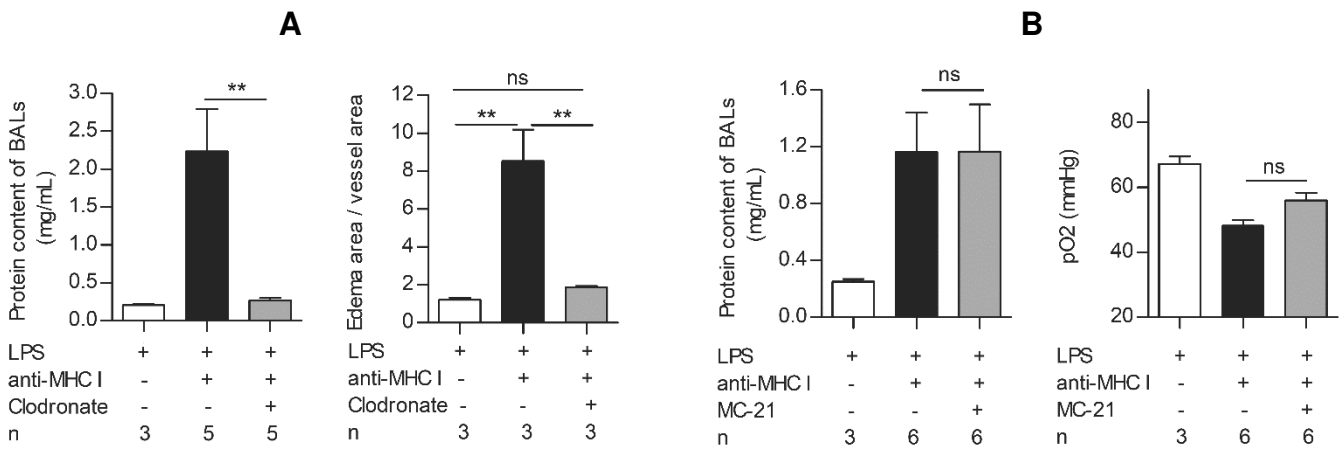


Figure 1-4. Monocyte/macrophage depletion, but not inflammatory monocyte depletion, prevents the development of TRALI

(A) Clodronate liposomes (2 mL/kg, i.v.), or saline, were injected 6 h before the anti-MHC I mAb (0.5 mg/kg, i.v.). **Left panel:** protein concentrations in BALs, mean \pm SEM (** $p < 0.01$). **Right panel:** ratio of the area of interstitial edema to the vessel area, mean \pm SEM (ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$). **(B)** MC-21 (0.4 mg/kg, i.p.), or rIgG2bk, was injected 6 h before anti-MHC I mAb challenge (0.5 mg/kg, i.v.). **Left panel:** protein concentrations in BALs. **Right panel:** pO₂ in aortic blood, mean \pm SEM (ns $p > 0.05$). In histograms, the numbers of animals are indicated (n).



Figure 1-5. The TRPC6 inhibitor SAR7334 decreases the extent of lung edema LPS-sensitized mice received SAR7334 (10 mg/kg) and 30 min later, the mAb 34-1-2S (0.5 mg/kg). **(A)** Protein concentrations in BALs, mean \pm SEM (* $p < 0.05$). **(B)** Ratio of the area of vessels and periarteriolar edema to that of vessels, mean \pm SEM (* $p < 0.05$). In histograms, the numbers of animals are indicated (n).

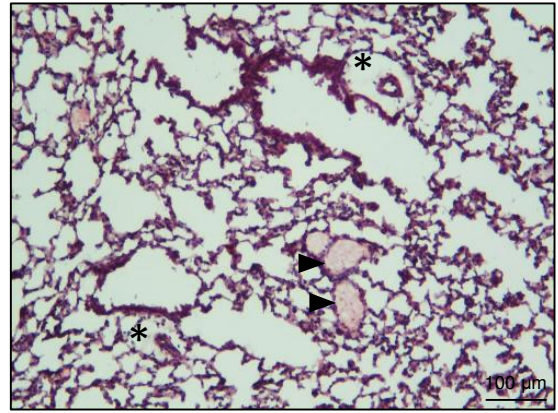
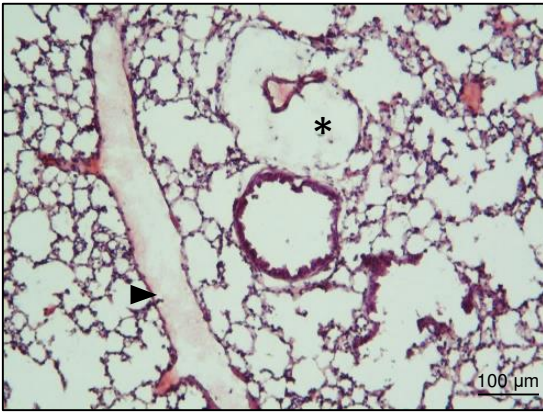
Supplementary materials

Single cell preparation for flow cytometry

Lungs were perfused with PBS via the right ventricle and an incisure was made in the vena cava as an outlet. Lungs were removed *en bloc* and minced with a scalpel. Minced lungs were placed in PBS with 500 U/mL type IV collagenase and 0.02 mg/mL DNase I and were incubated at 37°C for 30 min. Digested lungs were passed through a 40 µm filter to obtain single cell suspension.

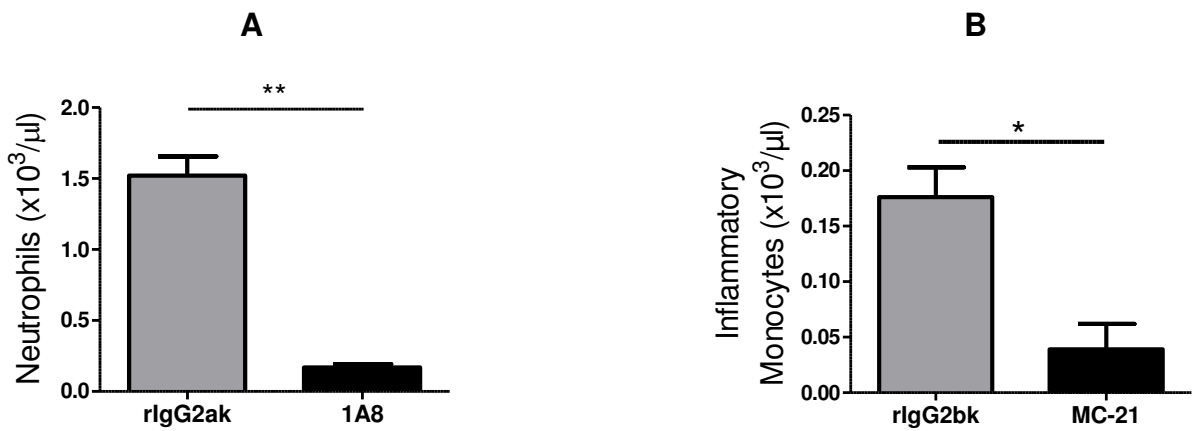
Flow cytometry and analysis

Cells were counted (ADAM Automated Cell Counter, Digital Bio), resuspended in PBS-1% BSA and Fcγ receptors were blocked with FcR blocking reagent (Milteny Biotec). Cells were then stained with a cocktail of antibodies described above (Reagents) to define lung inflammatory cells subsets. Flow cytometric acquisition was performed using a Fortessa-X20 flow cytometer (BD Biosciences) and data were analysed using BD FACSDiva software. All subsets were gated using fluorescence minus one (FMO) analysis.



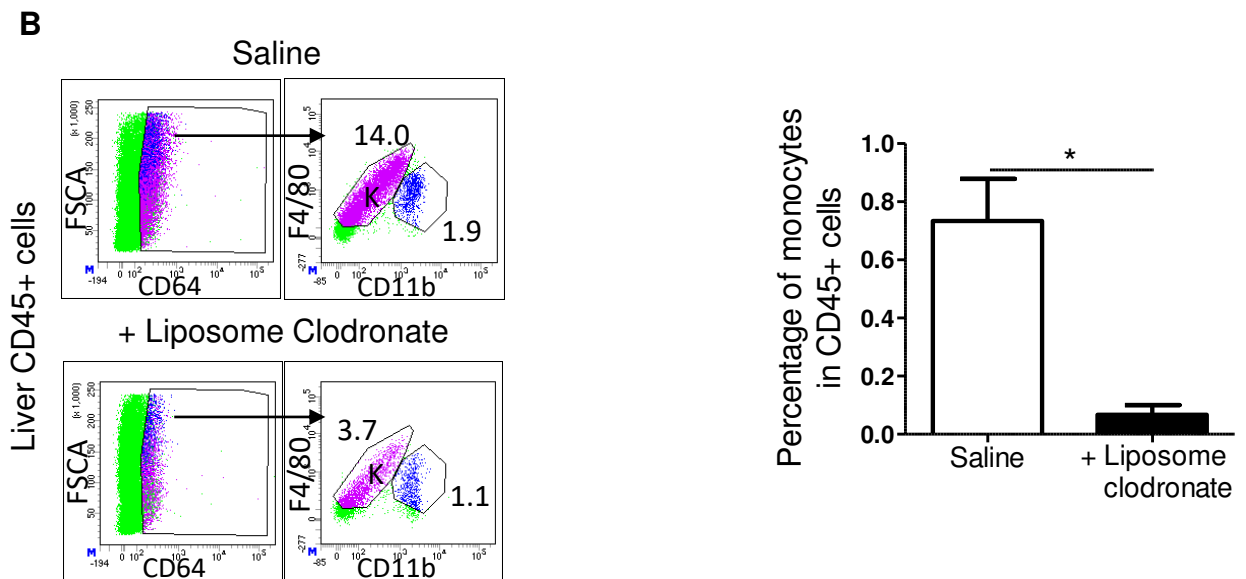
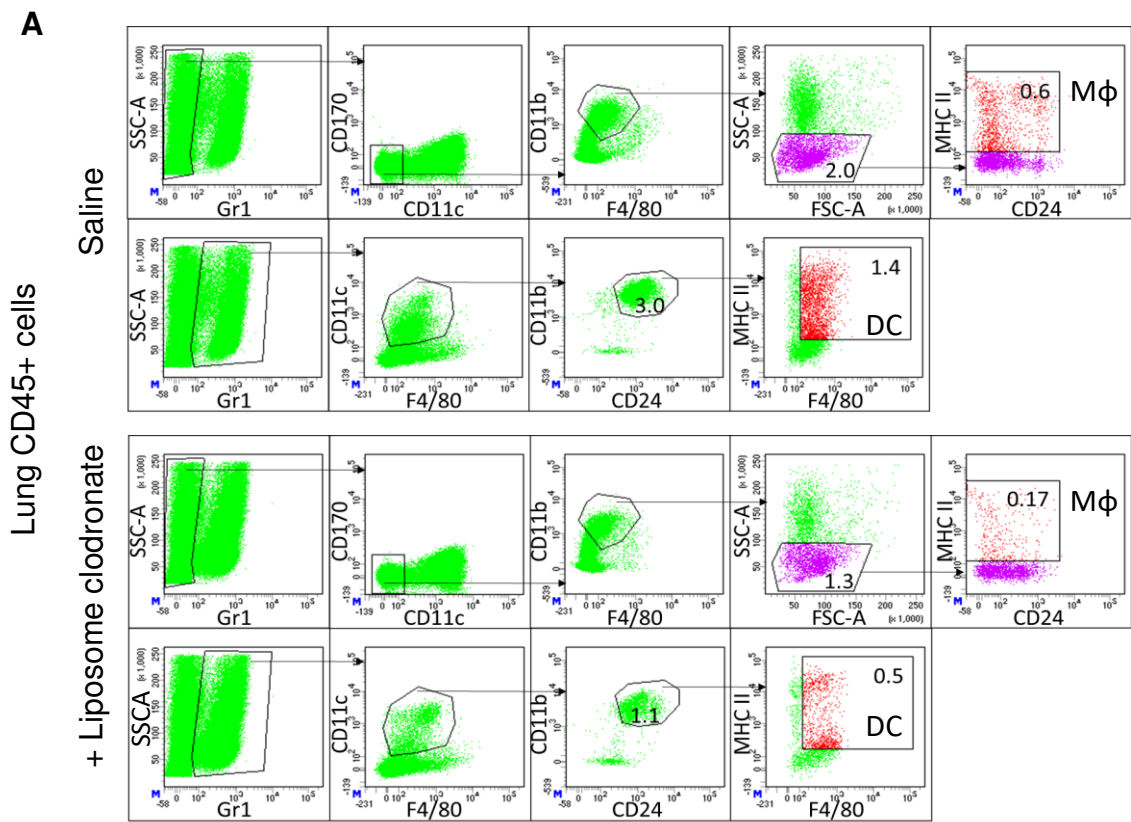
Supplementary Figure 1-1. Interstitial edema was not observed in the proximity of post capillary venules

TRALI was induced by injection of 34-1-2S and 10 min later, the lungs were recovered, fixed and processed for histology. Two representative views of sections are shown. Periarteriolar interstitial edema (*) and post-capillary venules/veins (arrow heads).



Supplementary Figure 1-2. Flow cytometric confirmation of specific cell depletion

Leukocyte counts in peripheral blood and the percentages of CD45⁺ CD11b⁺ CD115⁻ neutrophils and of CD45⁺ Ly6C^{bright} inflammatory monocytes among CD45⁺ leukocytes were determined as described in the method section. **(A)** Analysis of neutrophil depletion after 1A8 treatment (5 mg/kg, i.v.) and before anti-MHC I mAb injection. The histogram represents the absolute counts of peripheral neutrophils, mean \pm SEM (n=5 for rlgG2ak and n=8 for +1A8, ** p<0.01). **(B)** Analysis of inflammatory monocyte depletion after MC-21 treatment (0.4 mg/kg, i.p.) and before anti-MHC I mAb injection. The histogram represents the absolute counts of inflammatory monocytes, mean \pm SEM (n=9, * p<0.05).



Supplemental Figure 1-3. Effects of *in vivo* clodronate liposome treatment on lung and liver cells

Representative plots of flow cytometric analysis of lung and liver macrophages and/or dendritic cells 6 h after the administration of clodronate liposomes (2 mL/kg, i.v.) or saline. **(A)** Interstitial macrophages (Mφ) are defined as Gr-1⁻ CD11b⁺ CD24⁻ CD170⁻ CD11c⁻ MHC II⁺ F4/80⁺ cells and dendritic cells (DC) as Gr-1⁺ CD11b⁺ CD24⁺ CD11c⁺ MHC II⁺ F4/80⁺ cells. **(B) Left panel:** CD64⁺ liver macrophages are divided into CD11b^{dim} clodronate-sensitive Kupffer cells (K) and clodronate insensitive CD11b⁺⁺ subpopulations. Numbers refer to the percentages of cells among viable CD45⁺ cells in each organ, mean ± SEM (n=4). **Right panel:** Percentage of monocytes (CD11b⁺ CD115⁺) among viable CD45⁺ cells in saline and clodronate liposomes-treated mice, mean ± SEM (n=3, * p<0.05).

II) DISCUSSION

Le TRALI est un syndrome de détresse respiratoire aiguë pouvant survenir suite à une transfusion sanguine. Le seul traitement disponible se limite à une prise en charge respiratoire, une fois la détresse installée, et ceci, en mettant le patient sous oxygénation ou ventilation mécanique pour les cas les plus graves (Vlaar and Juffermans 2013). Les résultats de notre article montrent que le NF449 diminue la sévérité du TRALI, pointant un rôle important du récepteur P2X₁ dans cette pathologie. Alors que l'effet inhibiteur maximal de NF449 est obtenu en l'injectant avant les deux étapes de sensibilisation et d'induction du TRALI, l'administration seulement avant l'étape d'induction permet aussi une meilleure survie des souris.

Nos observations suggèrent donc que le P2RX₁ régule des mécanismes différents à chaque étape en agissant sur différents types cellulaires. En effet, les cellules sensibles à l'injection du LPS (neutrophiles, monocytes, macrophages) et exprimant le P2RX₁ (Lecut et al. 2009, Lopez-Lopez et al. 2016), sont des cibles probables du NF449 dans la première étape. Le rôle du P2RX₁ sur ces cellules, pendant la phase de sensibilisation, reste à déterminer.

Durant la deuxième étape, toute cellule exprimant le P2RX₁, et participant à l'homéostasie vasculaire, est susceptible d'être impliquée dans l'effet protecteur du NF449. Nous n'avons pas évalué le rôle des cellules endothéliales et des plaquettes car les premières n'expriment pas le P2RX₁ (Burnstock and Ralevic 2014) et les secondes ne jouent pas de rôle dans le TRALI (voir partie 2, (Hechler et al. 2016)). À l'aide de déplétions cellulaires spécifiques, nous montrons que les neutrophiles ne sont pas nécessaires pour le développement du TRALI, alors que les monocytes non-inflammatoires et/ou les macrophages le sont. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'activation de sous populations macrophagiques pulmonaires participent à la rupture de l'intégrité de la barrière endothéliale conduisant à l'œdème. Néanmoins, les macrophages hépatiques et spléniques étant aussi éliminés suite à notre traitement, nous ne pouvons exclure leurs rôles potentiels dans la protection observée, comme c'est le cas dans d'autres modèles de lésions pulmonaires (Savas et al. 2003).

D'une façon marquante, suite à l'injection de l'anti-CMH I, nous n'observons des œdèmes interstitiels qu'au niveau des vaisseaux péri-artériolaires et non au niveau des vaisseaux veineux post-alvéolaires. De plus, la taille de ces œdèmes est fortement diminuée suite à l'injection de NF449, ce qui laisse penser que les cellules musculaires lisses, qui expriment le P2RX₁ (Ralevic 2012), peuvent également participer à la protection. En effet, la stimulation de ces dernières provoque une vasoconstriction dépendante du P2RX₁, en partie responsable de la formation de l'œdème lors d'une hypertension pulmonaire (Visovatti et al. 2016). Pour cette raison, nous avons ciblé le canal TRPC6, un autre canal calcique exprimé par les cellules musculaires lisses, et dont la stimulation contrôle aussi la vasoconstriction, l'hypertension

pulmonaire et la formation d'œdèmes pulmonaires associés (Malczyk et al. 2017). L'inhibition de ce récepteur permet la réduction des œdèmes interstitiels et alvéolaires dans les souris ayant reçu l'anti-CMH I. Le TRPC6 est aussi exprimé par les cellules endothéliales et participe à leur perméabilité en réponse à des stimuli (Samapati et al. 2012) ; par conséquent, nous ne pouvons pas exclure la contribution du TRPC6 de ces cellules dans la protection du TRALI, en plus des cellules musculaires lisses.

En conclusion, notre travail montre un rôle des monocytes/macrophages et des cellules musculaires lisses, médié par les récepteurs P2X₁ et TRPC6, dans la pathologie du TRALI. Ces travaux soulèvent donc la question de l'existence de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements pharmacologiques dans la prise en charge du TRALI.

D'autre part, le récepteur TRPV4 est aussi impliqué dans la formation des œdèmes dans des modèles de lésions pulmonaires par ventilation mécanique ou aspiration d'acide (Hamanaka et al. 2007, Hamanaka et al. 2010, Thorneloe et al. 2012, Balakrishna et al. 2014). Cependant, nous observons que l'injection du GSK2193874, un inhibiteur de ce canal calcique, s'avère inefficace dans la protection contre la formation de l'œdème pulmonaire dans le cadre du TRALI (Figure I). Cette différence peut s'expliquer par le fait que dans les autres modèles de lésions, l'épithélium pulmonaire est atteint en premier, alors que durant le TRALI, c'est plutôt l'endothélium qui est perturbé en premier lieu. En effet, le rôle du TRPV4 est montré dans la formation des lésions pulmonaires avec des dommages directs de la barrière épithéliale alvéolaire, et non pas au niveau de la barrière endothéliale des vaisseaux extra-alvéolaires. Les jonctions interendothéliales ne semblent pas être affectées par l'activation du TRPV4 (Alvarez et al. 2006), mais plutôt des perturbations au niveau de la morphologie cellulaire (détachement de la membrane basale, gonflement, vacuolisation et formation de microparticules) sont observées en microscopie électronique sur des coupes de poumons de rat et de souris, isolés et traités avec du 4 α -phorbol-12,13 didecanoate-20 pour activer le TRPV4 (Villalta and Townsley 2013). Un des mécanismes proposé est l'activation des métalloprotéinases qui dégradent la membrane basale perturbant ainsi l'attachement à la matrice ou l'initiation de l'apoptose. Cette explication vient de l'observation d'une augmentation de l'expression de la forme active des métalloprotéinases 1 et 9 dans le lysat de poumons de souris traitées par un agoniste du TRPV4 (GSK-1016790A), accompagnée de l'augmentation des protéines dans le liquide bronchoalvéolaire (Villalta et al. 2014).

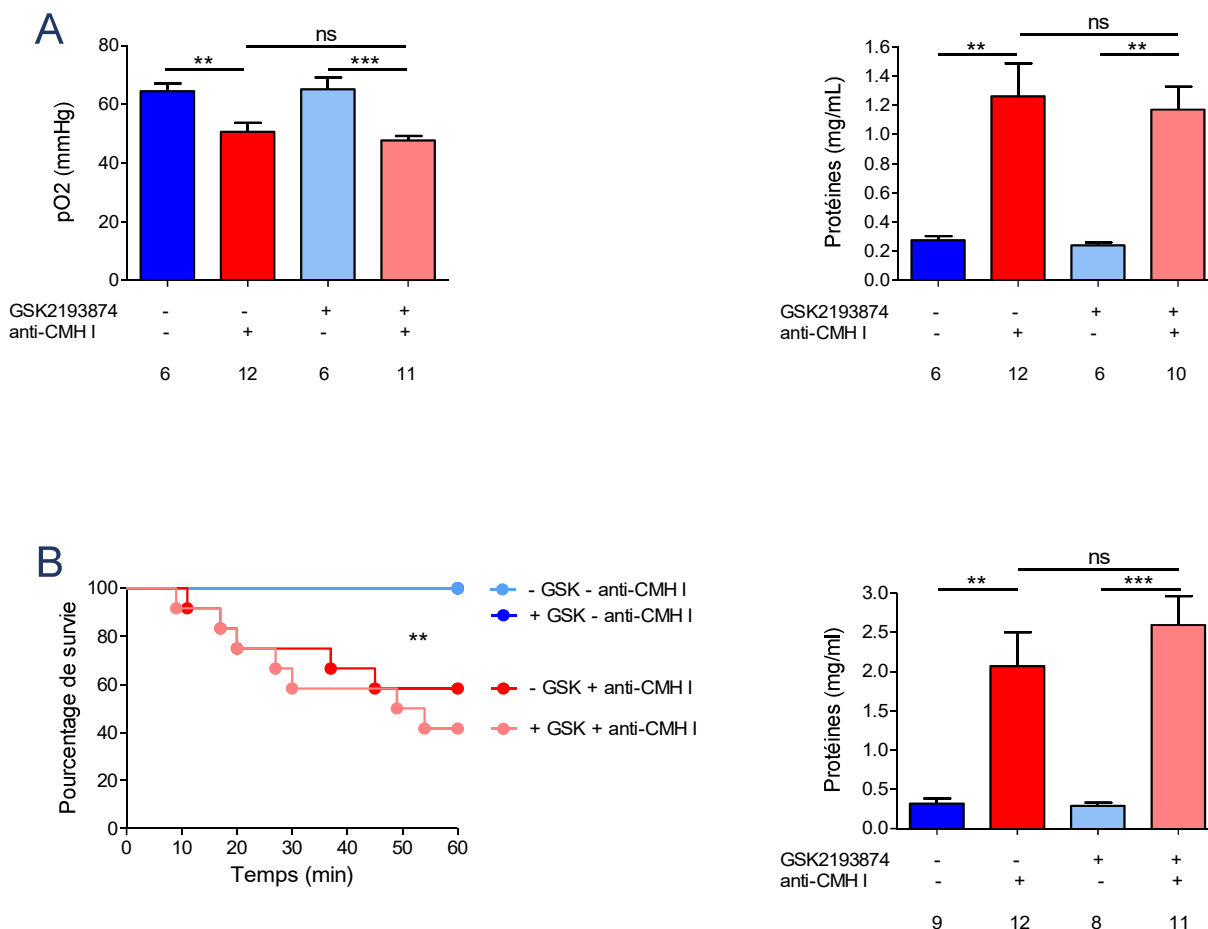


Figure I : Le GSK2193874 (inhibiteur de TRPV4) ne protège pas du TRALI

Effet de l'administration du GSK2193874 à 1 mg/kg (1% DMSO), en i.v., 5 min avant l'injection de LPS (0.1 mg/kg, ip) et 5 min avant l'anti-CMH I (0.5 mg/kg, i.v.), sur la sévérité de l'œdème pulmonaire. **(A)** Évaluation des paramètres à 10 min après injection de l'anticorps anti-CMH I. À gauche, la pression partielle en oxygène (pO₂) dans le sang aortique. Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM (n=6-12, ns, p>0,05). À droite, la concentration des protéines dans les liquides bronchoalvéolaires. Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM (n=6-12, ns, p>0,05). **(B)** Évaluation des paramètres à 1 h après injection de l'anticorps anti-CMH I. À gauche, le pourcentage de survie des souris à 1 h. À droite, la concentration des protéines dans les liquides bronchoalvéolaires. Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM (n=8-12, ns, p>0,05).

Par ailleurs, le récepteur TRPV4 n'est pas exprimé par les cellules musculaires lisses des vaisseaux extra-alvéolaires chez la souris. Compte tenu de nos observations concernant d'une part, l'implication des cellules musculaires lisses et, d'autre part, la formation d'un œdème interstitiel péri-artériolaire (et donc extra-alvéolaire) dans le TRALI, nous pouvons imaginer que le TRPV4 ne joue pas de rôle dans notre modèle parce qu'il n'est pas exprimé par les cellules musculaires lisses pouvant être impliquées dans le mécanisme du TRALI. À noter que la dose que nous avons utilisée (1 mg/kg) a fait ses preuves dans un modèle d'œdème pulmonaire dû à l'augmentation de la pression veineuse pulmonaire suite à une défaillance cardiaque (Thorneloe et al. 2012), pointant, une fois de plus, sur l'hétérogénéité des réponses cellulaires en fonction de la cause de l'œdème.

Une intervention décalée temporellement des canaux TRPC6 et TRPV4 pourrait aussi expliquer la disparité dans l'efficacité de leurs inhibiteurs sur la séquence des processus cellulaires dans le TRALI. En effet, le TRPC6 étant un canal de type receptor-operated channel contrôlé par l'activation de récepteurs couplés à une protéine G, il peut intervenir au début de la formation de l'œdème interstitiel et ainsi son inhibition permet de réduire l'ampleur de cet œdème. Par contre, le TRPV4 est un mécanorécepteur qui sera probablement activé plus tardivement, contrôlant des processus lents (activation des métalloprotéinases) et donc son inhibition n'aurait plus d'impact majeur sur la suite des événements, une fois l'œdème alvéolaire installé.

Globalement, nos résultats proposent un nouvel axe thérapeutique à cibler au cours du TRALI en agissant sur des canaux cationiques tels les récepteurs P2X₁ et TRPC6 mais non le TRPV4.

Partie 2 : Étude de l'implication des plaquettes dans la survenue de l'œdème pulmonaire dans un modèle expérimental de TRALI immunologique

I) INTRODUCTION

1) Les plaquettes : de l'hémostase à l'immunité et l'inflammation

1.1. Fonctions hémostatiques

Le principal rôle physiologique des plaquettes est d'assurer l'hémostase primaire, c'est-à-dire la prévention des hémorragies spontanées et l'arrêt du saignement en cas de brèche vasculaire. Brièvement, suite à une lésion de l'endothélium vasculaire, les plaquettes circulantes adhèrent aux protéines de la matrice extracellulaire du sous-endothélium, exposées à la circulation, principalement le facteur von Willebrand et le collagène. Cette adhésion initie une cascade de signalisation déclenchant l'activation des plaquettes qui changent de forme et s'étalent. Les plaquettes activées sécrètent le contenu de leurs granules, libérant ainsi des agonistes pro-activateurs des récepteurs plaquettaires, ce qui amplifie l'activation et le recrutement des plaquettes circulantes conduisant à l'agrégation des plaquettes entre elles, et l'expression d'une activité procoagulante liée à l'exposition de phospholipides anioniques (phosphatidylsérine). Le clou plaquettaire ainsi formé, permet de stopper l'hémorragie, et est consolidé par la coagulation qui est activée parallèlement. En effet, l'exposition du sous-endothélium, suite à la lésion de la paroi vasculaire, est une source de facteur tissulaire nécessaire pour l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation, qui sera renforcée par l'exposition de la phosphatidylsérine plaquettaire, permettant l'activation de la prothrombine, et ainsi la génération de la thrombine suite à une cascade de réactions enzymatiques. La thrombine formée permet de stabiliser le clou hémostatique suite au clivage du fibrinogène plasmatique en fibrine qui forme un réseau insoluble, elle est aussi un puissant activateur des plaquettes (Hou et al. 2015).

1.2. Fonctions homéostatiques

En plus de leur activité hémostatique, les plaquettes jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale pulmonaire (Weyrich and Zimmerman 2013). Ce rôle de maintien est documenté dans un modèle expérimental montrant que l'induction d'une thrombopénie chez des chèvres résulte en une fuite excessive de

l'albumine, mesurée par une augmentation de clairance lymphatique dans les poumons, reflétant une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire. La restauration du phénotype normal, après transfusion de plasma riche en plaquettes, confirme ce lien entre la thrombopénie et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Lo et al. 1988).

Les plaquettes participent au maintien de la barrière endothéliale par au moins quatre mécanismes: i) la sécrétion des molécules solubles qui améliorent la fonction de l'endothélium, ii) l'obstruction des brèches dans la barrière endothéliale, iii) le maintien de l'ultrastructure des cellules endothéliales, et iv) la stimulation de la croissance des cellules endothéliales (Ho-Tin-Noe et al. 2011). En effet, dans un état physiologique, les plaquettes maintiennent l'intégrité moléculaire des jonctions serrées des cellules endothéliales par la sécrétion d'une panoplie de facteurs de croissance et de cytokines pro-angiogéniques appelés 'trophogènes', et qui comprennent en autres, les facteurs BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) et PAF (Platelet Activation Factor), la sphingosine-1-phosphate, et l'angiopoiétine. Ces trophogènes se lient à leurs récepteurs respectifs exprimés par les cellules endothéliales, induisant ainsi la production endogène du VEGF et activant une boucle autocrine *via* la phosphorylation du récepteur VEGF-R2, nécessaire à la stabilité des jonctions endothéliales serrées. En dessous d'une certaine concentration de plaquettes, ces effets sont altérés, ce qui déstabilise le complexe cadhérine et fragilise l'intégrité de la barrière endothéliale (Nachman and Rafii 2008).

1.3. Fonctions immunologiques

En plus de jouer un rôle central dans l'hémostase, les plaquettes participent aux réponses immunitaires et inflammatoires (Thomas and Storey 2015).

Elles permettent le recrutement des leucocytes aux sites de lésions vasculaires suite aux contacts physiques et par des médiateurs qu'elles sécrètent. En effet, les plaquettes expriment plusieurs récepteurs et molécules d'adhésion qui permettent des interactions avec les cellules et leur activation. Par exemple, les plaquettes expriment la P-sélectine qui se lie à son ligand, le PSGL-1, exprimé par les leucocytes et les cellules endothéliales, favorisant ainsi le roulement et l'arrêt des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire (Pitchford et al. 2017). De plus, cette interaction active des voies de signalisations intracellulaires dans les neutrophiles, aboutissant au changement de conformation des intégrines, supportant ainsi leur adhésion ferme aux

cellules endothéliales. Les plaquettes expriment aussi (i) la molécule d'adhésion ICAM-2 qui lie l'intégrine LFA-1 (Leukocyte Function Antigen-1 ; CD11a/CD18) des neutrophiles, (ii) la GPIb qui lie l'intégrine Mac-1 (Macrophage antigen-1 ; CD11b/CD18), et (iii) le CD40L qui interagit avec le CD40, exprimé par les cellules endothéliales et les leucocytes (Pitchford et al. 2017). Cette dernière interaction permet d'activer plusieurs mécanismes en fonction de la cible cellulaire, le CD40L plaquettaire interagit avec : (i) le CD40 endothélial induisant une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, et la production du CCL2 (ou MCP-1) qui recrute les leucocytes au site de l'inflammation, (ii) le CD40 des neutrophiles, favorisant ainsi leur adhésion à l'endothélium, la libération des NETs et des espèces réactives de l'oxygène, (iii) le CD40 des lymphocytes B et T favorisant leur différenciation et leur maturation, (iv) le CD40 des monocytes et cellules dendritiques augmentant la présentation d'antigène aux lymphocytes suite à leur activation (Semple et al. 2011).

Les plaquettes participent aux défenses antibactériennes : elles expriment des récepteurs Toll-like, dont le TLR4 activé par les LPS solubles libérés par les bactéries à Gram négatif, et peuvent se lier aux pathogènes via certains de leurs récepteurs de surface (GPIb et GPIIb/IIIa) (Deppermann and Kubes 2016). Par conséquent, les plaquettes s'activent et participent à l'élimination des bactéries, en s'agrégeant autour de ces dernières participant à leur élimination par les cellules phagocytaires, en les tuant directement par la libération de protéines antibactériennes stockées dans leurs granules α (thrombocidines, PF4, RANTES), ou en activant les neutrophiles qui libèrent les NETs participant à la défense antibactérienne (Semple et al. 2011).

En outre, les plaquettes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires agissant sur le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. Par exemple : le facteur plaquettaire 4 (PF4, ou CXCL4) induit la libération des cytokines par les leucocytes, leur chimiotactisme, la phagocytose, la production des espèces réactives de l'oxygène, et retarde leur apoptose. Le CCL5 (ou RANTES) favorise le chimiotactisme et le recrutement des monocytes/macrophages et des lymphocytes à l'endothélium lésé. Le MIP1- α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α) augmente la production des médiateurs pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages et facilite leur migration (Thomas and Storey 2015).

Les plaquettes libèrent aussi des microparticules dans la circulation. Celles-ci expriment une variété de leurs récepteurs membranaires, et interagissent donc avec les cellules endothéliales et les leucocytes pour promouvoir l'activation cellulaire et l'inflammation. Ces microparticules jouent d'ailleurs le rôle de messagers entre les

plaquettes et les cellules, étant donné qu'elles renferment aussi des cytokines d'origine plaquettaire permettant la communication intercellulaire, comme par exemple livrer le RANTES à la surface de l'endothélium, stimulant ainsi le recrutement des monocytes (Thomas and Storey 2015).

Il existe aussi un lien bidirectionnel entre l'inflammation et la coagulation : une inflammation vasculaire non contrôlée active la coagulation qui, à son tour, régule positivement le processus inflammatoire (Levi et al. 2004). Ce lien dépend surtout de la génération de thrombine qui, en plus d'activer les plaquettes qui exercent les différentes fonctions pro-inflammatoires décrites ci-dessus (début du paragraphe 1-c), active les cellules endothéliales et les leucocytes. En effet, la thrombine stimule l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, P- et E-sélectines) et la production de médiateurs pro-inflammatoires (PAF, IL-6, IL-8) par les cellules endothéliales, favorisant le recrutement et la migration des leucocytes qui altèrent davantage la perméabilité endothéliale. De plus, cette stimulation active la production de MCP-1 par les monocytes, permettant davantage le recrutement de ces derniers au site de l'inflammation et leur passage trans-endothélial (Popovic et al. 2012).

Les modèles expérimentaux *in vivo* montrent que ces fonctions protectrices peuvent être déviées vers des processus délétères aggravant les réponses inflammatoires et les dommages tissulaires associés, et ceci dans plusieurs pathologies immunitaires telles l'arthrite, l'athérosclérose, le sepsis, les infections microbiennes, les lésions pulmonaires aiguës, le rejet des greffes et l'hépatite (Smyth et al. 2009).

La contribution des plaquettes aux réponses inflammatoires dépend donc à la fois des interactions qu'elles établissent via leurs récepteurs membranaires, et de la sécrétion des molécules inflammatoires contenues dans leurs granules alpha et denses. Les tableaux II-1 et II-2 regroupent respectivement les principaux récepteurs et médiateurs plaquettaires impliqués dans les réponses immunitaires (Middleton et al. 2016) (Semple et al. 2011).

Tableau II-1 : liste non exhaustive des récepteurs plaquettaires associés à une fonction immunitaire (modifié de (Middleton et al. 2016))

Molécules d'adhésion ou récepteurs membranaires	Activités inflammatoires correspondantes
P-sélectine	Interactions et activation des cellules immunitaires : neutrophiles, monocytes et lymphocytes, et des cellules endothéliales
CD40L ou CD154	Co-stimulation des cellules immunitaires : lymphocytes T et B, monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, et des cellules endothéliales
Glycoprotéine (GP) Iba (sous-unité du complexe GPIb-IX-V)	Formation des agrégats plaquettes-leucocytes, reconnaissance des pathogènes, régulation de l'inflammation systémique
GPIIb/IIIa (intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$)	Liaison aux pathogènes
GPVI	Libération de microparticules pro-inflammatoires, effet sur l'intégrité vasculaire en condition inflammatoire
Récepteurs de la thrombine (PAR 1 et 4)	Formation des agrégats plaquettes-leucocytes, dégranulation des plaquettes et libération des chimiokines et des peptides antimicrobiens
Récepteurs Toll-like (TLR 1-7 et 9)	Détection des pathogènes et activation des cellules immunitaires : neutrophiles, monocytes/ macrophages et cellules dendritiques

PAR, Protease-Activated Receptor ; TLR, Toll-Like Receptor

Tableau II-2 : liste non exhaustive des molécules plaquettaires associées à une fonction immunitaire (modifié de (Semple et al. 2011))

Molécules sécrétées	Cellules immunitaires cibles
Histamine	Monocytes, neutrophiles, lymphocytes T et B, éosinophiles, cellules NK et cellules endothéliales
Sérotonine	Monocytes, macrophages, cellules dendritiques et plaquettes
Thromboxane A2	Lymphocytes T, macrophages, plaquettes
Facteur activateur des plaquettes (PAF)	Neutrophiles, monocytes, macrophages, plaquettes et des sous-populations de lymphocytes
CXCL1 (GRO- α)	Neutrophiles
CXCL4 (Facteur plaquettaire 4, PF4)	Neutrophiles, monocytes et macrophages
CXCL5 (ENA-78)	Neutrophiles
CCL3 (MIP-1 α)	Monocytes, éosinophiles, basophiles, cellules NK et cellules dendritiques
CCL5 (RANTES)	Monocytes, éosinophiles, basophiles, cellules NK, lymphocytes T, cellules dendritiques et plaquettes
CCL7 (MCP-3)	Monocytes, basophiles, cellules NK et cellules dendritiques
CD40L (clivé après activation)	Monocytes, macrophages, lymphocytes T et B, cellules dendritiques et cellules endothéliales
Beta-défensine 1	Neutrophiles (formation des NETs)

CXCL, CXC-chemokine Ligand ; CCL, CC-chemokine Ligand

1.4. Fonctions homéostatiques en conditions inflammatoires

Les fonctions homéostatiques vasculaires des plaquettes sont essentielles dans les conditions inflammatoires, en empêchant les hémorragies que causerait l'extravasation des neutrophiles vers les tissus enflammés. En effet, des hémorragies intra-alvéolaires sont observées après administration intranasale de LPS chez des souris présentant une thrombocytopenie sévère (< à 2.5 % du nombre basal de plaquettes), alors que des animaux thrombocytopeniques n'ayant pas reçu de LPS, et donc ne présentant pas d'inflammation, ne saignent pas spontanément (Goerge et al. 2008). De plus, dans un modèle de réaction d'Arthus inversée, les plaquettes facilitent le recrutement des neutrophiles vers le site de l'inflammation et stimulent leur activité oxydative, participant ainsi à l'aggravation des dommages. Des saignements sont observés dans les souris thrombopéniques, pointant un rôle protecteur des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire durant cette inflammation expérimentale sévère. L'utilisation de souris déficientes pour la GPVI, ou d'inhibiteurs des molécules en aval dans sa voie de signalisation (Syk et Btk), révèle que cette glycoprotéine est responsable de la protection des saignements inflammatoires (Gros et al. 2015).

Le rôle des plaquettes est d'autant plus complexe que la contribution des glycoprotéines plaquettaires à l'arrêt des saignements liés à l'inflammation, varie selon le contexte inflammatoire et l'organe (Raves et al. 2018). Ainsi, la GPVI plaquettaire participe au maintien de l'intégrité vasculaire au niveau de la peau enflammée suite à la réaction d'Arthus inversée, mais son rôle est controversé dans l'inflammation pulmonaire par administration intranasale de LPS, tandis que la GPIIb/IIIa évite les saignements dans les modèles d'ischémie/reperfusion dans le cerveau (Deppermann 2018).

Les plaquettes font ainsi le lien entre l'hémostase et l'inflammation, en recrutant les leucocytes et en renforçant la barrière endothéliale en condition inflammatoire, ce qui a permis d'introduire de nouveaux termes pour décrire ces processus telles « l'immunothrombose » (Engelmann and Massberg 2013) et « l'hémostase associée à l'inflammation » (Ho-Tin-Noe et al. 2018).

De plus, les plaquettes sécrètent des molécules anti-inflammatoires. Par exemple, la prostaglandine E₂, libérée par les plaquettes activées, régule positivement la production *in vitro* de l'IL-10 (rôle anti-inflammatoire) par les monocytes/macrophages, et négativement celle du TNF- α (rôle pro-inflammatoire) (Linke et al. 2017). Le facteur de croissance plaquettaire (PDGF pour Platelet-Derived Growth Factor) joue un rôle

important dans la cicatrisation et la réparation tissulaire (Mazzucco et al. 2010), ainsi que le TGF- β (Transforming Growth Factor β), un régulateur négatif de l'inflammation.

Les plaquettes se distinguent donc par une dualité de fonctions au cours de l'inflammation (Ho-Tin-Noé 2018), rendant l'interprétation des résultats plus délicate, en fonction du contexte immunitaire/inflammatoire dans lequel leur contribution est évaluée.

2) Les plaquettes dans l'intégrité vasculaire pulmonaire

L'augmentation de la perméabilité capillaire est la caractéristique des syndromes de détresse respiratoire aiguë (SDRA), et l'inflammation est une composante importante de leur pathogenèse (Pierrakos et al. 2012). De ce fait, il est évident de s'interroger sur le rôle des plaquettes dans ces syndromes.

Dans la circulation pulmonaire, les plaquettes participent aussi au recrutement des leucocytes aux sites de l'inflammation, tandis que l'impact de ce rôle sur la physiologie tissulaire peut être favorable ou défavorable en fonction des conditions physiopathologiques. Les travaux expérimentaux qui évaluent la contribution des plaquettes dans les SDRA aboutissent à des conclusions parfois opposées selon les causes du syndrome. Ainsi, le recrutement des cellules immunitaires a un effet bénéfique dans la lutte contre les infections bactériennes, mais une situation de déséquilibre dans la réponse peut entraîner une bascule vers une aggravation des dommages tissulaires.

Dans des modèles murins de SDRA causés par les bactéries *Klebsiella pneumoniae* ou *Streptococcus pneumoniae*, la déplétion des plaquettes avant l'infection entraîne une augmentation du titre bactérien dans les tissus (sang, les poumons, la rate et le foie), de la concentration de cytokines inflammatoires dans le plasma (TNF- α et IL-6), et de la mortalité (de Stoppelaar et al. 2014) (van den Boogaard et al. 2015) ; les plaquettes jouent donc un rôle bénéfique dans ces cas. Dans le premier modèle (*K. pneumoniae*), des hémorragies sont observées dans les poumons des souris thrombopéniques (de Stoppelaar et al. 2014), un argument en faveur du rôle crucial des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire pulmonaire durant l'inflammation.

Au cours d'un sepsis, les plaquettes favorisent le recrutement des neutrophiles dans les poumons (Asaduzzaman et al. 2009), et stimulent la formation des NETs qui participent à la défense antibactérienne (Clark et al. 2007). Néanmoins, un déséquilibre dans la production de ces NETs conduit à une défaillance multi-organe pouvant entraîner la mort (Xu et al. 2009).

Les plaquettes sont aussi impliquées dans l'augmentation de la perméabilité de la paroi alvéolaire capillaire durant des conditions d'inflammation pulmonaire aiguë dans le cas de SDRA (Bozza et al. 2009). Le mécanisme le mieux connu par lequel les plaquettes exercent cet effet délétère est leur capacité à recruter les cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes/macrophages) favorisant ainsi leur extravasation dans le tissu pulmonaire où la libération des facteurs inflammatoires va entraîner des dommages au niveau des cellules endothéliales (Ho-Tin-Noe et al. 2011). Par exemple, dans un modèle de lésions pulmonaires aiguës induit par aspiration d'acide, la déplétion des plaquettes (élimination de 85 % des plaquettes) protège contre la survenue des lésions suite à la diminution du recrutement des neutrophiles. La formation d'agrégats leucocytes-plaquettes intervient dans la formation de ces lésions puisque le blocage de la P-sélectine, inhibant leur formation, protège la barrière endothéliale (Zarbock et al. 2006).

Dans les modèles de SDRA provoqués par des virus, les résultats penchent vers un rôle délétère des plaquettes dans la pathogenèse. Chez la souris, l'infection avec le virus de la grippe (influenza-A) provoque une forte accumulation des agrégats plaquettaires et leucoplaquettaires dans le tissu interstitiel pulmonaire des souris infectées, ainsi qu'une augmentation de la concentration de la sérotonine dans le liquide bronchoalvéolaire, confirmant l'activation et la sécrétion des plaquettes. Cette infection est associée à une mortalité élevée (Le et al. 2015). Des expériences supplémentaires montrent l'importance de l'agrégation plaquettaire dans la pathologie par l'augmentation de la survie des souris infectées après inhibition du récepteur PAR4 (récepteur de la thrombine) ou de la glycoprotéine GPIIb/IIIa (récepteur pour le fibrinogène). Dans ces conditions d'inhibition de récepteurs plaquettaires, le recrutement des neutrophiles dans les poumons, la quantité de protéines et des cytokines inflammatoires (IL-6, MIP-2) dans le liquide bronchoalvéolaire, et le dépôt de fibrine dans l'espace alvéolaire sont réduits (Le et al. 2015).

Le rôle délétère des plaquettes est aussi retrouvé par une autre équipe qui montre que l'infection par le virus augmente l'adhésion des plaquettes sur les cellules endothéliales (*in vitro* et *in vivo*), et qu'un traitement antiplaquettaire (aspirine) améliore la survie des souris infectées (Sugiyama et al. 2016). L'activation et l'agrégation des plaquettes augmentent donc les dégâts tissulaires et diminuent le pronostic vital.

Des thrombocytopenies sont communément observées chez les patients souffrant d'un SDRA, et des études rétrospectives montrent qu'elles sont souvent associées à une mortalité plus importante (Hui et al. 2011) (Wang et al. 2014). Une étude clinique évaluant l'association entre le taux de plaquettes à l'admission aux soins intensifs et le pronostic vital chez les patients se présentant avec un sepsis, montre qu'un compte plaquettaire bas est associée à une mortalité élevée au cours des soins, 30 jours et 1 an après la sortie des patients (Claushuis et al. 2016).

En outre, les patients thrombocytopéniques présentent une activation endothéliale plus élevée (augmentation de la concentration plasmatique des molécules d'adhésion endothéliale soluble : E-sélectine, ICAM et fractalkine), et une perte plus importante de l'intégrité vasculaire (augmentation plus importante de l'angiopoétine-2 et une profonde diminution de l'angiopoétine-1) (Claushuis et al. 2016).

Cependant, les études prospectives et rétrospectives chez l'Homme révèlent des résultats opposés quant à l'effet des traitements antiplaquettaires sur les répercussions d'un SDRA. Alors que certaines études montrent que les patients sous traitement aspirine, admis aux unités de soins intensifs et présentant au moins un facteur de risque de développer un SDRA, ont moins de risque de développer ce syndrome ; d'autres ne retrouvent pas ce lien (Yadav and Kor 2015). Une étude clinique randomisée récente, incluant des patients admis aux unités de soins intensifs et présentant un risque de développer un SDRA (score de prédiction de lésion pulmonaire ≥ 4), montre que l'administration de l'aspirine comparée à celle d'un placebo pendant les soins, n'affecte ni l'incidence des SDRA chez ces patients, ni la mortalité suite à leur survenue (Kor et al. 2016).

Ces données montrent la complexité des mécanismes impliqués dans le développement de ces syndromes, avec la présence d'une balance du rôle plaquettaire dont l'équilibre est difficile à prédire ; entre un rôle bénéfique (maintien de l'intégrité vasculaire, lutte contre les bactéries, recrutement des cellules immunitaires aux sites de lésions) et un rôle délétère (exagération dans l'activation des cellules immunitaires, libérations de molécules pro-inflammatoires, formation de thrombi).

3) Les plaquettes dans le TRALI : une littérature contradictoire

En ce qui concerne le rôle des plaquettes dans le TRALI immunologique provoqué par l'anticorps anti-CMH I (34-1-2S), les observations peuvent être contradictoires et aboutir à des conclusions différentes selon les équipes. Pour certains, les plaquettes sont essentielles dans la formation de l'œdème pulmonaire (Looney et al. 2009) (Caudrillier et al. 2012) (Hidalgo et al. 2009) ; pour d'autres, leur absence n'a pas d'incidence sur le TRALI expérimental (Strait et al. 2011) (Thomas et al. 2012). Pour arriver à leurs conclusions, Looney et al. éliminent 90% des plaquettes en administrant un sérum de lapins immunisés avec des plaquettes de souris, puis montrent que, dans ces conditions, l'administration de l'anticorps anti-CMH I n'entraîne pas la formation d'un œdème pulmonaire. Dans ce modèle de TRALI à deux-événements, contrairement à ce qui est observé au cours d'un modèle de lésion pulmonaire aiguë provoquée par l'instillation intratrachéale d'acide (Zarbock et al. 2006), la survenue des lésions

ne dépend pas de la P-sélectine plaquettaire. Par ailleurs, ils montrent qu'un traitement antiplaquettaire préventif avec de l'aspirine protège les souris contre le TRALI (Looney et al. 2009) (Caudrillier et al. 2012). Néanmoins, ils utilisent une forte dose d'aspirine (100 mg/kg) dont l'effet va au-delà de l'action antiplaquettaire. En effet, l'aspirine exerce son effet en acétylant irréversiblement les cyclooxygénases (COX) 1 et 2, avec une affinité plus élevée pour la COX-1. Par conséquent, l'aspirine à de faible dose, exerce un effet anti-thrombotique en acétylant irréversiblement la COX-1 plaquettaire, empêchant ainsi la synthèse du thromboxane A2 (agoniste plaquettaire). Par contre, à de fortes doses, l'aspirine acétyle aussi la COX-2, jouant ainsi un rôle anti-inflammatoire indépendant des plaquettes. De ce fait, l'effet protecteur de l'aspirine s'expliquerait par la synthèse du 15-epi-lipoxine A4 via un mécanisme trans-cellulaire impliquant séquentiellement la COX-2 endothéliale acétylée, et la lipoxygénase-5 des neutrophiles (Ortiz-Munoz et al. 2014). Cette molécule bloque le recrutement des neutrophiles, inhibe la production des cytokines inflammatoires (IL-8 et TNF- α), et l'activation des cellules endothéliales, participant ainsi à la résolution de l'inflammation (Serhan 2005).

Ce rôle pathogénique des plaquettes est aussi décrit par une deuxième équipe avec un modèle de TRALI en une étape, où des souris reçoivent des anticorps antiplaquettaires de même origine que ceux de l'étude de Looney et al. ; en accord avec cette étude, les souris thrombopéniques ne développent pas d'œdème alvéolaire suite à l'injection du 34-1-2S, comme l'atteste l'absence d'augmentation de protéines dans le liquide bronchoalvéolaire, tandis que la P-sélectine plaquettaire n'est pas nécessaire pour le développement du TRALI (Hidalgo et al. 2009).

Inversement, Strait et al. n'aboutissent pas à la même conclusion. En utilisant le modèle à un évènement, ils confirment qu'une thrombopénie provoquée par l'administration d'un sérum de lapin antiplaquettaire protège bien du TRALI, s'il est injecté 4 heures avant le 34-1-2S, mais pas s'il est administré 24 et 48 heures avant. Ils proposent que la formation des complexes immuns plaquettes/anticorps, suite à l'injection du sérum, provoque la consommation du facteur C5 du complément, une molécule nécessaire pour le fonctionnement de leur modèle de TRALI immunologique (voir introduction générale, paragraphe X-7). La concentration plasmatique du C5 devient alors transitoirement insuffisante, et les souris ne développent pas de TRALI. Si l'injection du sérum antiplaquettaire est réalisée 48 heures avant, la concentration plasmatique en C5 se rééquilibre, et ainsi la susceptibilité des animaux au TRALI est restaurée (Strait et al. 2011). De fait, si une technique non-immune est utilisée pour éliminer les plaquettes, en injectant de la neuraminidase, le TRALI immunologique survient chez les animaux thrombopéniques tout comme chez les animaux témoins (Strait et al. 2011). Par ailleurs, et de façon plus surprenante, en utilisant une approche expérimentale du TRALI très

similaire à celle de Looney et al., une troisième équipe ne constate pas d'effet protecteur de l'élimination des plaquettes (néanmoins, les auteurs ne détaillent pas les observations expérimentales) (Thomas et al. 2012).

Finalement, une étude *post-hoc* de patients en soins intensifs montre que le traitement avec de l'aspirine avant leur admission n'a pas d'incidence sur le risque du TRALI (Tuinman et al. 2012).

Certaines de ces observations contradictoires peuvent s'expliquer par des différences entre les protocoles expérimentaux utilisés. Les divergences entre les études de Looney et al. et de Thomas et al., sont plus difficiles à expliquer, ce qui montre la nécessité de documenter encore l'implication des plaquettes au cours du TRALI.

L'article qui suit réévalue l'importance des plaquettes dans le TRALI immunologique en utilisant deux méthodes d'induction de thrombopénie, l'une immune et l'autre non-immune, ainsi que des approches pharmacologiques et l'utilisation de plaquettes déficientes pour des fonctions particulières afin de faire la part entre la contribution des plaquettes au niveau hémostatique et inflammatoire.

Article (2) publié : Les plaquettes ne sont pas nécessaires au développement du TRALI-anticorps dépendant chez la souris.

ORIGINAL ARTICLE

Platelets are dispensable for antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in the mouse

B. HECHLER,* † ‡ § B. MAÎTRE,* † ‡ § S. MAGNENAT,* † ‡ § V. HEIM,* † ‡ § M.-B. EL MDAWAR,* † ‡ § C. GACHET* † ‡ § and H. DE LA SALLE* † ‡ §

*UMR_S949, INSERM; †Etablissement Français du Sang-Alsace (EFS-Alsace); ‡Université de Strasbourg; and §Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France

To cite this article: Hechler B, Maître B, Magnenat S, Heim V, El Mdawar M-B, Gachet C, de la Salle H. Platelets are dispensable for antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in the mouse. *J Thromb Haemost* 2016; **14**: 1255–67.

Essentials

- Role of platelets in immunological transfusion-related acute lung injury (TRALI) is debated.
- Immunological TRALI was tested in mice exhibiting severe thrombocytopenia or platelet dysfunction.
- Platelets are required to prevent lung hemorrhage but not edema formation and respiratory distress.
- Platelets are dispensable for the initiation and development of TRALI.

Summary. *Background:* Transfusion-related acute lung injury (TRALI) is a serious transfusion-related complication. Previous conflicting studies have indicated that platelets are either crucial or dispensable for TRALI. *Objectives:* To evaluate the role of platelets in major histocompatibility complex (MHC) I-induced-TRALI. *Methods:* Antibody-mediated TRALI was experimentally induced in mice by lipopolysaccharide priming followed by the administration of an anti-MHC I mAb. *Results:* TRALI was tested in the context of severe thrombocytopenia provoked by the administration of diphtheria toxin (DT) in transgenic iDTR mice selectively expressing DT receptor in megakaryocytes. The pathologic responses occurring within the first 10 min following the injection of the anti-MHC I mAb, i.e. the severity of lung edema and the drop in aortic blood oxygenation, were similar in severely thrombocytopenic DT-iDTR and control mice. At later times, mortality was nevertheless increased in DT-iDTR mice, owing to lung hemorrhages.

Correspondence: Christian Gachet, UMR_S949 INSERM, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Alsace, 10 rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France.
Tel.: +33 3 88 21 25 25; fax: +33 3 88 21 25 21.
E-mail: christian.gachet@efs.sante.fr

Received 15 September 2015

Manuscript handled by Y. Ozaki.

Final decision: P. H. Reitsma, 18 March 2016.

When less severe thrombocytopenia was induced with an antiplatelet mAb, TRALI started and developed similarly as in control mice, but hemorrhages were absent. Furthermore, when platelet functions were defective because of administration of aspirin or clopidogrel, or because of glycoprotein (GP)IIb/IIIa deficiency, TRALI still developed but no lung hemorrhages were observed. In contrast, when GPVI was immunodepleted, TRALI still occurred, but was occasionally accompanied by hemorrhages. *Conclusions:* Platelets are dispensable for the initiation and development of MHC I-induced TRALI. Although they do not protect against the disruption of the vascular endothelial cell barrier and the subsequent plasma leakage and edema formation, platelets are essential to prevent more serious damage resulting in hemorrhages in alveoli.

Keywords: acute lung injury; blood platelets; blood transfusion; hemorrhage; pulmonary edema; thrombocytopenia.

Introduction

Transfusion-related acute lung injury (TRALI) is defined as a non-cardiogenic pulmonary edema occurring within the first 6 h after blood transfusion [1–3]. TRALI is thought to occur in individuals experiencing two insults, the first being their pathologic state (resulting from sterile or septic inflammation) and the second being the transfusion of blood products that are pathogenic because of the presence of allogeneic anti-human leukocyte antigen or anti-neutrophil antibodies, or proinflammatory lipids [4,5]. TRALI is termed antibody-mediated when it is provoked by allogeneic antibodies. Analyses of tissues from patients who died of TRALI revealed that granulocytes were sequestered in the lungs [6,7], whereas platelets accumulated in the lungs and other tissues [8], indicating that these two cell populations are passive or active agents of TRALI-associated reactions.

In attempts to elucidate the pathogenesis of TRALI, several animal models have been developed [5,9]. One of these is a two-insult model in BALB/c mice, consisting of an immune cell priming step with a low dose of lipopolysaccharide (LPS), which induces neutrophil sequestration in the lungs, followed 24 h later by intravenous administration of a mAb against major histocompatibility complex (MHC) I molecules, which leads to neutrophil activation [10]. It has been postulated that the lung damage observed during TRALI could be attributable to the formation of neutrophil extracellular traps [11,12] or to other mechanisms, such as the production of reactive oxygen species [13] and downstream effects.

The exact role of platelets in TRALI remains controversial [14]. On the one hand, platelets appear to be required, because their immune depletion with a rabbit polyclonal serum or their inhibition with a high dose of aspirin or with the glycoprotein (GP)IIb/IIIa inhibitor tirofiban prevented lung injury and mortality [10,11,15]. On the other hand, non-immunologic thrombocytopenia, induced by the administration of neuraminidase, did not prevent TRALI [12,13]. These divergent results could have arisen from differences in the experimental conditions. Overall, the importance of platelets in TRALI still requires clarification, which points to the need for alternative methods to assess their role in its pathogenesis.

In this study, we compared TRALI responses in mice: (i) made thrombocytopenic after injection of diphtheria toxin (DT) in animals selectively expressing its receptor in megakaryocytes, or after administration of an antiplatelet mAb; and (ii) showing altered platelet reactivity after treatment with aspirin or clopidogrel or immunodepletion of the major collagen signaling receptor GPVI, or because of integrin α_{IIb} deficiency. In each condition, the pathologic responses were evaluated in immediate and later events by: (i) measuring the lung edema by histochemistry; (ii) quantifying the protein content of bronchoalveolar fluids; (iii) assessing the respiratory insufficiency reflected by aortic blood oxygenation (oxygen partial pressure of arterial blood [P_{aO_2}]); and (iv) following the survival of the mice.

Materials and methods

Other reagents and methods are described in Data S1.

Mice

TRALI experiments were performed on 8–12-week-old male BALB/cByJ mice (Charles River, L'Arbresle, France) or PF4-cre/iDTR mice. These latter mice were generated by crossing mice carrying a Cre recombinase gene under the control of the platelet factor 4 (PF4) promoter (PF4-cre mice, C57BL/6 background, H-2^b MHC I haplotype) [16] with mice carrying a Cre recombinase-inducible DT receptor (DTR) expression cassette (iDTR

mice, BALB/cBy.B6-Gt[ROSA]26Sortm1[HBEGF]Awai/J background, H-2^d MHC I haplotype) [17]. PF4-cre/iDTR mice were on a BALB/cBy.B6 background (H-2^d × H-2^b MHC I haplotype). $\alpha_{IIb}^{-/-}$ mice (C57BL/6 background) were obtained through a material transfer agreement from T. Graf (Center for Genomic Regulation, Barcelona, Spain). All mice were housed in the animal facilities of the EFS-Alsace (agreement no. D67-482-10). Ethical approval for the animal experiments was received from the French Ministry of Research, in accordance with the guidelines of the European Union and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Experimental thrombocytopenia

The model of DT-induced platelet depletion in PF4-cre/iDTR mice has been recently described [18]. PF4-cre/iDTR mice were treated for 4 days with DT (100 ng day⁻¹, intraperitoneal) to induce megakaryocyte ablation and subsequent thrombocytopenia. Alternatively, thrombocytopenia was induced by intravenous administration of the anti-GPIIb/IIIa mAb (RAM.6, 2 mg kg⁻¹) [19].

Two-hit TRALI model

A two-hit mouse model of TRALI was chosen [10]. Briefly, male mice (aged 8–12 weeks) were primed with an intraperitoneal injection of LPS (0.1 mg kg⁻¹). After 24 h, the mice were anesthetized with xylazine (20 mg kg⁻¹ body weight) and ketamine (100 mg kg⁻¹ body weight), and challenged with a mouse anti-H-2K^d/H-2D^d mAb (clone 34-1-2s) or its mouse isotype control (mIgG2a κ), injected retro-orbitally. Preliminary experiments indicated that a higher dose of mAb 34-1-2s was required to induce TRALI in heterozygous F₁ PF4-cre/iDTR mice, which can probably be explained by their hemizygous H-2^d haplotype versus homozygous H-2^d haplotype of BALB/cByJ mice. Thus, homozygous BALB/cByJ mice received 0.5 mg kg⁻¹ mAb 34-1-2s, whereas heterozygous F₁ PF4-cre/iDTR mice received 0.8 mg kg⁻¹ mAb 34-1-2s. The mice were maintained at 37 °C, and the surviving mice were killed 2 h after injection of the anti-MHC I mAb. Alternatively, the mice were killed 10 min after administration of the mAb. A timeline figure depicting the TRALI protocol is given in Fig. S1.

Aspirin, clopidogrel and JAQ1 treatment

Aspirin (100 mg kg⁻¹ or 10 mg kg⁻¹) or vehicle (saline) was administered intraperitoneally 30 min prior to LPS priming, and again 2 h prior to challenge with the anti-MHC I mAb. Clopidogrel (50 mg kg⁻¹) or vehicle (5% arabic gum in water) was administered orally 16 h and 2 h prior to LPS priming, and again 16 h and 2 h prior to anti-MHC I challenge. The rat anti-GPVI mAb JAQ1 (2.5 mg kg⁻¹) or irrelevant rat IgG2a κ (rIgG2a κ) was

administered subcutaneously 3 days prior to LPS priming, to induce stable GPVI depletion for at least 6 days ([20] and data not shown).

Platelet transfusion

Wild-type (WT) and $\alpha_{IIb}^{-/-}$ male mice (aged 10–15 weeks) received two subcutaneous injections of romiplostim ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight) with a 3-day interval to increase the number of circulating platelets to approximately $5 \times 10^6 \text{ platelets } \mu\text{L}^{-1}$ [21]. Two days after the second injection, blood was drawn from the abdominal aorta of anesthetized mice into citrate (3.8%) anticoagulant. Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation at $1900 \times g$ for 1 min, and adjusted to $3.5 \times 10^6 \text{ platelets } \mu\text{L}^{-1}$ with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.38% citrate. Aliquots ($200 \mu\text{L}$) of this platelet suspension were immediately injected retro-orbitally into transiently anesthetized PF4-cre/iDTR mice made severely thrombocytopenic by injection of DT (100 ng day^{-1} , intraperitoneal) for 5 days. One hour later, the same recipient mice received a second injection with a freshly prepared WT or $\alpha_{IIb}^{-/-}$ platelet suspension ($3.5 \times 10^6 \text{ platelets } \mu\text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{L}$), leading to an increase in the circulating platelet count to $\sim 50\%$ of that in control PF4-cre/iDTR mice not treated with DT.

Protein content of bronchoalveolar lavage fluids (BALFs)

The tracheas of the killed mice were exposed and cannulated, and 1 mL of sterile PBS solution was injected into the lungs. The BALFs were centrifuged at $1600 \times g$ for 5 min. The protein concentration was quantified in the supernatant with the Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions, with bovine serum albumin as the standard.

Hemostatic parameters

Platelet and leukocyte counts were determined in whole blood, collected into EDTA (6 mM) by severing the tail of an anesthetized mouse, with a Scil Vet ABC automatic cell counter (Scil Animal Care Company, Holtzheim, France) set to murine parameters. P_{aO_2} was measured in blood drawn into a plastic syringe containing heparin (50 U mL^{-1}) anticoagulant from the abdominal aortas of mice anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg kg^{-1}) and xylazine (20 mg kg^{-1}), by use of a Critical Care Analyzer (OMNIS S; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with GRAPHPAD PRISM 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Survival

studies were analyzed with the log-rank test (Figs 2C, 4D, 5A,C,E, 6A, and 7A). All other values are reported as the mean \pm standard deviation, and statistical comparisons were calculated with Student's *t*-test (Fig. 6B) or two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test (Figs 2D, 3B, 4C,E, 5B,D,F, 6D, and 7B). A *P*-value of < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

A DT-based inducible method to selectively deplete platelets in mice

To investigate the role of platelets in TRALI, we first induced thrombocytopenia by using a method different from those previously employed. Mice carrying a Cre recombinase gene under the control of the PF4 promoter (PF4-cre mice, C57BL/6 background, H-2^b MHC I

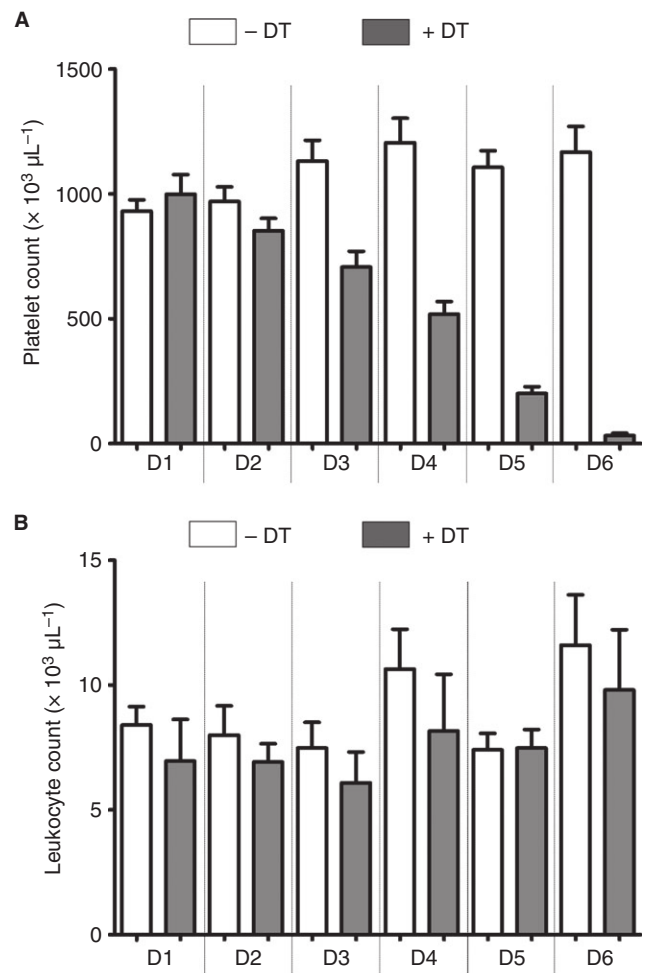


Fig. 1. Effect of diphtheria toxin (DT) treatment on circulating platelet and leukocyte counts in PF4-cre/iDTR mice. Circulating platelet (A) and leukocyte (B) counts in PF4-cre/iDTR mice receiving DT (100 ng day^{-1} , intraperitoneal) or saline for 5 days are shown. Results are presented as the mean \pm standard deviation ($n = 5$).

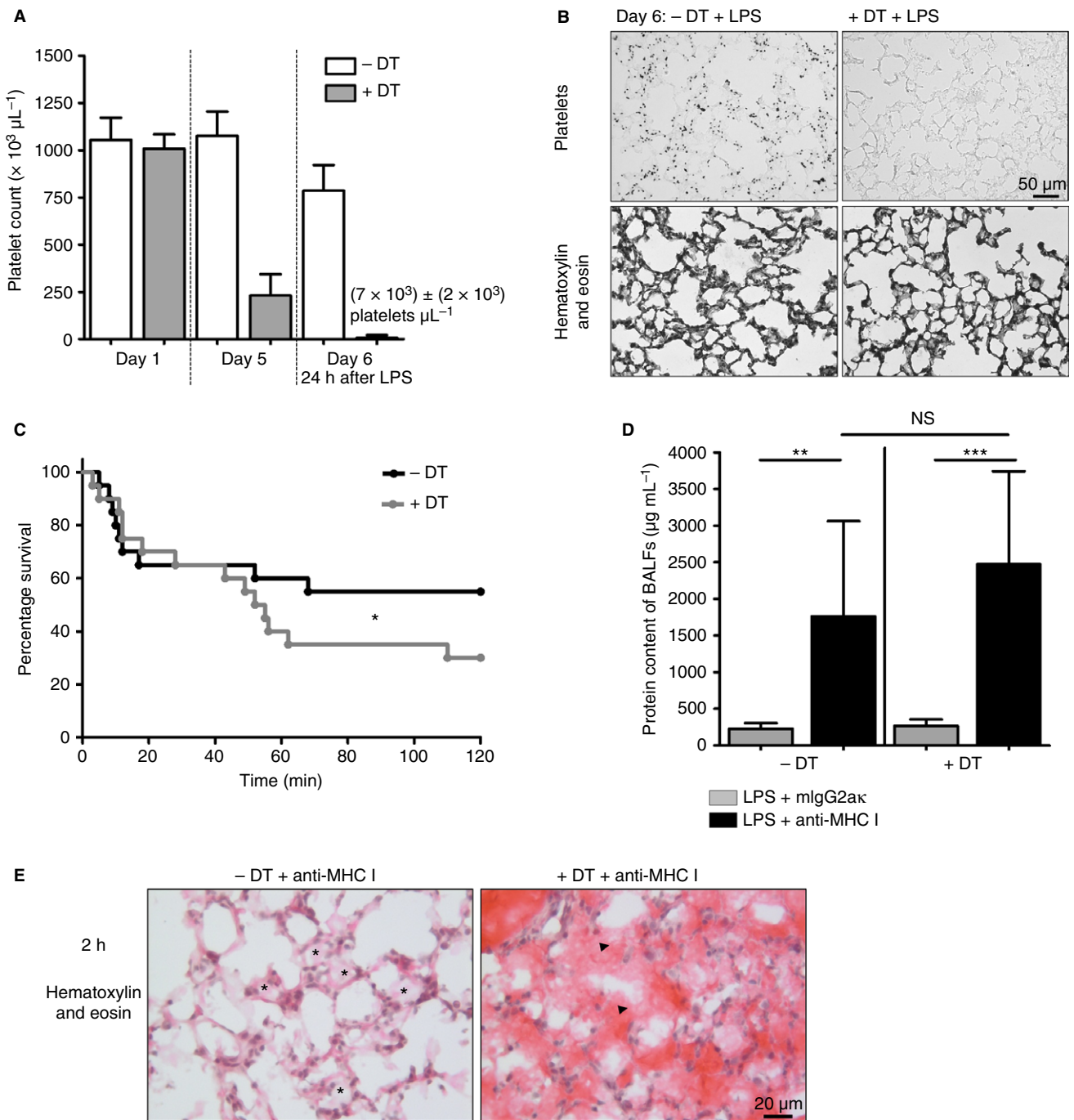


Fig. 2. Severe diphtheria toxin (DT)-induced thrombocytopenia does not protect PF4-cre/iDTR mice against transfusion-related acute lung injury (TRALI) but results in lung hemorrhages at later times. PF4-cre/iDTR mice received DT (100 ng day⁻¹, intraperitoneal, days 1–4) or saline. On day 5, the mice received lipopolysaccharide (LPS) (0.1 mg kg⁻¹, intraperitoneal). (A) Platelet counts before treatment (day 1), before administration of LPS (day 5), and 24 h later (day 6). Results are presented as the mean ± standard deviation (SD) (*n* = 35). (B) Upper panel: representative antiplatelet mAb (RAM.1) immunostaining of lung sections from PF4-cre/iDTR mice treated with saline (- DT + LPS) or DT (+ DT + LPS) on day 6. Lower panel: hematoxylin and eosin staining of the lung sections. (C–E) On day 6, saline-treated or DT-treated PF4-cre/iDTR mice were injected with an anti-major histocompatibility complex (MHC) I mAb or control mouse IgG2ak (0.8 mg kg⁻¹, intravenous). (C) Kaplan–Meier survival plots (from 0 min to 120 min, not significant [NS], *P* = 0.2260; from 0 min to 40 min, NS, *P* = 0.9142; from 40 min to 120 min, **P* = 0.0379; *n* = 20, log-rank test). (D) Protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) at death or at the 2-h endpoint were determined with a bicinchoninic acid assay. Results are presented as the mean ± SD (NS, *P* > 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *n* = 20). (E) Hematoxylin and eosin staining of lung sections from PF4-cre/iDTR mice treated with DT (right) or saline (left), 2 h after induction of TRALI. Arrows indicate the presence of erythrocytes. *Intra-alveolar deposits of protein appearing as pink-stained material.

haplotype) [16] were crossed with mice carrying a Cre recombinase-inducible DTR expression cassette (iDTR mice, BALB/cBy.B6 background, H-2^d MHC I haplotype) [17] to generate PF4-cre/iDTR mice (BALB/cBy.B6 background, H-2^d × H-2^b MHC I haplotype). Treatment of PF4-cre/iDTR mice with DT (100 ng day⁻¹, intraperitoneal) led to a progressive decline in the number of circulating platelets, which resulted, after five daily doses, in severe thrombocytopenia (Fig. 1A), without any impact on the leukocyte count (Fig. 1B).

Severe DT-induced thrombocytopenia does not protect PF4-cre/iDTR mice against TRALI but results in lung hemorrhages at later times

In the two-hit murine model described by Looney *et al.* [10], TRALI is induced in H-2^d mice by challenge with a mouse anti-H-2K^d/H-2D^d mAb (clone 34-1-2s), 24 h after priming with LPS. Thus, mice were sensitized with LPS (0.1 mg kg⁻¹, intraperitoneal) on day 5, after treatment for 4 days with DT or saline solution. Although thrombocytopenia was moderate on the day of LPS

injection, 24 h later the number of circulating platelets had dropped dramatically in mice treated with DT ($[7 \times 10^3] \pm [2 \times 10^3]$ platelets μL^{-1} , $n = 35$) (Fig. 2A). Nevertheless, under these conditions, no spontaneous deaths were observed. Immunohistologic investigation of the lung tissues with an anti-mouse platelet antibody confirmed that, 24 h after LPS sensitization, platelets were present in the lungs of control mice but were absent from those of DT-treated mice (Fig. 2B). Hematoxylin and eosin staining of lung sections revealed no signs of spontaneous hemorrhage in the lungs of severely thrombocytopenic mice (Fig. 2B).

Within minutes of challenge with the anti-MHC I mAb, most of the mice showed signs of respiratory distress (irregular breathing), indicating the presence of TRALI. During the first 40 min following administration of the anti-MHC I mAb, the survival curves of saline-treated and DT-treated PF4-cre/iDTR mice were similar (Fig. 2C). However, during the last 80 min of the experiment, the mortality was significantly higher in the thrombocytopenic group. Accordingly, both saline-treated and DT-treated PF4-cre/iDTR mice experienced severe lung

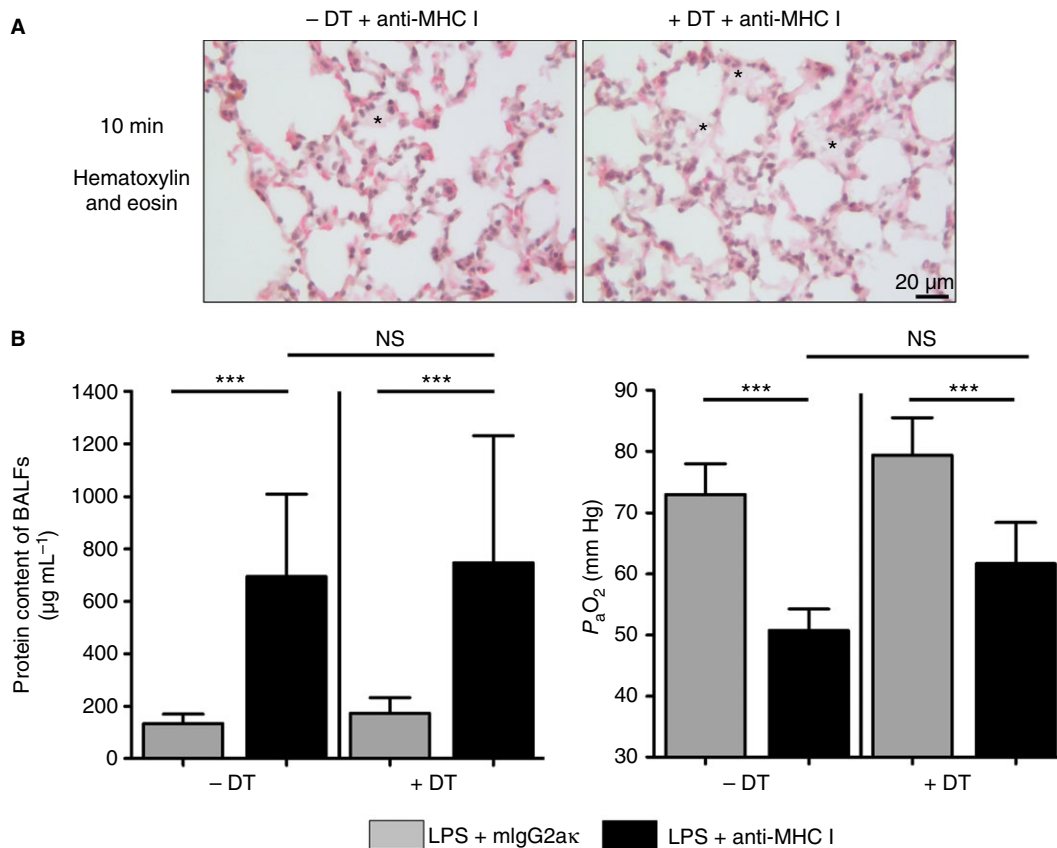


Fig. 3. Early transfusion-related acute lung injury (TRALI) events are observed in severely thrombocytopenic mice. TRALI was induced in PF4-cre/iDTR mice treated with diphtheria toxin (DT) or saline as described in Fig. 2, and respiratory parameters were measured after 10 min. (A) Hematoxylin and eosin staining of sections of lung tissue. *Intra-alveolar deposits of protein appearing as pink-stained material. (B) Left panel: protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs). Right panel: measurement of P_{aO_2} . Results are presented as the mean \pm standard deviation (not significant [NS], $P > 0.05$; *** $P < 0.001$; $n = 8-12$). LPS, lipopolysaccharide; MHC, major histocompatibility complex.

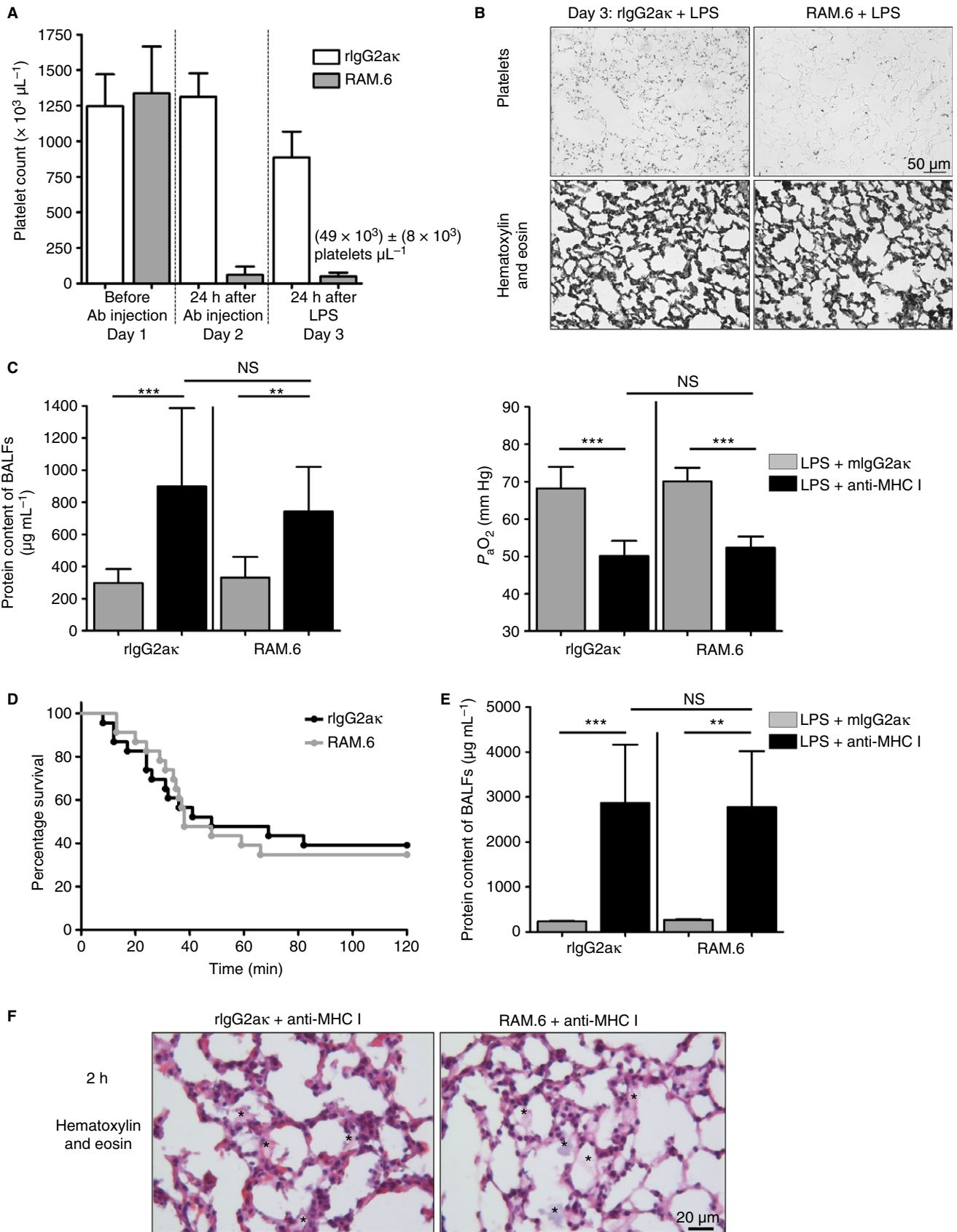


Fig. 4. Transfusion-related acute lung injury (TRALI) occurs in mice with immune thrombocytopenia in the absence of any signs of lung hemorrhage. (A, B) BALB/c mice received RAM.6 or control rat IgG2 κ (2 mg kg⁻¹, intravenous), and 24 h later were treated with lipopolysaccharide (LPS) (0.1 mg kg⁻¹, intraperitoneal). (A) Blood platelets were counted before administration of LPS, and 24 h later on day 3 ($n = 12-16$). (B) Lung sections were immunolabeled with the antiplatelet mAb RAM.1 (upper panel) or stained with hematoxylin and eosin (lower panel). (C) TRALI was induced in mice treated with RAM.6 or control rat IgG2 κ , and respiratory parameters were measured after 10 min. Left panel: analysis of protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs). Right panel: measurement of P_{aO_2} . Results are presented as the mean \pm standard deviation (SD) (not significant [NS], $P > 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; $n = 11$). (D-F) TRALI was induced in mice treated with RAM.6 or control rat IgG2 κ (2 mg kg⁻¹, intravenous). (D) Kaplan–Meier survival plots (from 0 min to 120 min, NS, $P = 0.9012$; from 0 min to 40 min, NS, $P = 0.8168$; from 40 min to 120 min, NS, $P = 0.8746$; $n = 23$, log-rank test). (E) Analysis of protein concentrations in BALFs at death or at the 2-h endpoint. Results are presented as the mean \pm SD (NS, $P > 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; $n = 12$). (F) Hematoxylin and eosin staining of sections of lung tissue. *Intra-alveolar deposits of protein appearing as pink-stained material. Ab, antibody; MHC, major histocompatibility complex.

edema, as reflected by the leakage of proteins into the airways after death or after 2 h (Fig. 2D). Histologic analyses of the lungs at death or 2 h after injection of the anti-MHC I mAb confirmed the presence of lung edema, and revealed that erythrocytes had accumulated in the alveolar spaces of DT-treated mice (Fig. 2E). In negative control experiments, injection of irrelevant mouse IgG2 κ (mIgG2 κ) induced no respiratory distress, lung edema (Fig. 2D), or mortality (Fig. S2). Thus, under these experimental conditions, the severe thrombocytopenia could result in confounding effects, owing to bleeding complications.

Early TRALI events are observed in severely thrombocytopenic mice

To avoid the late confounding effects of hemorrhages, we focused on the early steps of TRALI, i.e. 10 min after anti-MHC I mAb injection. At this time point, there was no evidence of hemorrhage in the lungs, whereas edema was already observed (Fig. 3A). Consistent with the histologic analyses, the concentrations of proteins in BALFs were similarly increased in thrombocytopenic and control mice receiving 34-1-2s, as compared with mice receiving mIgG2 κ (Fig. 3B, left panel). Accordingly, P_{aO_2} was significantly lower in mice injected with 34-1-2s, whether platelet counts were normal or low, than in the corresponding mice receiving mIgG2 κ (Fig. 3B, right panel). No statistical differences were observed between saline-treated and DT-treated PF4-cre/iDTR mice 10 min after injection of the anti-MHC I mAb. Altogether, these findings indicated that edema and respiratory insufficiency began similarly in mice with normal or low platelet counts, whereas no hemorrhages were observable during this period. Thus, the initiation of MHC I-induced TRALI responses occurs in thrombocytopenic animals, strongly suggesting that platelets are dispensable during the first steps of its pathogenesis.

TRALI occurs in mice with immune thrombocytopenia in the absence of any signs of lung hemorrhage

To avoid the confounding effects associated with DT-induced severe thrombocytopenia in late TRALI events,

other methods of platelet targeting were used. First, we induced less severe thrombocytopenia with a platelet-specific mAb, i.e. the rat anti-GPIb α mAb (rIgG2 κ , RAM.6), a method that provides more specificity than the polyclonal antiplatelet serum previously employed [10], which could contain antibodies directed against epitopes shared by platelets and leukocytes. Preliminary experiments showed that, in BALB/c mice, injection of RAM.6 (2 mg kg⁻¹, intravenous) induced, within 15 min, thrombocytopenia that persisted for 48 h (Fig. S3A). Thus, 24 h after injection of RAM.6, the circulating platelet count had decreased by 95% (Fig. 4A), without any impact on the numbers of leukocytes (Fig. S3B).

The thrombocytopenia worsened 24 h after injection of LPS (0.1 mg kg⁻¹) ($[49 \times 10^3] \pm [8 \times 10^3]$ platelets μL^{-1} , $n = 12$) (Fig. 4A). Accordingly, platelets were barely detected in the lungs of RAM.6-treated mice, unlike in mice receiving rIgG2 κ (Fig. 4B). TRALI responses were analyzed 10 min after administration of the anti-MHC I mAb. In mice receiving control mIgG2 κ , protein concentrations in BALFs remained low, but injection of 34-1-2s resulted in increased protein concentrations in BALFs in all mice, whether platelet counts were normal or low (Fig. 4C, left panel). Concomitantly, P_{aO_2} decreased in mice receiving the anti-MHC I mAb, as compared with mice receiving mIgG2 κ (Fig. 4C, right panel). At later times, TRALI responses were similar in control and thrombocytopenic mice in terms of mortality (Fig. 4D), lung edema at death or after 2 h (Fig. 4E), or the absence of lung hemorrhages in dead or surviving mice (Fig. 4F). Overall, these data showed that immunodepletion of platelets had no significant impact on the parameters investigated in the early or late steps of MHC I-induced TRALI.

Nevertheless, as the thrombocytopenia was less severe, a role of platelets in TRALI could not be formally excluded. This led us to explore the consequences of the abolition of specific platelet functions.

TRALI occurs when the hemostatic functions of platelets are defective, whereas platelets prevent lung hemorrhages

First, BALB/c mice were treated with aspirin. We observed that a high dose of aspirin (100 mg kg⁻¹,

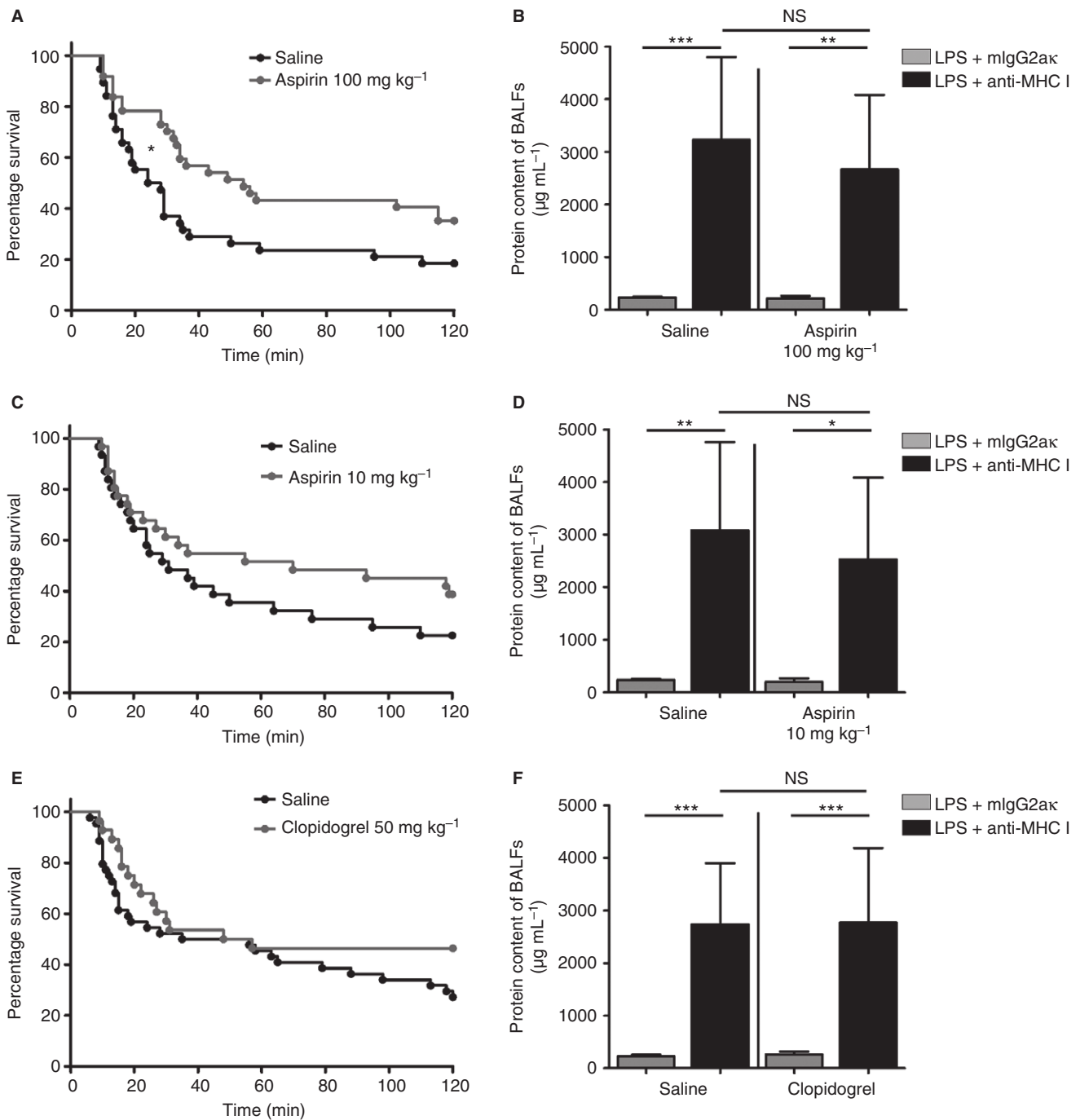


Fig. 5. Transfusion-related acute lung injury (TRALI) develops in mice treated with aspirin or clopidogrel. (A, B) BALB/c mice received aspirin (100 mg kg⁻¹, intraperitoneal) or saline 30 min prior to lipopolysaccharide (LPS) priming, and again 2 h prior to induction of TRALI by anti-major histocompatibility complex (MHC) I mAb challenge. (A) Kaplan–Meier survival plots (from 0 min to 120 min, **P* = 0.0268; from 0 min to 40 min, **P* = 0.0154; from 40 min to 120 min, not significant [NS], *P* = 0.9033; *n* = 37–38, log-rank test). (B) Analysis of protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) at death or at the 2-h endpoint. Results are presented as the mean ± standard deviation (SD) (NS, *P* > 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *n* = 14). (C, D) BALB/c mice received aspirin (10 mg kg⁻¹, intraperitoneal) or saline 30 min prior to LPS priming, and again 2 h prior to induction of TRALI by anti-MHC I mAb challenge. (C) Kaplan–Meier survival plots (from 0 min to 120 min, NS, *P* = 0.1631; from 0 min to 40 min, NS, *P* = 0.3260; from 40 min to 120 min, NS, *P* = 0.2763; *n* = 31, log-rank test). (D) Analysis of protein concentrations in BALFs at death or at the 2-h endpoint. Results are presented as the mean ± SD (NS, *P* > 0.05; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; *n* = 6). (E, F) BALB/c mice were treated with clopidogrel (50 mg kg⁻¹, oral) or arabic gum 16 h and 2 h prior to LPS sensitization, and again 16 h and 2 h prior to induction of TRALI by anti-MHC I mAb challenge. (E) Kaplan–Meier survival plots (from 0 min to 120 min, NS, *P* = 0.1269; from 0 min to 40 min, NS, *P* = 0.4890; from 40 min to 120 min, NS, *P* = 0.0675; *n* = 30, log-rank test). (F) Analysis of protein concentrations in BALFs at death or at the 2-h endpoint. Results are presented as the mean ± SD (NS, *P* > 0.05; ****P* < 0.001; *n* = 12).

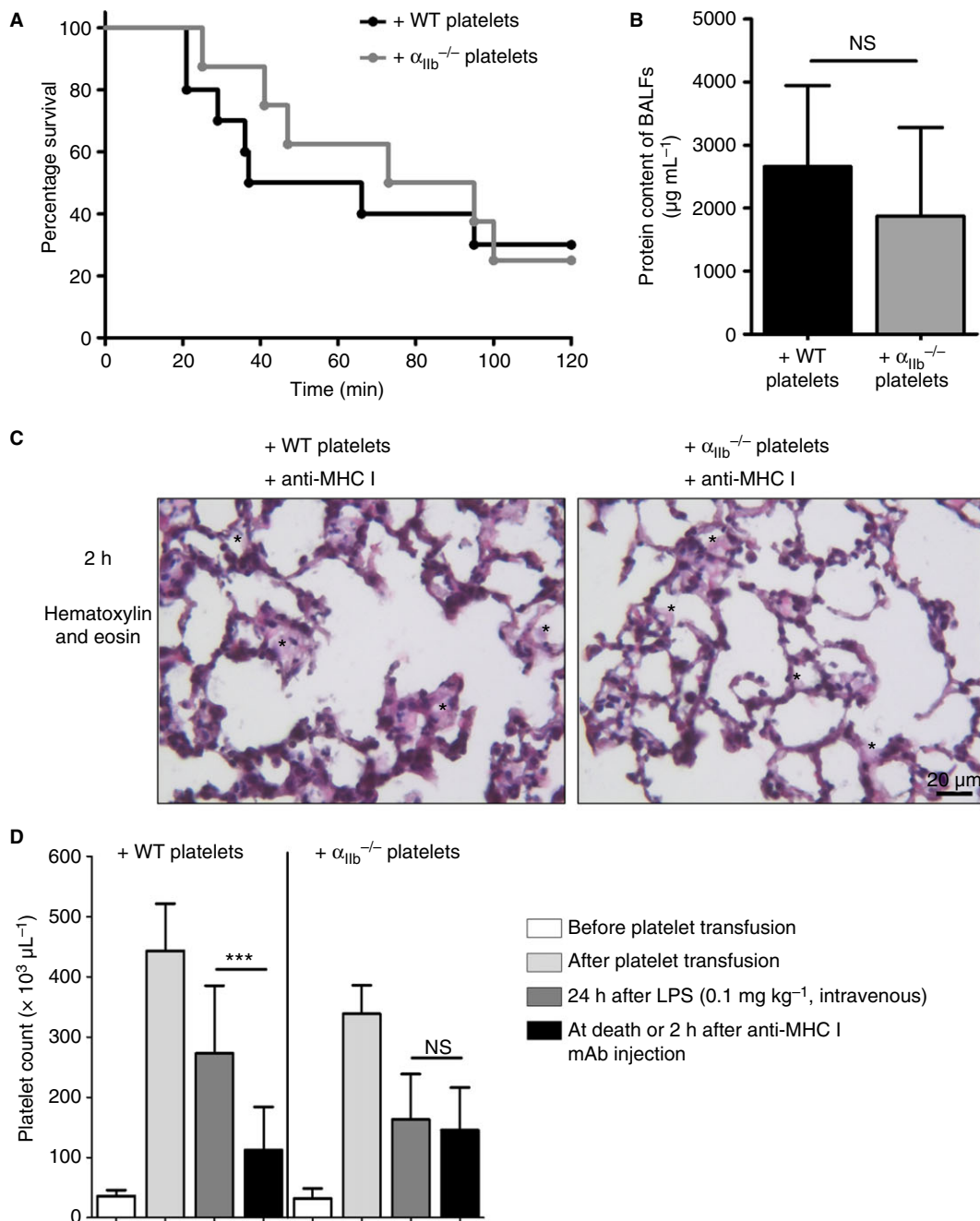


Fig. 6. Transfusion-related acute lung injury (TRALI) develops in thrombocytopenic mice transfused with $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$ platelets. Mice with severe diphtheria toxin-induced thrombocytopenia were transfused with wild-type (WT) or $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$ platelets, and TRALI was induced by injection of an anti-major histocompatibility complex (MHC) I mAb (see Materials and methods). (A) Kaplan–Meier survival plots (from 0 min to 120 min, not significant [NS], $P = 0.7437$; from 0 min to 40 min, NS, $P = 0.1173$; from 40 min to 120 min, NS, $P = 0.3081$; $n = 8$ –10, log-rank test). (B) Analysis of protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) at death or at the 2-h endpoint. Results are presented as the mean \pm standard deviation (SD) (NS, $P = 0.2517$; $n = 7$ –10). (C) Hematoxylin and eosin staining of sections of lung tissue. *Intra-alveolar deposits of protein appearing as pink-stained material. (D) Circulating platelet counts before platelet transfusion, 4 h after transfusion with WT or $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$ platelets, 24 h after administration of lipopolysaccharide (LPS) (0.1 mg kg^{-1} , intraperitoneal), and after anti-MHC I mAb challenge, either at death or at the 2-h endpoint. Results are presented as the mean \pm SD (** $P < 0.001$; NS, $P > 0.05$; $n = 8$ –10).

intraperitoneal) transiently delayed the mortality (from 0 min to 120 min, $P = 0.0268$; from 0 min to 40 min, $P = 0.0154$; from 40 min to 120 min, not significant, $P = 0.9033$; $n = 37$ –38, log-rank test) (Fig. 5A), protein

concentrations in BALFs being similar in aspirin-treated and saline-treated mice at death or at the 2-h time point (Fig. 5B). As this dose of aspirin is very high and does not correspond to clinically relevant antiplatelet doses, we

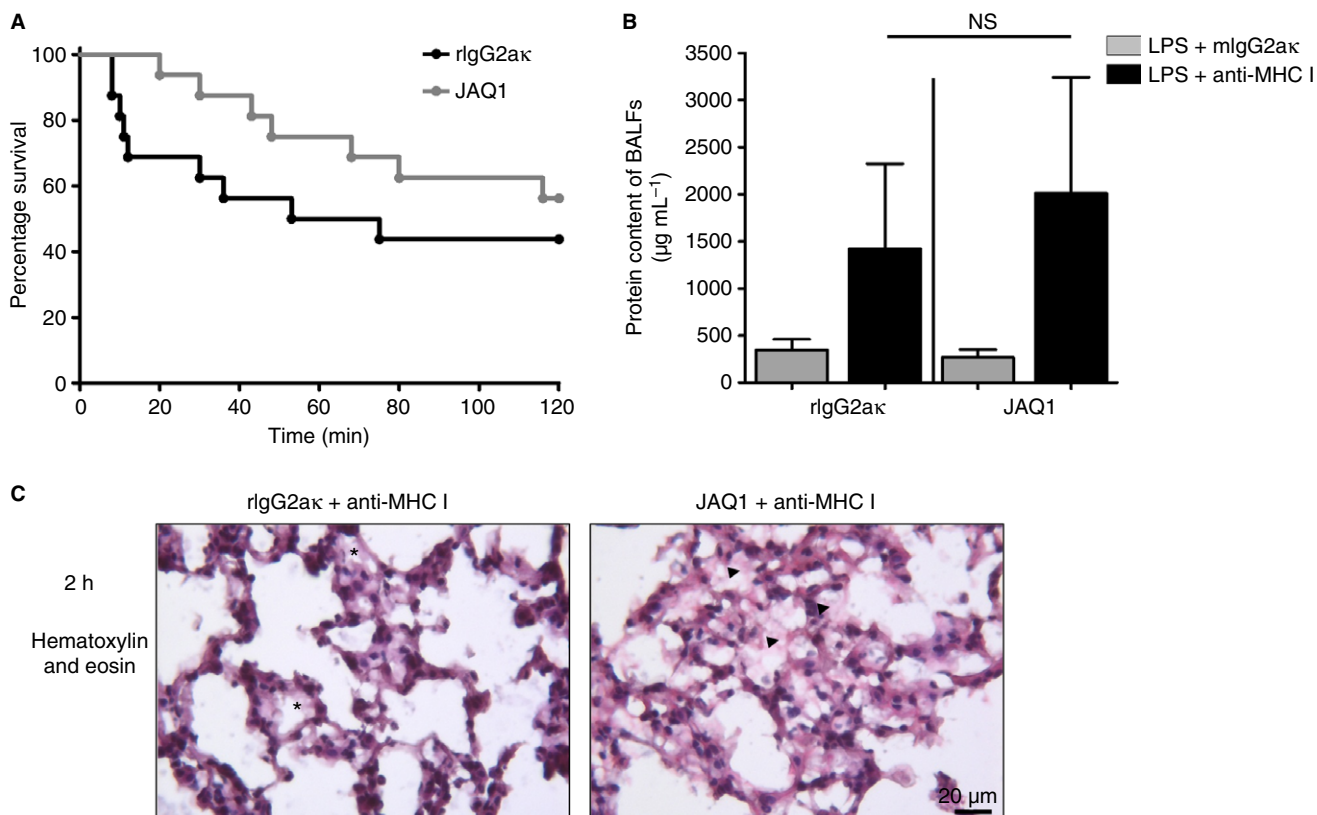


Fig. 7. Transfusion-related acute lung injury develops in glycoprotein (GP)VI-immunodepleted mice. (A, B) BALB/c mice were injected with the anti-GPVI antibody JAQ1 or control rat IgG2ak (2.5 mg kg^{-1} , subcutaneous) 3 days prior to lipopolysaccharide (LPS) sensitization. (A) Kaplan–Meier survival plots (from 0 min to 120 min, not significant [NS], $P = 0.2775$; from 0 min to 40 min, NS, $P = 0.0950$; from 40 min to 120 min, NS, $P = 0.7029$; $n = 16$, log-rank test). (B) Analysis of protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) at death or at the 2-h endpoint. Results are presented as the mean \pm standard deviation (NS, $P > 0.05$; $n = 16$). (C) Hematoxylin and eosin staining of sections of lung tissue. Arrows indicate the presence of erythrocytes. *Intra-alveolar deposits of protein appearing as pink-stained material. MHC, major histocompatibility complex.

tested a 10-fold lower dose (10 mg kg^{-1} , intraperitoneal), which still effectively inhibited its intracellular target cyclooxygenase-1 (COX-1), as demonstrated *ex vivo* by the absence of arachidonic acid-induced platelet aggregation [22] (Fig. S4A). Under these conditions, aspirin-treated mice were not protected against TRALI, either in terms of survival (Fig. 5C) or in terms of lung edema (Fig. 5D).

Second, mice received clopidogrel (50 mg kg^{-1} , oral) to irreversibly inhibit the P2Y₁₂ receptor [23], which is the ADP receptor responsible for the amplification of most platelet responses (Fig. S4B) [24]. This treatment did not affect the survival (Fig. 5E) or the extent of lung edema (Fig. 5F).

Third, we explored the role of platelet GPIIb/IIIa, as its inhibitor tirofiban has been reported to attenuate TRALI-associated lung edema and mortality [11]. As this drug has a very short half-life and poor efficacy in mice *in vivo* [25,26], we opted to evaluate the importance of GPIIb/IIIa in mice with $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$ platelets. PF4-cre/iDTR mice were treated for 5 days with DT. On day 6, the mice were transfused with WT or $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$

platelets, which raised the peripheral platelet count to $\sim 50\%$ of that in control mice, without affecting the numbers of granulocytes (Fig. S5A). LPS was then administered, and, 24 h later, flow cytometric analysis of blood samples confirmed the absence of endogenous WT platelets (Fig. S5B). Two hours after TRALI induction, survival curves (Fig. 6A) and protein concentrations in BALFs (Fig. 6B) were similar, whether the mice had been transfused with WT or with $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$ platelets. In both cases, lung hemorrhages were not observed (Fig. 6C). Interestingly, whereas, in all other TRALI experiments (Fig. S6) and in mice transfused with WT platelets (Fig. 6D), platelet counts fell significantly after administration of 34-1-2s, only a moderate decrease was observed in mice transfused with $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$ platelets (Fig. 6D; Fig. S6). Altogether, these results indicate that GPIIb/IIIa is not required for the development of TRALI.

Fourth, we investigated the role of platelet GPVI, a glycoprotein whose absence can result in hemorrhages during inflammation [27]. We took advantage of the possibility of inducing stable GPVI depletion for at least 6 days after the administration of the anti-GPVI mAb

JAQ1 (2.5 mg/kg, subcutaneous) [20]. Mice depleted of GPVI could also experience TRALI without significant differences in survival (Fig. 7A) or extent of lung edema (Fig. 7B). However, in GPVI-depleted mice, TRALI was occasionally accompanied by intra-alveolar hemorrhages (Fig. 7C) and reduced platelet consumption (Fig. S6). Hence, GPVI appeared to be dispensable for the development of TRALI, but protected the lung microvessels against cell leakage. Overall, these data are consistent with the absence of a pathologic role of platelets in the development of lung damage during MHC I-induced TRALI, whereas these cells are required for the maintenance of vascular integrity, notably through activation of platelet GPVI.

Discussion

The role of blood platelets in MHC I-induced TRALI is still a matter of debate, owing to divergent results being obtained with different experimental approaches. To clarify this issue, we used several methods to deplete platelets or target their major activation pathways.

Two approaches were used to induce thrombocytopenia: one causing severe non-immune thrombocytopenia ($< 10^4$ platelets μL^{-1}) after injection of DT in transgenic iDTR mice selectively expressing its receptor in megakaryocytes, and the other causing less severe thrombocytopenia ($[49 \times 10^3] \pm [8 \times 10^3]$ platelets μL^{-1}) after administration of an antiplatelet mAb antibody (RAM.6) directed against GPIIb α . Regarding early responses, i.e. within the first 10 min following administration of the anti-MHC I mAb, the two types of thrombocytopenic mice and control mice with normal platelet counts showed similar extents of edema and modifications of respiratory parameters. Importantly, during these first minutes, no lung hemorrhages were observed. These findings indicate that platelets are not essential for the initiation of MHC I-induced TRALI.

In the context of DT-mediated severe thrombocytopenia ($< 10^4$ platelets μL^{-1}), erythrocytes were often found in the lung alveoli at death or at the 2-h time point. In contrast, no alveolar erythrocytes were observed in the case of RAM.6-induced less severe thrombocytopenia. This difference between the two types of thrombocytopenic mouse is reminiscent of previously described hemorrhages associated with strong inflammatory events in severely, but not in "moderately", thrombocytopenic animals [27,28]. The presence of lung hemorrhages in DT-treated PF4-cre/iDTR mice probably explains their increased mortality during the second hour following induction of TRALI.

The development of TRALI in the context of moderate thrombocytopenia did not allow us to formally exclude a role of platelets during the two hours following mAb administration. Hence, we investigated whether inhibition of or defects in specific platelet activation pathways could

affect TRALI. No protection was observed when the P2Y₁₂ receptor was inhibited with clopidogrel, when GPIIbIIIa was absent, or when GPVI was immunodepleted from platelets. TRALI also occurred normally in mice with severe DT-induced thrombocytopenia that were transfused with $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$ platelets treated with clopidogrel (50 mg kg^{-1}) (our unpublished observations). Thus, these experiments do not support a major role of platelets in MHC I-induced TRALI initiation and development.

Our results challenge previous studies reporting an active contribution of platelets to experimental MHC I-induced TRALI. In these earlier studies, TRALI was inhibited by: (i) immune depletion of platelets with a rabbit polyclonal serum raised against mouse platelets [10]; (ii) high dose of aspirin [10,15]; or (iii) the GPIIbIIIa inhibitor tirofiban [11]. The experiments with the rabbit anti-mouse platelet serum have been criticized by others on the grounds that this method could transiently deplete complement or activate Fc γ R-mediated responses, resulting in confounding causes in the protection of mice [13]. As the rabbit anti-mouse platelet serum could contain antibodies directed against epitopes shared by platelets and leukocytes, we opted for platelet depletion with a platelet-specific mAb directed against GPIIb α . Our TRALI experiments were performed 48 h after platelet immunodepletion, i.e. under conditions where the effects of complement consumption are no longer observable [13]. With respect to the protective effect of aspirin, it was observed only at a high and non-pharmacologic dose (100 mg kg^{-1}) [10]. We found that this dose of aspirin only transiently protected mice against TRALI in terms of mortality (during the first 40 min), whereas no protection was observed with a pharmacologic dose (10 mg kg^{-1}), which nevertheless inhibited COX-1. This suggests that the protective effect of high-dose aspirin could result from its platelet-independent anti-inflammatory and anti-oxidant properties, or from those of salicylate, a metabolic derivative, rather than from its antiplatelet activity [26,29]. In agreement with our observations, administration of aspirin has been reported to be unable to protect critically ill patients against TRALI [30]. Finally, the use of tirofiban to inhibit GPIIbIIIa in mice appears to be rather inadequate [11], owing to its known very short half-life and poor efficacy in mice *in vivo* [25,26]. For this reason, we preferred to use $\alpha_{\text{IIb}}^{-/-}$ platelets, considering that, under these conditions, the experiments would be more robust.

Whereas platelets were dispensable for the induction and development of MHC I-induced TRALI, they were required to prevent lung hemorrhages. Nevertheless, no hemorrhages occurred when the hemostatic functions of platelets were targeted, except in GPVI-immunodepleted mice, in which occasional hemorrhages were observed, although to a much smaller extent than in severely thrombocytopenic mice. These contrasting effects support the notion of a protective role of GPVI in the vasculature

[27,31], although complementary mechanisms could also be crucial. This latter conclusion is supported by the fact that platelet consumption still occurred in the absence of GPVI. Interestingly, significantly fewer transfused $\alpha_{IIb}^{-/-}$ platelets than transfused WT platelets were consumed during TRALI and under all other experimental conditions. These observations suggest that relatively small numbers of platelets are recruited to maintain the vascular integrity of the lungs during TRALI. In addition, the role of the GPIIb/IIIa receptor in the fibrinogen-mediated formation of platelet–platelet and platelet–leukocyte aggregates might explain the differences in platelet consumption between transfused $\alpha_{IIb}^{+/+}$ and $\alpha_{IIb}^{-/-}$ platelets. Consequently, processes downstream from the activated GPIIb/IIIa pathway would appear to be dispensable for the development of MHC I-induced TRALI.

In summary, our work points to the need to distinguish early events, which include the platelet-independent disruption of the epithelial barrier of the lungs and the resultant immediate lung edema, from downstream biological processes, which activate residing or recruited cells and compromise survival. All of our observations converge towards the view that platelets are not required for either the initiation or the development of TRALI-induced edema. They are, however, essential to maintain some degree of vascular integrity and to prevent blood losses in the alveoli. Our results indicate that four major signaling pathways of platelet activation, namely P2Y₁₂, GPIIb/IIIa, COX-1, and GPVI, are unlikely to be promising pharmacologic targets for the clinical management of MHC I-induced TRALI. Our findings do not exclude the possibility that, in clinics, during disease progression, platelets could participate in latter immunologic reactions. With respect to early pharmacologic strategies accompanying the intensive care management of TRALI and the design of preventive strategies, our observations suggest that antiplatelet therapy may not be beneficial clinically.

Addendum

B. Hechler and B. Maître conceived and designed the research, conducted experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. S. Magnenat, V. Heim, and M.-B. El Mdawar acquired the data. C. Gachet initiated the research. C. Gachet and H. de la Salle conceived the research, interpreted the data, and wrote the manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank M. Freund and her collaborators for animal care, C. Leguay for expert technical assistance, and J. Mulvihill for revising the English of the manuscript. This work was supported by a project grant

from EFS (No. APR-2011-16) and by INSERM, EFS and ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique).

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Supplementary material and methods.

Fig. S1. Timeline of the TRALI protocol.

Fig. S2. Irrelevant mIgG2a κ , instead of anti-MHC I mAb, does not induce mortality in severely thrombocytopenic DT-treated PF4-cre/iDTR mice.

Fig. S3. Immune thrombocytopenia induced with the rat anti-GPIb α mAb RAM.6.

Fig. S4. Effect of aspirin (10 or 100 mg kg⁻¹, intraperitoneal) or clopidogrel (50 mg kg⁻¹, oral) on platelet aggregation.

Fig. S5. Characterization of recipient DT-treated PF4-cre/iDTR mice transfused with WT or $\alpha_{IIb}^{-/-}$ platelets.

Fig. S6. Platelet consumption during TRALI.

References

- 1 Kleinman S, Caulfield T, Chan P, Davenport R, McFarland J, McPhedran S, Meade M, Morrison D, Pinsent T, Robillard P, Slinger P. Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 2004; **44**: 1774–89.
- 2 Muller JY. [TRALI: from diagnosis to prevention]. *Transfus Clin Biol* 2005; **12**: 95–102.
- 3 Vlaar AP, Juffermans NP. Transfusion-related acute lung injury: a clinical review. *Lancet* 2013; **382**: 984–94.
- 4 Sachs UJ. Recent insights into the mechanism of transfusion-related acute lung injury. *Curr Opin Hematol* 2011; **18**: 436–42.
- 5 Shaz BH, Stowell SR, Hillyer CD. Transfusion-related acute lung injury: from bedside to bench and back. *Blood* 2011; **117**: 1463–71.
- 6 Dry SM, Bechard KM, Milford EL, Churchill WH, Benjamin RJ. The pathology of transfusion-related acute lung injury. *Am J Clin Pathol* 1999; **112**: 216–21.
- 7 Kopko PM, Marshall CS, MacKenzie MR, Holland PV, Popovsky MA. Transfusion-related acute lung injury: report of a clinical look-back investigation. *JAMA* 2002; **287**: 1968–71.
- 8 Schneider RC, Zapol WM, Carvalho AC. Platelet consumption and sequestration in severe acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis* 1980; **122**: 445–51.
- 9 Logdberg LE, Vikulina T, Zimring JC, Hillyer CD. Animal models of transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev* 2009; **23**: 13–24.
- 10 Looney MR, Nguyen JX, Hu Y, van Ziffle JA, Lowell CA, Matthay MA. Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2009; **119**: 3450–61.
- 11 Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR. Platelets induce

- neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2012; **122**: 2661–71.
- 12 Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, Cifuni SM, Fuchs TA, von Andrian UH, Hartwig JH, Aster RH, Wagner DD. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood* 2012; **119**: 6335–43.
 - 13 Strait RT, Hicks W, Barasa N, Mahler A, Khodoun M, Kohl J, Stringer K, Witte D, van Rooijen N, Susskind BM, Finkelman FD. MHC class I-specific antibody binding to nonhematopoietic cells drives complement activation to induce transfusion-related acute lung injury in mice. *J Exp Med* 2011; **208**: 2525–44.
 - 14 Sachs UJ. A threshold model for the susceptibility to transfusion-related acute lung injury. *Transfus Clin Biol* 2012; **19**: 109–16.
 - 15 Ortiz-Munoz G, Mallavia B, Bins A, Headley M, Krummel MF, Looney MR. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 regulates neutrophil–platelet aggregation and attenuates acute lung injury in mice. *Blood* 2014; **124**: 2625–34.
 - 16 Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function *in vivo*. *Blood* 2007; **109**: 1503–6.
 - 17 Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TJ, Kremer M, Wunderlich FT, Jung S, Waisman A. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2005; **2**: 419–26.
 - 18 Wuescher LM, Takashima A, Worth RG. A novel conditional platelet depletion mouse model reveals the importance of platelets in protection against *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Thromb Haemost* 2015; **13**: 303–13.
 - 19 Strassel C, Nonne C, Eckly A, David T, Leon C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard–Soulier syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 241–7.
 - 20 Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, Mangin PH, Gachet C. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 779–89.
 - 21 Leon C, Evert K, Dombrowski F, Pertuy F, Eckly A, Laeuffer P, Gachet C, Greinacher A. Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD. *Blood* 2012; **119**: 3333–41.
 - 22 Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES Jr, Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1031–40.
 - 23 Gachet C, Cattaneo M, Ohlmann P, Hechler B, Lecchi A, Chevalier J, Cassel D, Mannucci PM, Cazenave JP. Purinoceptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors. *Br J Haematol* 1995; **91**: 434–44.
 - 24 Gachet C. P2Y(12) receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Purinergic Signal* 2012; **8**: 609–19.
 - 25 Hechler B, Freund M, Alame G, Leguay C, Gaertner S, Cazenave JP, Petitou M, Gachet C. The antithrombotic activity of EP224283, a neutralizable dual factor Xa inhibitor/glycoprotein IIb/IIIa antagonist, exceeds that of the coadministered parent compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; **338**: 412–20.
 - 26 Magallon J, Chen J, Rabbani L, Dangas G, Yang J, Bussel J, Diacovo T. Humanized mouse model of thrombosis is predictive of the clinical efficacy of antiplatelet agents. *Circulation* 2011; **123**: 319–26.
 - 27 Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, Cholka A, Stolla M, Mackman N, Owens AP III, Ware J, Kahn ML, Bergmeier W. Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest* 2013; **123**: 908–16.
 - 28 Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ, Cifuni SM, Wagner DD. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 2008; **111**: 4958–64.
 - 29 Grosser N, Schroder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the nitric oxide–cGMP pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 1345–51.
 - 30 Tuinman PR, Vlaar AP, Binnenkade JM, Juffermans NP. The effect of aspirin in transfusion-related acute lung injury in critically ill patients. *Anaesthesia* 2012; **67**: 594–9.
 - 31 Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, Ollivier V, Loyau S, Goerge T, Nieswandt B, Jandrot-Perrus M, Ho-Tin-Noe B. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* 2015; **126**: 1017–26.

SUPPORTING INFORMATION

Platelets are dispensable for antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in the mouse

B. Hechler, B. Maître, S. Magnenat, V. Heim, M.-B. El Mdawar, C. Gachet, H. de la Salle.

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Reagents

Lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli*, serotype 055:B5, L28-80) and diphtheria toxin (DT) were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Xylazine (Rompun[®]) and ketamine (Imalgene 1,000[®]) were from Bayer (Leverkusen, Germany) and Merial (Lyon, France), respectively. Romiplostim (Nplate[®]) was purchased from Amgen (Thousand Oaks, CA) and clopidogrel and aspirin (Aspegic[®]) were provided by Sanofi-Aventis (Paris, France).

Antibodies

A mouse mAb against mouse H-2K^d-2D^d MHC I haplotypes (clone 34-1-2s) and irrelevant mouse IgG2 κ (mIgG2 κ) were from e-Biosciences (Paris, France). Rat mAbs against the extracellular domain of platelet GPIIb β (RAM.1) [1] or GPIIb α (RAM.6) [2] were produced in our laboratory. The anti-GPVI monoclonal antibody JAQ1 was provided by Emfret Analytics (Eibelstadt, Germany).

Histopathology and immunohistochemistry

At the end of the experiments, the lungs of the mice were removed and fixed in 4% paraformaldehyde for 6 h. The fixed samples were washed in PBS, snap-frozen in optimal

cutting temperature (OCT) embedding medium and cross-sectioned (8 μm thick). To quantify the presence of platelets, the lung sections were stained with a rat anti-GPIIb β mAb (RAM.1) [1], followed by a secondary goat anti-rat IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase. As negative controls, some sections were stained with irrelevant isotype-matched IgG instead of the primary mAb. Color development was performed using 3',3'-diaminobenzidine. Other lung sections were stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplemental Figure S1: Timeline of the TRALI protocol.

A. PF4-cre/iDTR mice received DT (100 ng/day, i.p., days 1 to 4) or saline. On day 5, the mice received LPS (0.1 mg/kg, i.p.) and 24 h later were injected with the 34-1-2s mAb or mIgG2 κ (0.8 mg/kg, i.v.). **B.** BALB/c mice received RAM.6 or control rIgG2 κ (2 mg/kg, i.v.) and 24 h later were treated with LPS (0.1 mg/kg, i.p.). On day 3, the mice were injected with the 34-1-2s mAb or mIgG2 κ (0.5 mg/kg, i.v.). The mice were maintained at 37°C and surviving ones were sacrificed 2 h after injection of the anti-MHC I mAb. Alternatively, the mice were sacrificed 10 min after administration of the mAb.

Supplemental Figure S2: Irrelevant mIgG2 κ , instead of anti-MHC I mAb, does not induce mortality in severely thrombocytopenic DT-treated PF4-cre/iDTR mice.

PF4-cre/iDTR mice received DT (100 ng/day, i.p., days 1 to 4) or saline, followed by LPS (0.1 mg/kg, i.p.) on day 5, followed by control mIgG2 κ (0.8 mg/kg, i.v.) instead of anti-MHC I mAb, on day 6. Kaplan-Meier survival plots (from 0 to 120 min, ns, $P = 1$, $n = 6$, log-rank test).

Supplemental Figure S3: Immune thrombocytopenia induced with the rat anti-GPIIb α mAb RAM.6.

A. Kinetic of RAM.6 (2 mg/kg, i.v.)-induced thrombocytopenia in BALB/c mice. **B.** Absence of impact of RAM.6 (2 mg/kg, i.v.) on circulating leukocyte count in mice. Results are presented as the mean \pm SEM (n = 3).

Supplemental Figure S4: Effect of aspirin (10 or 100 mg/kg, i.p.) or clopidogrel (50 mg/kg, i.p.) on platelet aggregation.

A. Arachidonic acid (1 mM)-induced platelet aggregation in citrated platelet rich plasma (cPRP) of BALB/c mice receiving aspirin (10 or 100 mg/kg, i.p.) or saline. **B.** ADP (10 μ M)-induced platelet aggregation in cPRP of BALB/c mice receiving clopidogrel (50 mg/kg, i.p.) or arabic gum.

Supplemental Figure S5: Characterization of recipient DT-treated PF4-cre/iDTR mice transfused with WT or $\alpha_{IIb}^{-/-}$ platelets.

A. Circulating granulocyte counts in severely thrombocytopenic DT-treated (100 ng/day, 5 days) PF4-cre/iDTR mice before platelet transfusion, 4 h after transfusion with WT or $\alpha_{IIb}^{-/-}$ platelets, 24 h after administration of LPS (0.1 mg/kg, i.p.) and after anti-MHC I mAb challenge, either at death or at the 2 h endpoint. Results are presented as the mean \pm SD (n = 8-10). **B.** Expression of GPIIbIIIa on the circulating platelets of severely thrombocytopenic DT-treated (100 ng/day, 5 days) PF4-cre/iDTR mice, 24 h after transfusion with WT or $\alpha_{IIb}^{-/-}$ platelets. A 5 μ L blood sample, drawn from the mouse tail, was stained with an Alexa647-conjugated rat anti-mouse GPIIbIIIa mAb (RAM.2, 5 μ g/mL) [2] for 30 min and analyzed by flow cytometry. Blood samples drawn from WT and $\alpha_{IIb}^{-/-}$ mice served as positive and negative controls, respectively. Results are presented as the mean \pm SEM (n = 8-10).

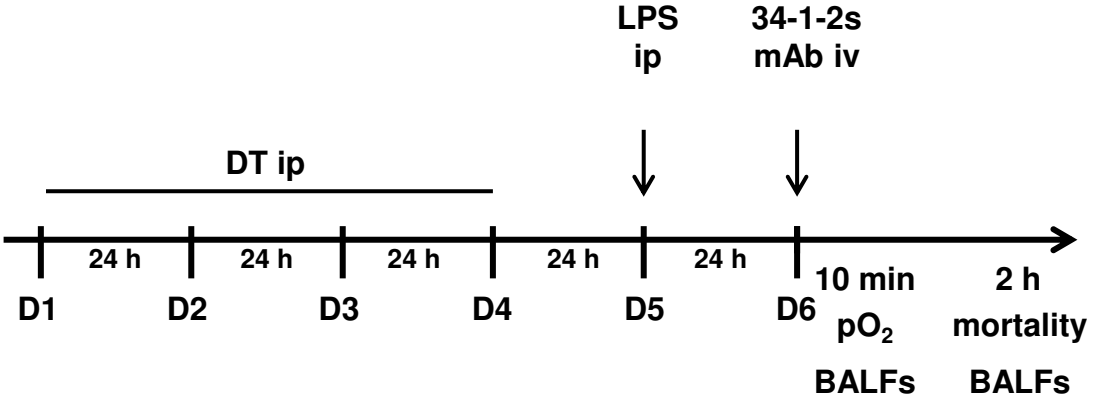
Supplemental Figure S6: Platelet consumption during TRALI.

Platelets were counted before induction of TRALI, by challenge with an anti-MHC I mAb, and at death or at the 2 h endpoint of the experiment. BALB/c mice received aspirin (100 mg/kg or 10 mg/kg, i.p.), clopidogrel (50 mg/kg, p.o.), JAQ1 (2.5 mg/kg, s.c.) or vehicle, while severely thrombocytopenic DT-treated PF4-cre⁺/iDTR mice were transfused with WT or $\alpha_{IIb}^{-/}$ platelets (see Methods). Results are presented as the mean \pm SEM (aspirin 100 mg/kg, n = 20; aspirin 10 mg/kg, n = 24; clopidogrel 50 mg/kg, n = 12; WT transfused platelets, n = 10; $\alpha_{IIb}^{-/}$ transfused platelets, n = 8; JAQ1, n = 16; **P = 0.0014; ***P < 0.001, Student's t-test).

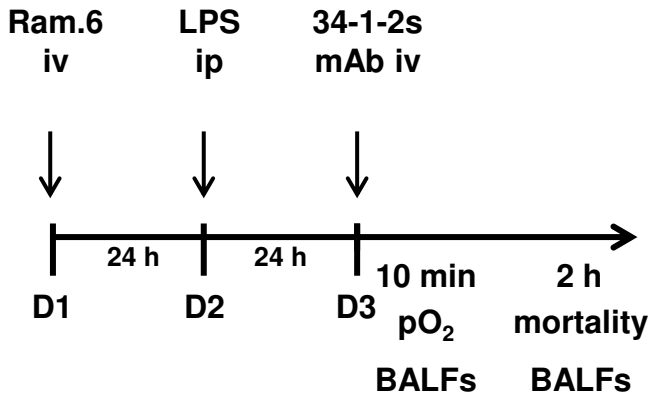
REFERENCES

- 1 Perrault C, Moog S, Rubinstein E, Santer M, Baas MJ, de la Salle C, Ravanat C, Dambach J, Freund M, Santoso S, Cazenave JP, Lanza F. A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb/IIIa modulates vWF mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 1238-48.
- 2 Strassel C, Nonne C, Eckly A, David T, Leon C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 241-7.

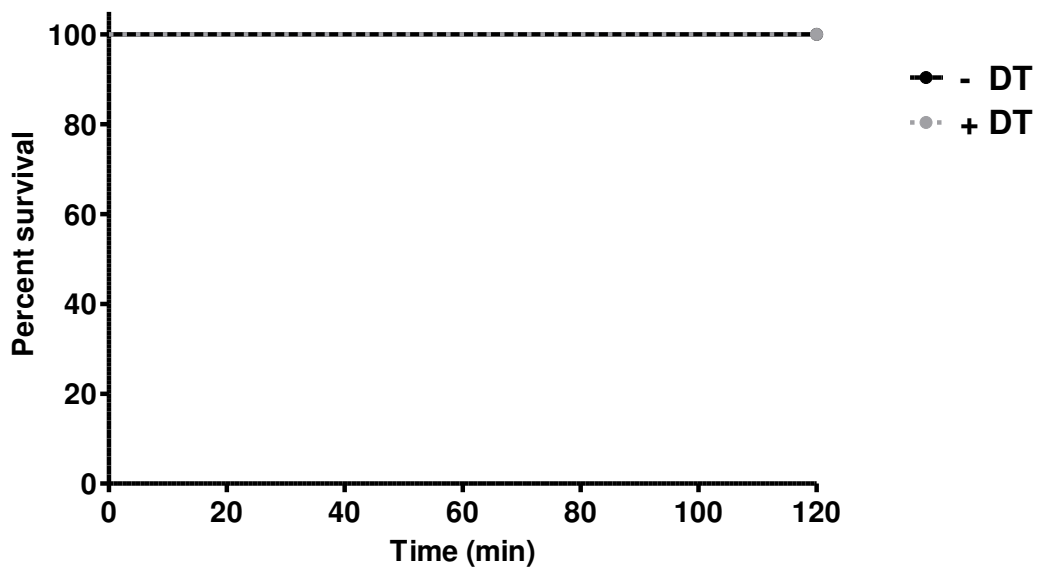
A PF4-cre/iDTR mice



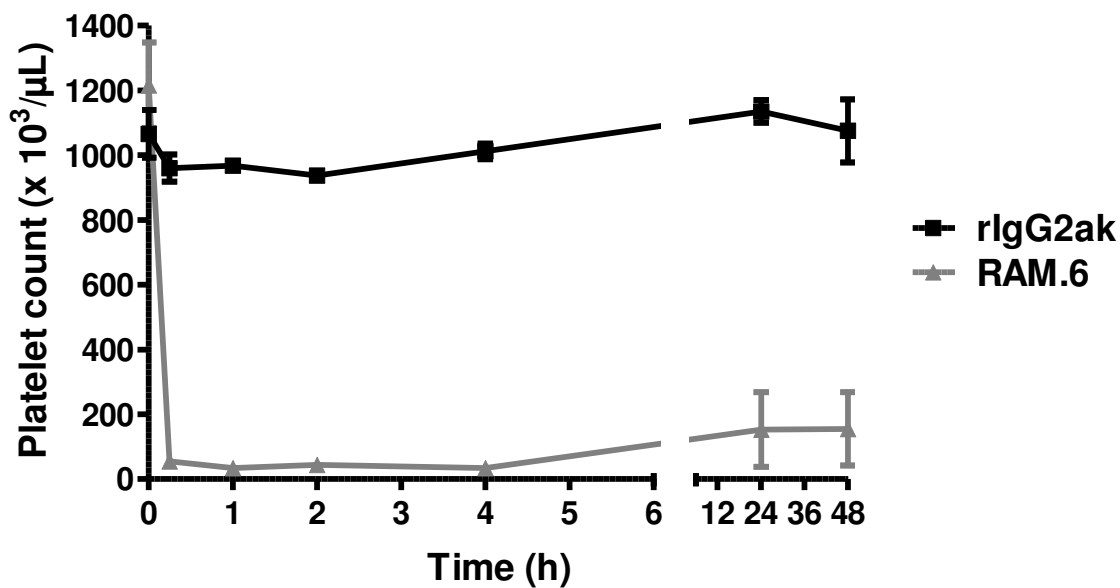
B BALB/c mice



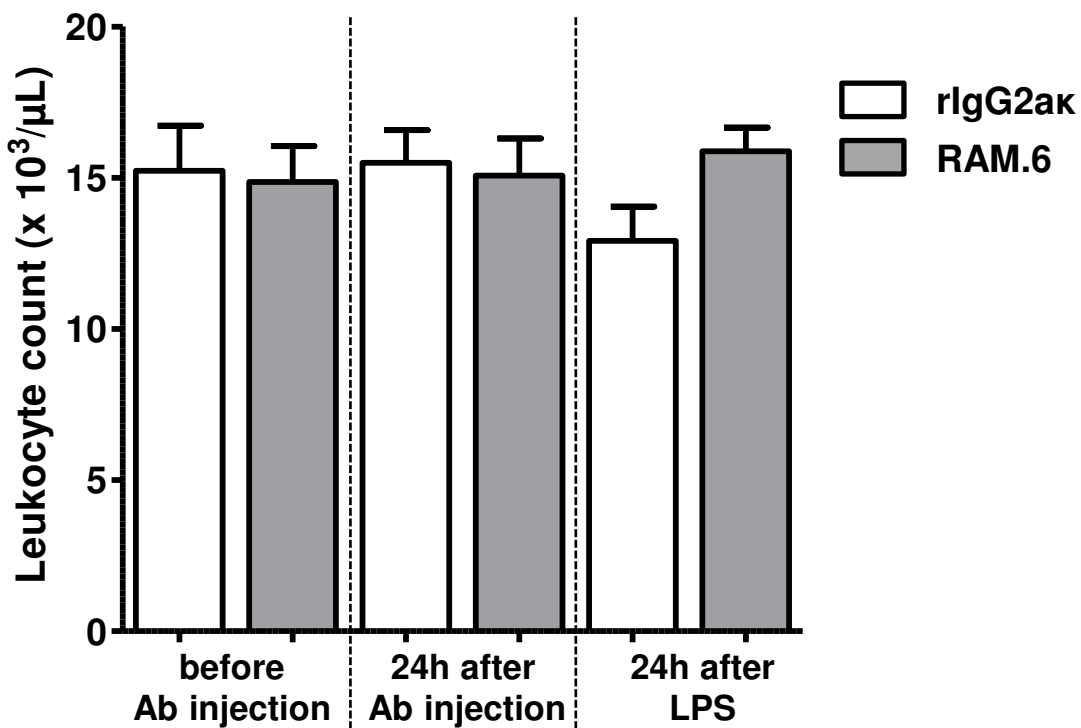
Supplemental Figure S2



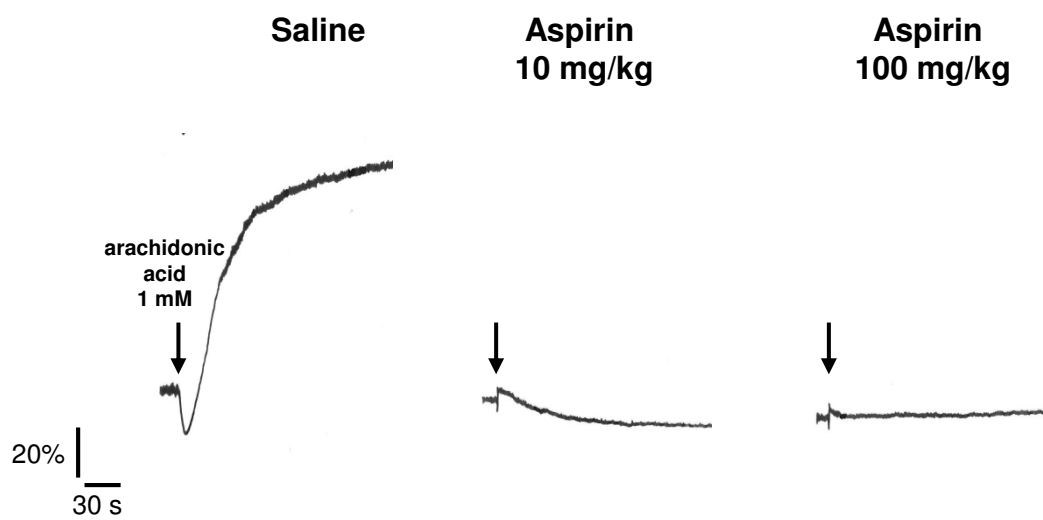
A



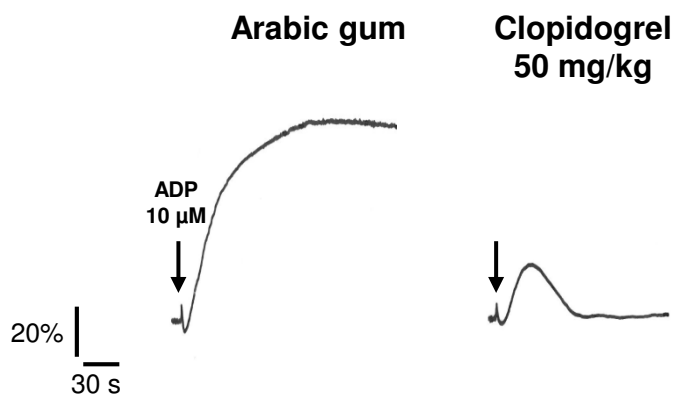
B



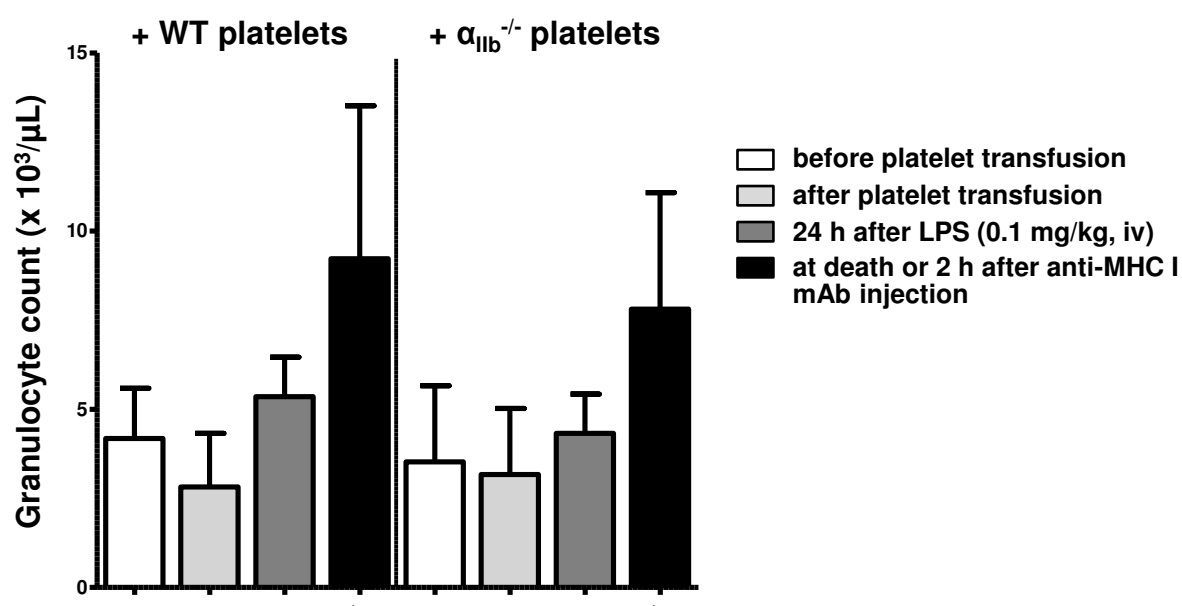
A



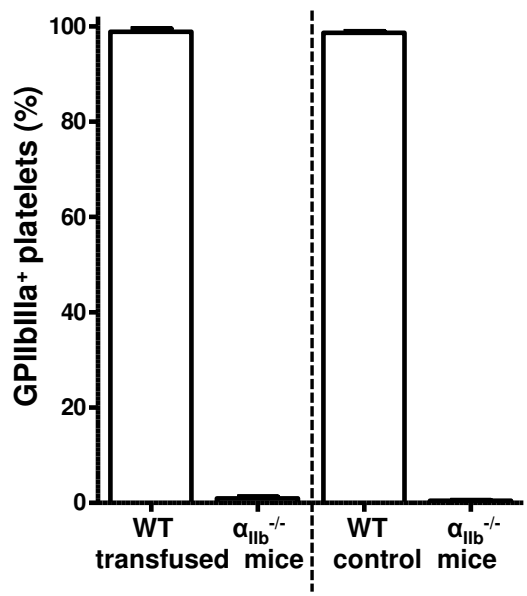
B



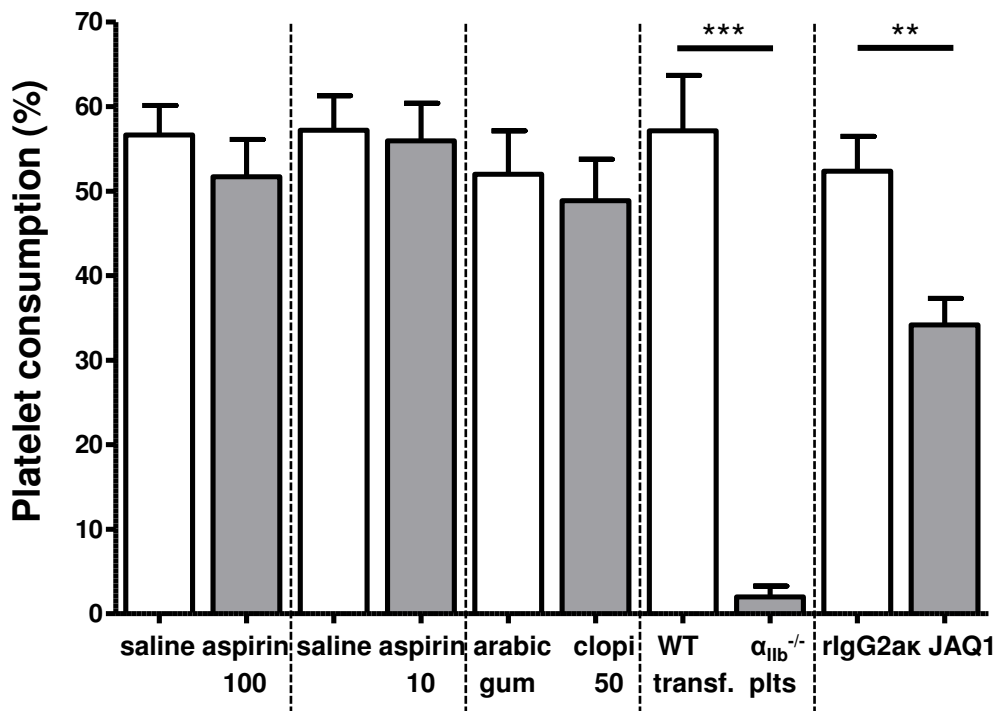
A



B



Supplemental Figure S6



II) DISCUSSION

Le rôle des plaquettes dans le TRALI est controversé, une première explication est que les études menées diffèrent souvent explicitement au niveau des conditions expérimentales (modèles à un événement/deux événements et quantité d'anticorps pour provoquer un TRALI). En outre, la fonction plaquettaire n'est pas toujours la seule cible des outils utilisés pour son évaluation, comme c'est le cas de l'aspirine à forte dose ou l'utilisation des sérums immuns pour les déplétions. Il peut exister par ailleurs des différences au niveau des paramètres non explicites. Ainsi Thomas et al. avec le modèle à deux événements utilisant 1 mg/kg d'anticorps 34-1-2S sur 2 h d'expérimentation, indiquent que toutes les souris survivent ; alors que Looney et al. évoquent une mortalité de 60% avec ces conditions et dans nos mains, nous observons 60 % de mortalité avec deux fois moins d'anticorps (0.5 mg/kg).

Nos observations montrent que l'induction du TRALI ne semble pas être perturbée par une thrombopénie, qu'elle soit périphérique, provoquée par un anticorps spécifique antiplaquettaire, ou qu'elle soit centrale, après élimination des mégacaryocytes (précurseurs des plaquettes). Ces deux méthodes de thrombopénies diffèrent par leur sévérité, la première entraînant une thrombopénie sévère ($< 50\,000$ plaquettes/ μL), la seconde entraînant une thrombopénie modérée le jour de l'injection du LPS ($< 100\,000$ plaquettes/ μL), et très sévère le jour du TRALI ($< 10\,000$ plaquettes/ μL), présentant donc, un risque de saignement spontané. Néanmoins, dans la pratique, la mortalité s'est avérée marginale, et donc, le risque d'hémorragies ne s'est pas avéré confondant sur la période d'expérimentation. Les paramètres pathophysiologiques (concentration des protéines dans les liquides bronchoalvéolaires, pO₂ du sang de l'aorte, histologie pulmonaire) observés 10 minutes après l'injection du 34-1-2S, ne sont pas affectés par l'absence des plaquettes ; notablement, aucune hémorragie n'est observée dans les poumons, quelle que soit la numération plaquettaire. Cependant, si la thrombopénie est très sévère, des hémorragies pulmonaires sont observées au temps tardif du protocole de TRALI (2 h après l'anti-CMH I).

D'autre part, lorsque nous ciblons le récepteur P2Y₁₂ (récepteur de l'ADP) avec du clopidogrel, la COX-1 avec de l'aspirine à une dose pharmacologique (10 mg/kg) (enzyme responsable de la génération du thromboxane A₂), les deux à la fois, ou utilisons des plaquettes déficientes pour la GPIIb (et donc pour le récepteur du fibrinogène GPIIb/IIIa), tous importants dans l'hémostase et la thrombose, aucun signe d'hémorragie n'est détecté dans les poumons suite au TRALI. Nos observations sont donc en accord avec l'importance des fonctions non hémostatiques des plaquettes dans la protection de l'intégrité vasculaire (Ho-Tin-Noe et al. 2018). En effet, la réaction d'Arthus inversée entraîne des hémorragies inflammatoires dans des souris thrombopéniques, mais non chez des souris déficientes pour des récepteurs

plaquettaires d'adhésion (GPIIb, β 3 et P-sélectine) (Goerge et al. 2008), tandis que la transfusion des plaquettes déficientes pour les récepteurs pour la thrombine, et traitées avec du clopidogrel et de l'aspirine, corrige les hémorragies observées chez les souris thrombopéniques recevant des LPS par voie intranasale (Boulaftali et al. 2013).

Cependant, nous observons occasionnellement des hémorragies si l'expression de la glycoprotéine GPVI est bloquée, en accord avec d'autres études qui montrent la participation de la GPVI au maintien de l'intégrité vasculaire dans le modèle d'Arthus inversé ou l'administration du LPS par voie nasale pour induire l'inflammation (Boulaftali et al. 2014) (Gros et al. 2015). Néanmoins, alors que l'inflammation et l'hémorragie qui en résulte, sont provoquées par les neutrophiles en cours d'extravasation dans ces modèles, nous observons non seulement un œdème pulmonaire en absence des neutrophiles (voir résultats de l'article 1), mais aussi en condition de thrombopénie et neutropénie simultanées (Figure II). Dans cette dernière condition, le TRALI est souvent accompagné d'hémorragie intra-alvéolaire, vu la couleur rougeâtre du liquide bronchoalvéolaire récupéré pour le dosage des protéines. Ces observations montrent clairement que les hémorragies au cours du TRALI ne résultent pas de l'extravasation des neutrophiles, et que les mécanismes conduisant à la perte de l'intégrité vasculaire sont donc différents.

Ce travail montre donc que les plaquettes ne sont pas nécessaires pour l'initiation du TRALI immunologique dans le modèle murin, mais qu'elles sont nécessaires pour maintenir l'intégrité vasculaire et empêcher les hémorragies, indépendamment de la présence des neutrophiles. Ces données sont ainsi en défaveur de l'utilisation des traitements antiplaquettaires lors de la survenue du TRALI.

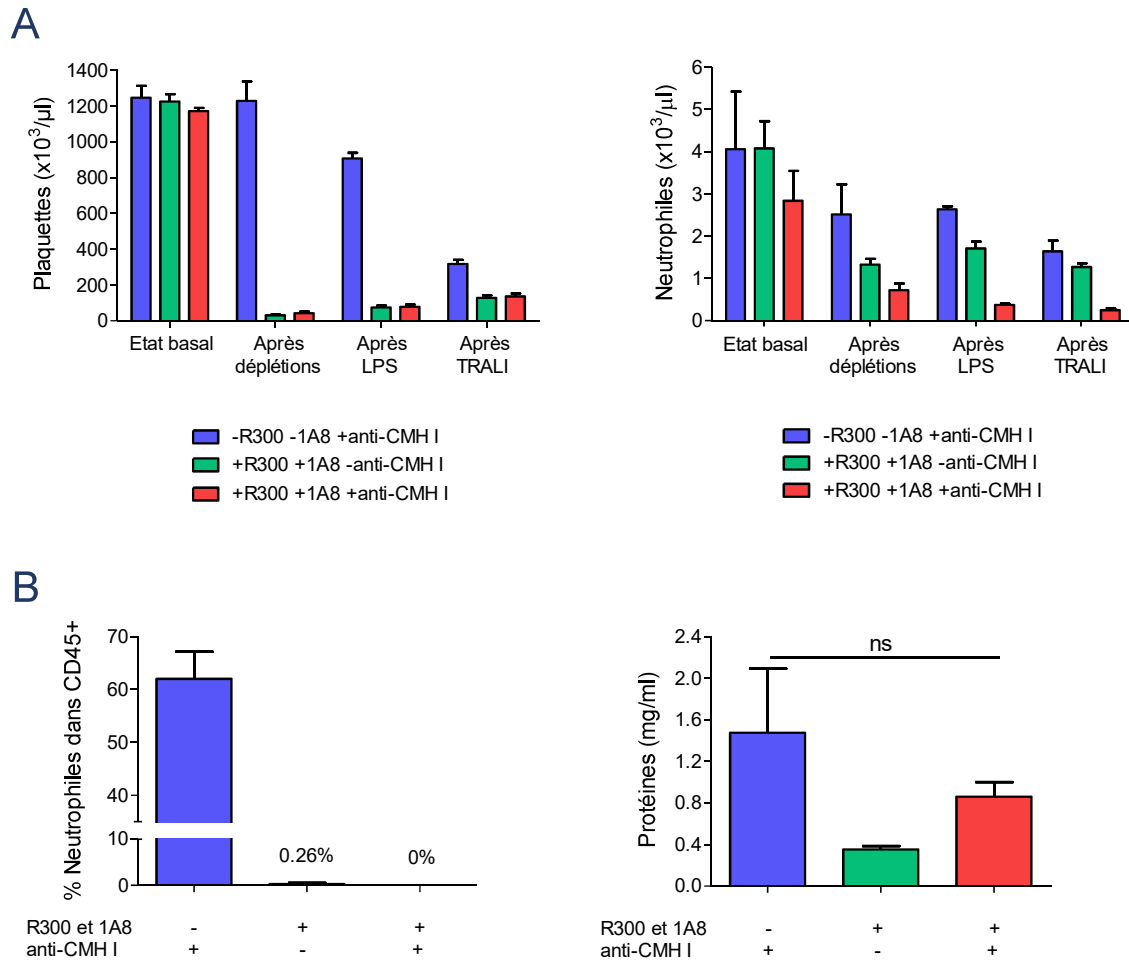


Figure II : Le TRALI a lieu en condition de thrombopénie et neutropénie simultanées

Effet de l'administration des anticorps R300 (0,5 mg/kg) et 1A8 (5 mg/kg), en i.v., 48 h avant l'anti-CMH I, sur la sévérité de l'œdème pulmonaire. (A) Numérations sanguines au compteur des plaquettes (à gauche) et des neutrophiles (à droite). Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM (n=3). (B) À gauche, confirmation par cytométrie de l'absence de neutrophiles dans la circulation, juste avant l'injection de l'anti-CMH I. Les résultats sont exprimés en pourcentages dans les cellules CD45+, et sont présentés en moyenne \pm SEM (n=5). À droite, la concentration des protéines dans les liquides bronchoalvéolaires. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM (n=3, ns, p>0,05). Ces résultats sont représentatifs d'une série de quatre expériences indépendantes.

Partie 3 : Exploration de l'importance du récepteur de faible affinité aux IgGs, le FcγRIIA, dans un nouveau modèle expérimental de TRALI

I) INTRODUCTION

1) Les récepteurs Fcγ (FcγRs)

Les cellules du système immunitaire expriment une variété de récepteurs qui reconnaissent la partie constante (Fc) des immunoglobulines G (IgGs), ce sont les récepteurs Fcγ (FcγRs). Ces récepteurs fixent des IgGs monomériques (récepteurs de haute affinité) ou agrégées, des complexes immuns (antigènes/anticorps) et des cellules opsonisées (ou des particules et des surfaces recouvertes d'IgGs) (récepteurs de faible affinité) (Gillis et al. 2014).

Les cellules humaines expriment six FcγRs classiques : FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB, et les cellules murines en expriment quatre : FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII et FcγRIV (Rosales 2017).

Les tableaux III-1 et III-2 récapitulent les gènes, la fonction et l'affinité correspondant à ces FcγRs, respectivement chez l'Homme et la souris (adapté de (Bruhns 2012) (Gillis et al. 2014)).

Tableau III-1 : FcγR humains (adapté de (Gillis et al. 2014))						
Nom du récepteur	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB
CD	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A	CD16B
Gène	<i>FCGR1A</i>	<i>FCGR2A</i>	<i>FCGR2B</i>	<i>FCGR2C</i>	<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>
Fonction	ACT	ACT	INH	ACT	ACT	ACT?
Affinité aux IgGs	Forte	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible

CD, Cluster de différenciation ; ACT, activateur ; INH, inhibiteur ;
? mécanisme inconnu à présent.

Tableau III-2 : FcγR murins (adapté de (Bruhns 2012))				
Nom du récepteur	FcγRI	FcγRIIB	FcγRIII	FcγRIV
CD	CD64	CD32B	CD16	CD16-2
Gène	<i>FCGR1</i>	<i>FCGR2B</i>	<i>FCGR3</i>	<i>FCGR4</i>
Fonction	ACT	INH	ACT	ACT
Affinité aux IgG	Faible et Forte	Faible	Faible	Forte

CD, Cluster de différenciation ; ACT, activateur ; INH, inhibiteur

Chaque type de cellules immunitaires expriment une combinaison particulière de ces récepteurs; elles sont récapitulées dans les tableaux III-3 et III-4, respectivement pour les cellules humaines et murines.

Tableau III-3 : Expression des FcγR humains (adapté de (Gillis et al. 2014))						
Nom du récepteur	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB
Cellules B	-	-	+	-	-	-
Cellules T	-	-	-	-	-	-
Cellules NK	-	-	+	+	+	-
Monocytes/ macrophages	+	+	+/-	+	+ ^f	-
Neutrophiles	(+)	+	+/-	+	-	+
Cellules dendritiques	+	+	+	-	-	-
Basophiles	-	+	+	-	+ ^f	+/-
Mastocytes	(+)	+	-	-	+ ^f	-
Éosinophiles	-	+	-	-	-	-
Endothélium	-	-	-	-	-	-

+, exprimé ; -, non exprimé ; +/-, exprimé par une/des sous-populations ;

+^f, expression faible ; (+) expression inductible.

**Tableau III-4 : Expression des FcγR murins
(adapté de (Bruhns 2012))**

Nom du récepteur	FcγRI	FcγRIIB	FcγRIII	FcγRIV
Cellules B	-	+	-	-
Cellules T	-	-	-	-
Cellules NK	-	-	+	-
Monocytes/ macrophages	+/-	+	+	+
Neutrophiles	-	+	+	+
Cellules dendritiques	+/-	+	+	-
Basophiles	-	+	+	-
Mastocytes	-	+	+	-
Éosinophiles	-	+	+	-
Endothélium	-	-	-	-

+, exprimé ; -, non exprimé ; +/-, exprimé par une/des sous-populations.

Les récepteurs activateurs humains FcγRIIA et FcγRIIC contiennent un motif d'activation ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) et peuvent donc transduire un signal par eux-mêmes ; ce motif est absent sur les autres FcγRs activateurs, mais il est présent sur une même chaîne qui leur est associée, la chaîne γ, codée par le gène *FCER1G*. En plus de sa fonction dans la transduction du signal, la chaîne γ est nécessaire pour l'assemblage et le transport de ces derniers récepteurs, permettant leur expression à la membrane plasmique (Nimmerjahn and Ravetch 2008).

2) Le récepteur FcγRIIA : définition, structure et signalisation

Parmi ces récepteurs Fcγ, le FcγRIIA (ou CD32A) est un récepteur activateur de faible affinité pour les IgGs monomériques, mais qui a une forte avidité pour les complexes immuns contenant des IgGs (Karas et al. 1982). Il est exprimé par toutes les cellules myéloïdes, en particulier les neutrophiles, les monocytes/macrophages, et les cellules dendritiques, mais pas par les lymphocytes. Ce récepteur mérite l'attention dans le cadre de cette thèse car, d'une

part, il est le seul récepteur Fcγ exprimé par les plaquettes humaines et d'autre part, son expression est restreinte aux primates supérieurs, le génome murin ne comprenant pas le gène codant pour le FcγRIIA (*FCGR2A*), (Rosenfeld et al. 1985) (Daeron 1997).

Le FcγRIIA est une glycoprotéine transmembranaire de type I d'environ 40 kDa. Sa partie extracellulaire où se fixent les IgGs est formée de deux domaines Ig-like ; les anticorps se fixent sur le deuxième domaine (Maxwell et al. 1999). La partie cytoplasmique contient le motif ITAM avec deux tyrosines susceptibles d'être phosphorylées (Figure III-1), permettant ainsi la transduction du signal d'activation (Hibbs et al. 1988) (Maxwell et al. 1999).

L'importance du second domaine Ig-like dans la fixation des IgGs est illustrée par un polymorphisme fréquent au niveau de l'exon 4 qui modifie l'affinité du récepteur pour les différentes IgGs, selon leurs sous-classes. Il s'agit d'une transition A→G qui entraîne le remplacement de l'histidine 131 par une arginine (H131R). Le FcγRIIA-H131 a une affinité cinq fois supérieure pour les IgG2 humaines par rapport au FcγRIIA-R131 (Bruhns 2012), et inversement, une plus faible affinité pour les IgG1 murines (Warmerdam et al. 1991).

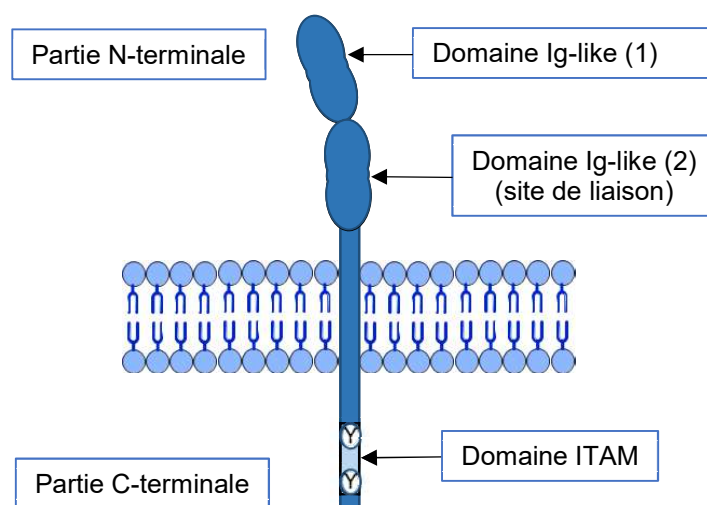


Figure III-1 : Structure du récepteur humain FcγRIIA
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

La signalisation du FcγRIIA ressemble à celle de la voie classique d'activation par un motif ITAM. Brièvement, après sa réticulation (crosslinking) par des complexes immuns, les tyrosines du motif ITAM sont phosphorylées par des protéines kinases de la famille des Src (Sarcoma tyrosine kinase) telles Fyn, Lck, et Lyn. Cette phosphorylation permet le recrutement des kinases de la famille des Syk (Spleen tyrosine kinase), suivi de l'activation de plusieurs molécules en aval telles que la protéine de liaison pour l'activation des cellules T (LAT, Linker

for Activation of T-cells), des complexes multimoléculaires adaptateurs, et la phosphoinositide 3-kinase qui permet la génération du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. Ce phospholipide forme un site d'ancrage pour la tyrosine kinase de Bruton, impliquée dans l'activation des enzymes nécessaires pour la réorganisation du cytosquelette, et pour la phospholipase C γ qui, à son tour, génère le diacylglycérol DAG et l'inositol triphosphate IP $_3$. Le DAG active la protéine kinase C, importante pour l'activation des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein), ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) et p38, responsables de l'induction de la phagocytose et la biosynthèse des cytokines pro-inflammatoires. L'IP $_3$ induit la libération du calcium intracellulaire qui régule le transport de différentes protéines conduisant à l'activation des facteurs nucléaires, et par la suite, l'expression des cytokines importantes pour l'inflammation. Des voies d'activation indépendantes du calcium existent aussi et impliquent la voie MAP/ERK kinases conduisant d'ailleurs à la production des cytokines inflammatoires (Nimmerjahn and Ravetch 2008) (Rosales 2017). C'est ainsi que le récepteur Fc γ RIIA participe activement à la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires en fonction du type cellulaire qui l'exprime.

3) Le récepteur Fc γ RIIA dans la thrombose, l'immunité et l'inflammation

Le rôle du Fc γ RIIA est bien établi dans l'activation des plaquettes et la participation à leur clairance dans les thrombopénies immunitaires dépendantes des complexes immuns surtout celles induites par l'héparine (Kelton et al. 1988). Mais, les plaquettes murines n'exprimant pas de récepteurs Fc γ R, ces études restent limitées à des conditions expérimentales *in vitro* utilisant des plaquettes humaines et des anticorps commerciaux ou provenant de patients. Des souris transgéniques exprimant le CD32A humain (forme R131) ont été obtenues il y a près de 20 ans afin de comprendre le rôle de ce dernier dans ces maladies, en se rapprochant du contexte humain de la pathologie (McKenzie et al. 1999). Le profil d'expression du récepteur, dans cette lignée de souris, reproduit celle de son expression chez l'Homme avec environ 1 600 sites par plaquettes et 65 000 sites sur les macrophages, équivalent au niveau d'expression sur les plaquettes et macrophages humains. *In vitro*, comme pour les plaquettes humaines, sa réticulation avec un anticorps anti-CD32A et un anticorps secondaire provoque l'agrégation des plaquettes (McKenzie et al. 1999). *In vivo*, le CD32A transgénique joue un rôle clé dans la clairance des plaquettes suite à l'injection d'anticorps antiplaquettaires. En effet, l'injection de l'anticorps antiplaquettaire 4A5 (anti-GPV) entraîne une thrombopénie sévère (< 100 000 plaquettes/ μ L) chez les souris transgéniques alors qu'une thrombopénie modérée est observée chez les souris de type sauvage (600 000 plaquettes/ μ L). À noter que

cet anticorps n'active pas les plaquettes *in vitro* (Burstein et al. 1992) y compris celles CD32A⁺ (McKenzie et al. 1999). Le rôle du transgène dans la clairance est confirmé par l'observation que l'anticorps 4A5 induit une thrombopénie de même sévérité chez les souris transgéniques et déficientes pour la chaîne γ , donc n'exerçant pas de signalisation via les autres Fc γ R endogènes (McKenzie et al. 1999). Par la suite, cette même équipe a montré que l'injection d'un anticorps anti-CD9 dans les souris transgéniques provoque, en plus d'une thrombocytopénie sévère, un état de choc illustré par une respiration peu profonde, une pâleur des extrémités et des oreilles, une hypothermie et une diminution de l'activité locomotrice. Ce choc est fatal pour la quasi-totalité des souris (16/18) qui, suite à l'analyse histologique des organes (cerveau, reins, foie, rate, cœur et poumons), présentent des thrombi dans la circulation pulmonaire, avec une accumulation d'agrégats cellulaires et un dépôt de fibrine. Les souris sauvages ne présentent par contre qu'une thrombopénie modérée. L'expression du CD32A est donc nécessaire pour la thrombose et l'état de choc provoqué par l'anti-CD9 (Taylor et al. 2000). Enfin, ce modèle a permis de confirmer, *in vivo*, les résultats obtenus auparavant *in vitro* sur l'importance du CD32A plaquettaire dans les thrombopénies induites par l'héparine (Reilly et al. 2001).

Indépendamment de sa fonction de récepteur de faible affinité aux IgGs, le CD32A peut aussi amplifier les signaux d'activation relayés par le complexe GPIIb/IIIa plaquettaire. En effet, *in vitro*, les anticorps bloquant anti-CD32A inhibent l'étalement et l'activation des plaquettes humaines sur du fibrinogène immobilisé (agoniste du GPIIb/IIIa) (Boylan et al. 2008). Ces propriétés ont des répercussions dans la thrombose expérimentale *in vivo* : la présence du CD32A accroît la formation de thrombi dans les artérioles (modèle de lésion induite au laser au niveau du crémaster) et les veines (modèle électrolytique au niveau de la veine fémorale) (Zhi et al. 2013). Par ailleurs, un rôle anticorps-indépendant dans l'activation des plaquettes via le CD32A est observé en présence de bactéries : les plaquettes adhèrent par l'intermédiaire de la glycoprotéine GPIIb/IIIa aux bactéries *Streptococcus gordonii* immobilisées, et par la suite s'étalent, s'activent et libèrent le contenu de leurs granules. Le blocage du CD32A n'interfère pas avec l'adhésion des plaquettes, mais les réactions qui s'en suivent sont inhibées. L'étalement des plaquettes humaines sur les bactéries induit la phosphorylation du motif ITAM, et des molécules en aval de sa signalisation (Syk et PLC γ 2), confirmant la participation du CD32A à l'activation (Keane et al. 2010a). En accord, ces plaquettes agrègent en présence de *Streptococcus pneumoniae*, alors que leur pré-incubation avec l'anticorps bloquant anti-CD32A (IV.3), inhibe cette agrégation (Keane et al. 2010b).

Le transgène CD32A a aussi été introduit dans des souris déficientes pour différentes combinaisons de Fc γ R endogènes afin d'évaluer sa contribution dans différentes pathologies inflammatoires et immunitaires, qui ne se limitent pas à son rôle sur les plaquettes. Ainsi, le

CD32A joue un rôle important dans la pathogenèse (i) de l'arthrite, en favorisant l'activation des leucocytes inflammatoires et donc l'inflammation et les lésions tissulaires (Van de Velde et al. 2010), (ii) de la glomérulonéphrite, (iii) de la réaction passive inverse d'Arthus et la réponse contre les complexes immuns solubles en augmentant le recrutement et l'activation des neutrophiles aux sites de l'inflammation (Tsuboi et al. 2008), (iv) des infections bactériennes et virales suite à l'engagement des plaquettes avec les molécules opsonisées (Arman and Krauel 2015) (Boilard et al. 2014), (v) de l'anaphylaxie et des réactions allergiques, par le recrutement et l'activation des mastocytes, des monocytes/macrophages et des neutrophiles qui produisent des médiateurs anaphylactogéniques (PAF, leucotriènes B₄ et C₄) et inflammatoires (KC, MIP-1 α) (Jonsson et al. 2012) ; et plus récemment, cette même équipe a montré que l'activation des plaquettes suivie par la libération de la sérotonine participe à l'induction d'un choc anaphylactique dans les souris transgéniques (Beutier et al. 2018). Des résultats similaires sont obtenus par une 2^{ème} équipe qui montre que le CD32A joue un rôle dans la pathogenèse des maladies immunitaires induites par des complexes immuns, et ceci via l'activation du CD32A sur les plaquettes et la sécrétion subséquente de sérotonine (Cloutier et al. 2018).

4) Un rôle du Fc γ RIIA dans le TRALI?

Selon les conditions expérimentales et/ou les équipes, les plaquettes, les neutrophiles ou les monocytes/macrophages jouent un rôle actif dans le TRALI immunologique expérimental chez la souris. Bien que ces observations divergent entre les équipes, souvent de façon inexplicée, il est légitime de se demander si la présence d'un CD32A transgénique peut exacerber l'activation de ces cellules, et par conséquent la pathophysiologie du TRALI. Des expériences *in vitro* avec des neutrophiles humains suggèrent un rôle actif du CD32A au cours d'un TRALI provoqué par des anticorps anti-HNA-3a (Thomas et al. 2012). Cette étude révèle d'une part le rôle pathogénique des NETs au cours du TRALI immunologique chez la souris (voir introduction générale X-1), et d'autre part montre qu' *in vitro*, les anticorps anti-HNA-3a induisent la production des NETs, par les neutrophiles stimulés, de façon dépendante du Fc γ RIIA. En effet, l'incubation des neutrophiles avec un anticorps bloquant spécifique anti-CD32A (IV.3), avant d'ajouter les anticorps anti-HNA-3a, inhibe la formation de ces NETs (Thomas et al. 2012).

En plus de cette activation mettant en jeu uniquement les neutrophiles, des mécanismes entre les cellules endothéliales recouvertes avec des anticorps anti-CMH I, ou anti-HNA-3a, et des plaquettes CD32A⁺ sont envisageables. En effet, l'adsorption d'autoanticorps sur les cellules

endothéliales stimule l'adhésion et l'activation des neutrophiles sur ces dernières, via le récepteur FcγRIIA (Florey et al. 2007). Par analogie, nous pouvons proposer que l'opsonisation des cellules endothéliales avec des anticorps anti-CMH I stimule l'adhésion et l'activation d'autres cellules CD32A⁺, en particulier les plaquettes. Les plaquettes étant recrutées dès les premières minutes du TRALI chez la souris, nous pouvons donc nous demander si l'expression du CD32A peut amplifier les processus d'activation cellulaire, ou en rendre possible d'autres, aussi bien dans les plaquettes que dans les cellules endothéliales avec lesquelles elles sont susceptibles d'interagir. Un questionnement analogue peut aussi être proposé en ce qui concerne les monocytes/macrophages. Ces processus peuvent ainsi participer à l'activation des cellules endothéliales et favoriser la rupture de la barrière endothéliale.

Les modèles murins utilisés jusqu'à présent ne permettent pas l'évaluation de la contribution du CD32A puisque le génome murin ne comprend pas de gène orthologue au *FCGR2A*, ou d'équivalent. Nous avons donc décidé d'étudier la pathogénèse du TRALI dans des souris transgéniques pour le CD32A, ce qui permettra aussi de revisiter le rôle des différentes cellules qui l'expriment dans un contexte *à priori* plus proche de la physiopathologie humaine. Pour ces études, les souris transgéniques en fond génétique C57BL/6J (H-2^b) ont été croisées avec des souris BALB/c (H-2^d), et les expériences effectuées en utilisant les souris hémizygotés pour l'expression du CD32A, issues de la génération F1 de ce croisement (Figure III-2).

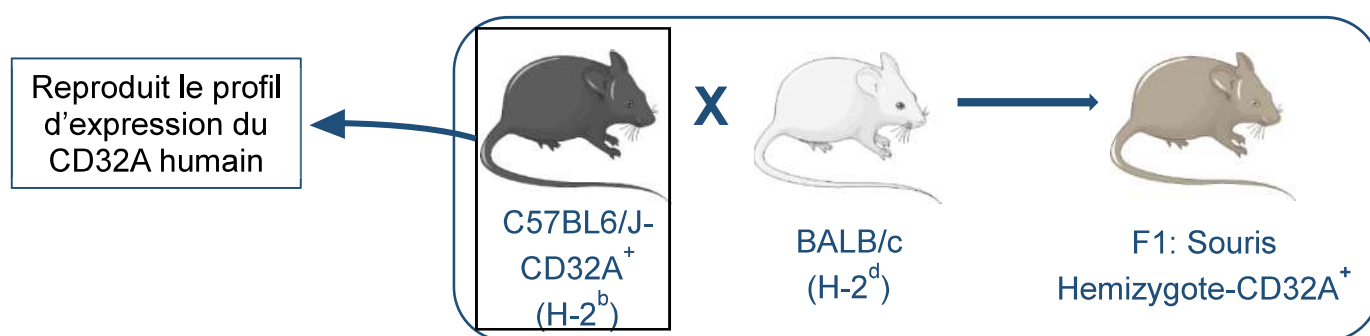


Figure III-2 : Souris humanisées pour l'expression du CD32A utilisées pour le TRALI

Article (3) en préparation : L'expression du CD32A humain chez la souris détermine la sévérité du TRALI immunologique.

Article en préparation

Title: Expression of human IgG receptor FcγRIIA/CD32A in mice determines the severity of immunological TRALI

Authors: Marie-Belle EL MDAWAR¹ et al.

Attributions: ¹ Université de Strasbourg, INSERM, Etablissement Français du Sang (EFS) Grand Est, BPPS UMR_S 1255, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), F-67000 Strasbourg, France. ² Institut Pasteur, Department of Immunology, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Paris, France; ³ INSERM U1222, Paris, France.

Correspondence: Henri de la Salle, UMR_S 1255 INSERM, Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang - Grand Est, 10 rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France. Tel.: +33 3 88 21 25 25; fax: +33 3 88 21 25 21. E-mail: henri.delasalle@efs.sante.fr.

Abstract

Immunological transfusion-related acute lung injury (TRALI) is provoked by the transfusion of blood products containing allogeneic antibodies targeting cells from the recipient. To better assess the biological features of the interactions between IgGs and FcγRs during TRALI induced by anti-MHC class I antibodies, we developed a model in mice expressing the human FcγRIIA/CD32A, an activating receptor with no corresponding murine orthologue. TRALI was evaluated, using a two-hit model – by lipopolysaccharide priming followed by injection of an anti-MHC I monoclonal antibody (clone 34-1-2S, mouse IgG2a, anti-H-2D^d/K^d)–, or a one-hit model – by injection of a higher dose of the anti-MHC I antibody. In both models, TRALI responses at early (10 min) and later time point (2 h) were similar in mice expressing or not the human CD32A transgene in terms of, lung edema, survival rate and platelet consumption, although a small increase of PF4 was noticed in the plasma of CD32A⁺ animals. In the search for a more biologically relevant CD32A ligand, we developed and tested a recombinant chimeric form of 34-1-2S, comprising the Fc part of human IgG1 and the variable regions of 34-1-2S monoclonal antibody. At the 10 min time point, TRALI responses induced by this chimeric antibody were more severe in CD32A⁺ mice than CD32A⁻ ones in terms of lung edema, neutrophil activation and thrombocytopenia. Platelet activation was stronger in CD32A⁺ mice, as revealed by the increased plasma concentrations of platelet PF4 and serotonin, and was accompanied with increased thrombin generation. Our findings identify CD32A as critical determinant of the severity of immunological TRALI. This CD32A-dependent animal model opens the opportunity to explore the features of CD32A-mediated responses of platelets and immunological cells during TRALI.

Keywords: Transfusion-related acute lung injury; platelets; hCD32A receptor; lung edema.

Introduction

Transfusion-related acute lung injury (TRALI) is a syndrome characterized by the development of a non-cardiogenic pulmonary edema, which may occur within 6 hours following a blood transfusion, in the absence of any pre-existing acute lung injury. Although very rare, TRALI significantly contributes to the morbidity of transfusion, or can even be fatal [1]. Immunological TRALI results from the presence of alloantibodies specific for polymorphic HLA/MHC class I or class II molecules or for neutrophil antigens in the transfused product, the two later being the major causes of mortality of this syndrome. Based on their *in situ* detection in the lungs of patients who died from TRALI, platelets and neutrophils have been proposed to participate to the pathogenesis of TRALI [2]. To analyze the mechanisms of immunological TRALI, several models based on the use of the anti-H2D^d/K^d MHC class I monoclonal antibody (mAb) 34-1-2S, a mouse IgG2a, have been set up in the mouse. In a first model, inflammation is induced in animals by administrating a low dose of lipopolysaccharides (LPS, 0.1 mg/kg), 24 h later, the animals receive the antibody (0.5 mg/kg) [3]. In other models, the animals are not sensitized, but at least ten fold higher amounts of the antibody need to be injected intravenously to induce TRALI [4, 5]. These models allowed to assess the contribution of complement, platelets, neutrophils, monocytes/macrophages and T cells [3-8]. Nevertheless, the positive contributions of neutrophils and platelets and whether their involvement is required [3] or not [4, 8] are debated. Furthermore, depending on studies, the receptors for the Fc part of IgGs (FcγR) are major [7] or accessory [4] mediators of TRALI.

There is a strong need to improve current mouse models to better reflect the human pathogenesis. With respect to the immunological mechanisms of TRALI, one challenge is to better assess the biological features of the interactions between IgGs and FcγRs. Previous investigations indicate that FcγRs could control TRALI development in mouse models [7, 9]. Among FcγR⁺ cells, monocytes/macrophages and/or neutrophils have been described to be essential in TRALI pathogenesis [7, 9, 10] however, in our experimental conditions, monocytes/macrophages but not neutrophils are required (article Submitted). With respect to

the repertoire of Fc γ Rs, one major feature is the absence in the mouse genome, but the presence in man one (and primate ones), of the *CD32A* gene, which encodes an activating low affinity receptor for IgGs (also named Fc γ RIIA) [11]. Moreover, mouse platelets do not express any Fc γ R, whereas human ones express CD32A. Thus, immune complexes and IgG-opsonized cells activate human platelets in a CD32A-dependent manner. Furthermore experiments in CD32A⁺ transgenic animals have indicated that these events participate not only to protective immune responses [12], but also to pathological ones such as IgG-mediated anaphylaxis [13, 14]. Since in autoimmune diseases, anti-endothelial IgG can mediate the adhesion of human leukocytes to activated endothelial cells in a CD32A-dependent manner [15], we hypothesized that anti-HLA/MHC I antibodies adsorbed on vascular endothelial cells could also mediate the adhesion of CD32A⁺ neutrophils and platelets, induce their activation, thus leading to additional pathological cellular responses. IgG-mediated anaphylaxis in CD32A⁺ animals support this hypothesis: in CD32A⁺ transgenic mice, this condition results in the release of high amount of serotonin from activated platelets, which participates to the disruption of vascular integrity [13, 16]. Thus, the CD32A receptor expressed by platelets and immune cells could modulate the development of human TRALI, a mechanism that cannot be assessed with wild type mice.

The aim of this study was to evaluate the involvement of CD32A in TRALI pathophysiology using a transgenic mouse model.

Materials and Methods

Reagents

Lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli*, 055:B5, L28-80), xylazine (Rompun) and ketamine (Imalgene 1,000) were from Sigma-Aldrich, Bayer and Merial, respectively. The hybridoma 34-1-2S (anti-H-2K^d/H-2D^d, IgG_{2a,k}) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, HB-79). The monoclonal antibody (mAb) was purified from culture supernatants using protein G sepharose affinity chromatography and its purity was confirmed by SDS-PAGE. The PE-labeled anti-CD45 (clone 30-F11) was from Biolegend, A647-labeled goat anti-mouse IgG (H+L) from Invitrogen, and Cy5-labeled donkey anti-human IgG (H+L) from Jackson ImmunoResearch.

Mice

Transgenic mice expressing the human CD32A receptor (C57BL/6, H-2^b) [17] were kindly provided by P. Bruhns (Institut Pasteur, France) and bred in our animal facilities. These animals were crossed with Balb/cByJ mice (H-2^d) (JAXTM, Charles River) and TRALI experiments were performed with 6-8 week-old males from the F1 progeny. The presence of the hCD32A transgene was assessed by PCR analysis of genomic DNA using the following primers: 5'-CAATTTTGCTGCTATGGGC-3', 5'-CTGGTCAAGGTCACATTCTTC-3'. Mice were housed in the animal facilities of the EFS-Grand Est (agreement no. E67-482-10). Experiments were approved by the Regional Committee for Ethics in Animal Experimentation of Strasbourg (CREMEAS, CEEA-35) and authorized by the French Ministry of Research, according to the regulations of the European Community (APAFIS#1722-2015091310558584).

Recombinant humanized 34-1-2S mAb (human IgG1 isoform, hlgG1-34-1-2s)

The 34-1-2S mAb was expressed as a human IgG1 Fc-mouse variable region chimera. RNA from HB-79 hybridoma was reversed transcribed and the cDNAs encoding the variable regions of heavy and light chains of the 34-1-2S mAb were amplified by PCR [18]. The amplified

fragments were inserted into two pUC19-based vectors expressing either the human IgG1 heavy chain cDNA or the light chain κ cDNA, respectively, generously provided by H. Mouquet [19]. Both plasmids were transiently co-transfected in 293F cells using FectoPRO (Polyplus-transfection) and cultured for 6 days in Freestyle 293 culture medium (Invitrogen), then the recombinant antibody was purified by adsorption onto protein G sepharose.

Experimental models of TRALI

Two experimental murine models of TRALI were used [3, 4]. In a first two-hit model, mice were primed with an intraperitoneal injection of LPS (0.1 mg/kg body weight) and 24 h later, anesthetized with xylazine (20 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). TRALI was induced by retro-orbital injection of the mAb 34-1-2S (0.6 mg/kg). The hIgG1-34-1-2s recombinant mAb was tested in this two-hit model at a dose of 1 mg/kg. In a second one-hit model, unprimed anesthetized animals received one retro-orbital injection of 34-1-2S (5 mg/kg). Negative control animals received either an irrelevant isotype-matched mAb (mIgG2a κ , clone MOPC-173) or saline. During TRALI, the mice were maintained on a 37°C warming plate and, depending on the experiment, were sacrificed either 10 min or 2 h after administration of the mAb.

Assessment of airway responsiveness

A FlexiVent system (SCIREQ Technologies, Canada) was used to measure the lung elastance (Ers) during TRALI. Briefly, mice were anesthetized i.p. with xylazine (30 mg/kg) and ketamine (150 mg/kg) and tracheotomized. An 18-gauge needle was inserted into the trachea and connected to a FlexiVent computer-controlled small animal ventilator. Stabilization of the baseline values was obtained within 4 min, after which the mAb 34-1-2S (0.6 mg/kg) or its isotype control (mIgG2a κ) was injected into the jugular vein. Respiration parameters were measured using a FlexiVent protocol alternating normal ventilation and snapshot perturbations. At the end of the experiment, the mice were disconnected to ensure that they could still breathe without the help of mechanical ventilation, and then sacrificed.

Protein content of bronchoalveolar lavages (BALs)

The tracheas of sacrificed mice were exposed, cannulated and 1 mL of sterile PBS was injected into the lungs. BALs were recovered and centrifuged at 13,000 g, at 4°C for 5 min. Protein concentrations were measured in the supernatants using a Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions, with bovine serum albumin as standard.

ELISAs

Plasma concentrations of thrombin/anti-thrombin complexes, PF4 and serotonin were determined using commercial kits (Quantikine® ELISA Mouse CXCL4/PF4 from R&D SYSTEMS™, Serotonin ELISA Fast Track from LDN®, Enzygnost® TAT micro from SIEMENS).

Platelet counts

The tails of anesthetized mice were severed, blood was collected into EDTA (6 mM) and platelet counts were determined using a Scil Vet ABC automatic cell counter (Scil Animal Care Company) set to murine parameters.

Histology and immunohistochemistry

The lungs of sacrificed mice were removed, fixed in 4% paraformaldehyde overnight and then washed with PBS and maintained in 10% and then 20% sucrose baths for one day each, before being snap-frozen in optimal cutting temperature (OCT) embedding medium. Sections (8 µm thick) were stained with hematoxylin and eosin for histological examination. Recruitment of platelets to the lungs was assessed on sections stained with an anti-mouse GPIIb/IIIa mAb (RAM1 produced in our laboratory), followed by goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch) conjugated to horseradish peroxidase and revealed with diaminobenzidine. Platelet infiltration was quantified using Image J software (National Institute of Health) on images acquired with a Leica DMLB microscope. At least five different areas were analyzed on each lung section.

Platelet static adhesion assays

Glass coverslips were coated for 2 h with mouse or chimeric anti-H-2^d or negative control IgGs (10 µg/mL), then the surface was blocked with PBS-1% human serum albumin for 1 h. Washed mouse platelets, expressing or not CD32A⁺, in Tyrode's buffer (138 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO₃, 0.4 mmol/L NaH₂PO₄, 1 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L Hepes, 3.5 mg/mL HSA, 5.5 mmol/L glucose, pH 7.3), supplemented with 0.35% human serum albumin were allowed to adhere on coated coverslips (1 x 10⁷ platelets/coverslip) at 37°C. After 60 min, non-adherent platelets were washed out, remaining platelets were fixed with 4% PFA, stained with TRITC-phalloidin (2 µg/mL) and viewed by epifluorescence microscopy. Micrographs were analyzed and adherent stress fiber positive platelets were counted by two scientists blinded to the experimental conditions.

Flow cytometry analysis

Blood was collected in the presence of hirudin (100 U/mL) from the abdominal aorta of anesthetized mice. FcγR receptors were blocked with FcR blocking reagent (Milteny Biotec) then cells were stained with 34-1-2S or hlgG1-34-1-2S mAb followed by appropriate secondary antibodies and then anti-CD45 antibody. Red blood cells were lysed using an ACK lysis buffer before flow cytometric acquisition using a Fortessa-X20 flow cytometer (BD Biosciences). CD45⁺ leukocytes were analyzed using BD FACSDiva software. MHC I-positive cells were gated using MHC I-unstained cells (fluorescence minus one).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with GraphPad software (GraphPad Prism 5.0). Survival was analyzed using the log-rank test and elastance measurements were analyzed using Student's t-test. All other values are reported as the mean ± standard deviation. Statistical comparisons were calculated using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test.

Results

Mouse IgG2a 34-1-2S (m34-1-2S) induces similar TRALI in CD32A⁺ and CD32A⁻ mice

Firstly, we analyzed TRALI responses using a two-hit experimental model consisting of the intraperitoneal administration of a small amount of LPS, followed 24 h later by intravenous injection of the mAb 34-1-2S [3]. We have previously demonstrated the importance of investigating early (at 10 minutes) and later (at 2 hours) responses after induction of TRALI, as the early time point explores the initiation of TRALI, while the later one assesses survival, which can be influenced by downstream intercellular events [8]. Preliminary experiments showed that TRALI could be provoked in CD32A⁺ and CD32A⁻ animals, at a 0.6 mg/kg dose of 34-1-2S mAb.

Within minutes of administration of the 34-1-2S mAb, CD32A⁻ and CD32A⁺ mice showed comparable signs of respiratory distress, with deep and irregular breathing indicating TRALI, which was confirmed by measurement of the lung elastance (Figure 1A). At the 10 min time point after anti-MHC I injection, both genotypes developed similar lung alveolar edema, as reflected by the increased protein content of BALs (* $p < 0.05$, 34.1.2S vs control mIgG_{2a}; ns, $p = 0.71$, CD32A⁻ vs CD32A⁺) (Figure 1B, left panel), along with comparable interstitial edema as revealed by histological analyses of lung tissues (Figure 1C). Since TRALI results in platelet consumption, we investigated whether the presence of hCD32A could exacerbate TRALI-associated thrombocytopenia. However, CD32A⁻ and CD32A⁺ animals experienced similar decrease in platelet counts 10 min after anti-MHC I injection (*** $p < 0.001$, 34.1.2S vs control mIgG_{2a}; ns, $p = 0.71$, CD32A⁻ vs CD32A⁺) (Figure 1B, right panel).

We challenged these findings using a one-hit procedure to induce TRALI. In this model, in the absence of LPS-induced priming of the immune system, a higher dose of the anti-MHC I mAb (5 mg/kg) needs to be administered [4]. This exclusively antibody-dependent model increases the possibility of highlighting CD32A-dependent events. However, the protein content of BALs

was similar in CD32A⁻ and CD32A⁺ animals (Figure 1D, left panel) and similar interstitial edema was seen by histology analysis (Supplementary figure A). Nevertheless, platelet consumption was significantly increased in hCD32A⁺ mice as compared to CD32A⁻ mice (***p<0.001, CD32A⁻ vs CD32A⁺) (Figure 1D, right panel). To check for a potential role of CD32A at later stages, we analyzed TRALI parameters at a 2 hours endpoint in the one-hit model. At later stage, TRALI responses were identical in the two groups of mice in terms of the protein content of BALs and platelet consumption (ns, p>0.05, hCD32A⁻ vs hCD32A⁺) (Figure 2A). Additionally, the survival curves were similar between the two genotypes (p=0.8649, log-rank test) (Figure 2B). We also checked whether the CD32A transgene influences platelet activation during TRALI. In the one-hit model, a small increase of plasmatic PF4 concentration was noticed in CD32A⁺ but not in CD32A⁻ after 10 min (78.6 ± 7.5 vs 31.6 ± 9.8 ng/mL after 10 min for CD32A⁺ and CD32A⁻ respectively, **p<0.01) (Figure 3A). Interestingly, this difference was not observed with the two-hit model (Figure 3B) (ns, p>0.05). These results correlate with platelet consumption, which was found to be higher only in CD32A⁺ animals and only in the one-hit procedure (Figure 1D). Finally, neutrophil activation was checked by flow cytometry analysis of CD11b expression. TRALI induced a similar upregulation of CD11b on CD32A⁻ and CD32A⁺ peripheral neutrophils 10 min after antibody injection (Figure 3C).

Thus, in the two-hit as well as in the one hit models of TRALI induced by the mouse IgG2a (m34-1-2S), CD32A expression, in addition to endogenous FcγR, does not aggravate pathological parameters of TRALI at all investigated time points. Only when high doses of mAb were used (5 mg/kg), a minor increase of plasmatic PF4 was noticed in CD32A⁺ animals.

A recombinant chimeric hIgG1-34-1-2S induces a more severe TRALI in CD32A⁺ than in CD32A⁻ animals

In order to set up a model of TRALI allowing evaluation of the contribution of the human antibody Fc portion, we generated a human-mouse chimeric antibody composed of the variable regions of heavy and light chains of mouse mAb 34-1-2S fused to human IgG1 and

kappa chains, respectively, thus named hlgG1-34-12S. This isotype was chosen because, as compared to other human IgG subclasses, it better mimics the *in vitro* biological activities of mouse IgG2a [20], and has the highest affinity for CD32A [21]. We first compared the properties of the original mlgG2a m34-1-2S and the chimeric hlgG1-34-12S. Flow cytometry analysis indicated that the two mAbs similarly stained CD45⁺ leukocytes of BALB/c mice (Figure 4A). The ability of the two mAbs to activate CD32A⁺ platelets was tested using static adhesion assays on glass slides coated with the anti-MHC I mAbs, or their respective matched isotype, or BSA as a negative control (Supplemental figure). In each condition, the percentage of F-actin-positive adherent platelets on surfaces was measured by fluorescence microscopy analysis (Figure 4B). CD32A⁻ and CD32A⁺ platelets remained quiescent on BSA-coated slides (>85% phalloidin-negative). On immobilized anti-MHC antibodies (hybridoma mlgG2a and recombinant hlgG1), the majority of CD32A⁺ platelets developed F-actin filaments whereas most of CD32A⁻ ones remained quiescent. Thus, mouse hybridoma IgG2a and recombinant hlgG1 activate platelets similarly, in a CD32A-dependent manner.

We then compared TRALI responses 10 min after the administration of hlgG1-34-1-2S mAb in LPS-sensitized CD32A⁺ and CD32A⁻ animals. The quantification of the protein content in the BALs indicated that the lung edema was more severe in CD32A⁺ than in CD32A⁻ mice (1.8 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.2 mg/mL for CD32A⁺ and CD32A⁻ respectively, *** $p < 0.001$) (Figure 5A). As anticipated, the negative control hlgG1 induced no detectable responses. TRALI induced thrombocytopenia was significantly more severe in CD32A⁺ animals than in CD32A⁻ ones, suggesting increased platelet activation in the formers (Figure 5B). Accordingly, plasma concentrations of PF4 and serotonin, which are both released during activation-induced platelet degranulation, were dramatically higher in CD32A⁺ than in CD32A⁻ animals (237.8 ± 19 vs 38.5 ± 5 ng/mL and 107.3 ± 15 vs 28.1 ± 5 ng/mL for PF4 and serotonin respectively, *** $p < 0.001$) (Figure 5C, left and middle). Since platelet activation also result in thrombin generation, we measured the plasma concentration of thrombin-antithrombin complexes (TATs). After hlgG1-3-4-1-2S injection, the plasma concentration of these complexes did not increase in CD32A⁻ animals (22 ± 4 vs 47 ± 6.4 ng/mL, before and after antibody injection,

respectively, ns, $p > 0.05$) but was dramatically enhanced in the CD32A⁺ animals (25 ± 3.5 vs 100 ± 11.9 ng/mL, before and after antibody injection, respectively, $***p < 0.001$) (Figure 5C, right).

Neutrophil activation was checked by quantifying the upregulation of CD11b. Flow cytometry analysis indicated an increase in CD11b exposure after TRALI induction, both in CD32A⁻ and CD32A⁺ animals. Interestingly, this upregulation was higher in CD32A⁺ ones (Fig 5D).

Thus, in the two-hit model of TRALI induced by the chimeric hlgG1-34-1-2S, CD32A expression aggravates pathological parameters of TRALI. In CD32A⁺ animals, a 1 mg/kg dose of hlgG1-34-1-2S induced a more severe lung edema, a higher activation of neutrophils and a stronger platelet activation documented by a greater platelet consumption and a higher release of PF4 and serotonin.

Discussion

Immunological TRALI is an antibody-mediated respiratory insufficiency syndrome. Its pathophysiology is mostly investigated in mice receiving anti-MHC class I mouse antibodies. However, differences in IgG receptor expression and their affinity for their antibody ligands render it difficult to transpose data obtained in mice to human. A major immunological difference between human and mouse is the presence of the low affinity IgG receptor, Fc γ RIIA/CD32A, on human platelets. This receptor bears an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) that mediates IgG immune complex-induced platelet activation [12]. CD32A activation pathway on platelets and the subsequent release of serotonin participate to shock and vasodilation during IgG-mediated anaphylaxis [13, 16]. Of note, the release of serotonin exacerbates endothelial barrier dysfunction during septic shock [22]. These observations question as to whether the presence of CD32A might confer specific functions to platelets during TRALI responses.

We confirmed that the hCD32A was functional on platelets of hemizygous animals. Firstly, incubation of platelet-rich plasma with an anti-CD32A mAb (IV.3) and goat anti-mouse IgG or heat-aggregated IgGs induced platelet aggregation, only if they expressed transgenic hCD32A (Supplementary figure D), as previously described [23]. Secondly, CD32A⁺ platelets spread on IgG-coated surface, as previously noticed [24].

Transgenic CD32A⁺ mice are prone to spontaneous autoimmune disorders, but these syndromes only appear in aged CD32A-homozygous mice (> 20 weeks) [25]. In our experiments, we used young CD32A-hemizygous animals (8 weeks), at an age without any detectable signs of autoimmune inflammation. Thus, confounding effects resulting from this transgenic background were unlikely to occur. Accordingly, TRALI responses induced by the mouse mAb 34-1-2S were similar in mice expressing or not a human CD32A transgene, in a one-hit as well as in a two-hit model. In the two models, both 10 min and 2 h after administration of the mouse anti-MHC I mAb 34-1-2S, similar signs of interstitial and alveolar edema were observed whether the mice expressed or not hCD32A. Higher platelet consumption was detected in hCD32A⁺ animals receiving large amounts of the anti-MHC I mAb in the one-hit

model at the 10 min time point. This increased thrombocytopenia could be due to an enhanced sequestration of platelets in the pulmonary microcirculation via the interaction of their transgenic CD32A with anti-MHC I mAb on opsonized endothelium as observed *in vitro* in static assays on immobilized 34-1-2S. Alternatively, the higher amount of 34-1-2S mAb is expected to result in an increased opsonization of platelets, which could activate different mechanisms of clearance (complement- or macrophage-dependent). In any case, this difference did not affect the survival rate, which was comparable in the two groups of mice.

Preliminary experiments indicated that a minimum of 0.5 to 0.6 mg/kg 34-1-2S mAb was needed to induce TRALI, and that under these conditions TRALI responses were similar in wild type and in transgenic animals. These similar responses indicate that, in our experimental system, cellular responses induced by the binding of mouse IgG2a to CD32A are minor as compared to those under the control of the endogenous FcγRs. The K_D of interaction of mouse IgG2a with mouse FcγRs are 10^{-8} , $5 \cdot 10^{-8}$, $3 \cdot 10^{-7}$, $6 \cdot 10^{-7}$ M for FcγRI, RIV, RIII, RIIb, respectively [26, 27]. The corresponding K_D for CD32A is unknown (the K_D of human IgGs for CD32A H131R is higher than $4 \cdot 10^{-7}$ M, which is in the range of FcγRIII). Of note, the mIgG2a- and hIgG1-34-1-2S induced the release of low and high amounts of PF4, respectively, during TRALI, strongly suggesting that the affinity of mouse IgG2a for the human CD32A is lower than that of human IgG1 and thus, that these antibodies activate different CD32A-dependant biological responses in platelets and other cells like monocytes/macrophages and neutrophils. Thus, under our experimental conditions, the responses mediated by the interaction of mouse 34-1-2S with endogenous FcγR are likely quantitatively predominant, even in CD32A transgenic animals.

The similarity of the responses induced by the mouse mAb in CD32A⁻ and CD32A⁺ animals led us to search for a better CD32A ligand. Thus, a recombinant chimeric human IgG1/mouse mAb (hIgG1-34-1-2S) derived from 34-1-2S mAb was cloned, expressed and tested. The human IgG1 was preferred to other IgG subtypes due to its biological properties that are similar to those of mouse IgG2a and due to its higher affinity to CD32A, as compared to other human IgG [20]. Control quality experiments showed that the mouse and the chimeric mAb displayed

similar *in vitro* properties, in terms of binding to H-2^d molecules and in terms of platelet activation on opsonized surfaces.

Our major finding is that TRALI responses induced by the chimeric 34-1-2S are more severe in CD32A⁺ animals than in wild type animals. These observations might be explained by the affinity of human IgG1 for mouse FcγR on one hand, and for CD32A on the other hand. The affinity of mouse FcγRs is higher for mIgG2a than for human IgG1 (the K_D of the binding of the hlgGs to FcγRs are 2.5 10⁻⁸, 2 10⁻⁷, 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M for FcγRI, RIV, RIII and RIIB, respectively) than for mIgG2a (10⁻⁸, 5 10⁻⁸, 3 10⁻⁷, 6 10⁻⁷ M), whereas the K_D of human IgG1 for CD32A H131R is 4 10⁻⁷ [26, 27]. Thus, the lower TRALI responses provoked by the hlgG1-34-1-2S mAb in wild type animals could be explained by its K_D for activating FcγRIII and/or FcγRIV, which are at least tenfold lower than the respective mIgG2a ones.

The 15 fold lower affinity of FcγRIIB to hlgG1 than for mIgG2a (K_D=10⁻⁵ M vs 6 10⁻⁷ M) on one hand, and the dampened TRALI responses provoked by hlgG1 on the other hand, indicate that the inhibitory receptor FcγRIIB does not play a significant role during TRALI, as previously found [4]. Altogether, the data suggest that the activation of FcγRIII and of FcγRIV would be more drastically affected than that of FcγRI when the mIgG2a is replaced with the hlgG1. Conversely, the K_D of the binding of hlgG1 with CD32A (4 10⁻⁷ M) suggests that CD32A activation can directly compensate for the reduced capacity of hlgG1 to activate FcγRIII, whereas this compensatory effect would be marginal with FcγRIV. Since FcγRI and FcγRIV contribute or cooperate with FcγRIII during IgG2a-mediated anaphylaxis [28], we cannot rule out a contribution of these receptors during TRALI.

Interestingly, the thrombocytopenia induced by hlgG1-34-1-2S was significantly more severe in CD32A⁺ than in CD32A⁻ animals. This strong platelet activation is documented by the increased release of PF4 and serotonin. This stronger platelet activation in CD32A⁺ animals may enhance platelet/leukocyte interactions, further leukocyte activation, which would exaggerate the pathogenesis of TRALI. Whether serotonin actively participates in endothelial barrier disruption during TRALI, as recently demonstrated in the case of anaphylaxis [13, 16],

remains to be investigated. Moreover, the high amounts of TAT complexes present in CD32A⁺ point to an excessive generation of thrombin. This observation indicates either an increased tissue factor exposure due to vascular endothelium lesions and/or its activation on blood monocytes, necessary to activate prothrombin *via* the extrinsic pathway of coagulation, or the exposure of polyphosphates on the plasma membrane of activated platelet, sufficient to activate prothrombin *via* the intrinsic pathway.

All these results show that platelet may drive more complex TRALI responses in CD32A⁺ animals, some of which may affect the integrity of the endothelial barrier. Further studies are required to evaluate whether and how platelets as well as other CD32A⁺ immunological cells, namely neutrophils and monocytes/macrophages, participate to TRALI development.

Acknowledgements

The authors would like to thank M. Freund and her collaborators for animal care and J. Mulvihill for revising the English of the manuscript. They also thank S. Magnenat and F. Lefèbvre for technical assistance.

This work was supported by a project grant from the EFS (APR 2014) and by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique).

References

1. Hendrickson, J.E., et al., *Incidence of transfusion reactions: a multicenter study utilizing systematic active surveillance and expert adjudication*. *Transfusion*, 2016. **56**(10): p. 2587-2596.
2. Dry, S.M., et al., *The pathology of transfusion-related acute lung injury*. *Am J Clin Pathol*, 1999. **112**(2): p. 216-21.
3. Looney, M.R., et al., *Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(11): p. 3450-61.
4. Strait, R.T., et al., *MHC class I-specific antibody binding to nonhematopoietic cells drives complement activation to induce transfusion-related acute lung injury in mice*. *J Exp Med*, 2011. **208**(12): p. 2525-44.
5. Fung, Y.L., et al., *Recipient T lymphocytes modulate the severity of antibody-mediated transfusion-related acute lung injury*. *Blood*, 2010. **116**(16): p. 3073-9.
6. Peters, A.L., D. Van Stein, and A.P. Vlaar, *Antibody-mediated transfusion-related acute lung injury; from discovery to prevention*. *Br J Haematol*, 2015. **170**(5): p. 597-614.
7. Looney, M.R., et al., *Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1615-23.
8. Hechler, B., et al., *Platelets are dispensable for antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in the mouse*. *J Thromb Haemost*, 2016. **14**(6): p. 1255-67.
9. Semple, J.W., et al., *Intravenous immunoglobulin prevents murine antibody-mediated acute lung injury at the level of neutrophil reactive oxygen species (ROS) production*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e31357.
10. McKenzie, C.G., et al., *Peripheral blood monocyte-derived chemokine blockade prevents murine transfusion-related acute lung injury (TRALI)*. *Blood*, 2014. **123**(22): p. 3496-503.
11. Qiao, J., et al., *The platelet Fc receptor, FcgammaRIIa*. *Immunol Rev*, 2015. **268**(1): p. 241-52.
12. Arman, M. and K. Krauel, *Human platelet IgG Fc receptor FcgammaRIIA in immunity and thrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2015. **13**(6): p. 893-908.
13. Beutier, H., et al., *Platelets expressing IgG receptor FcgammaRIIA/CD32A determine the severity of experimental anaphylaxis*. *Sci Immunol*, 2018. **3**(22).
14. Cloutier, N., et al., *Platelets can enhance vascular permeability*. *Blood*, 2012. **120**(6): p. 1334-43.

15. Florey, O.J., et al., *Antiendothelial cell antibodies mediate enhanced leukocyte adhesion to cytokine-activated endothelial cells through a novel mechanism requiring cooperation between Fc γ R1a and CXCR1/2*. *Blood*, 2007. **109**(9): p. 3881-9.
16. Cloutier, N., et al., *Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(7): p. E1550-E1559.
17. McKenzie, S.E., et al., *The role of the human Fc receptor Fc gamma R1A in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model*. *J Immunol*, 1999. **162**(7): p. 4311-8.
18. Tiller, T., C.E. Busse, and H. Wardemann, *Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells*. *J Immunol Methods*, 2009. **350**(1-2): p. 183-93.
19. Tiller, T., et al., *Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning*. *J Immunol Methods*, 2008. **329**(1-2): p. 112-24.
20. Overdijk, M.B., et al., *Crosstalk between human IgG isotypes and murine effector cells*. *J Immunol*, 2012. **189**(7): p. 3430-8.
21. Bruhns, P., *Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models*. *Blood*, 2012. **119**(24): p. 5640-9.
22. Li, Y., et al., *Sepsis-induced elevation in plasma serotonin facilitates endothelial hyperpermeability*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 22747.
23. Yeung, J., et al., *Platelet 12-LOX is essential for Fc γ R1a-mediated platelet activation*. *Blood*, 2014. **124**(14): p. 2271-9.
24. Zhi, H., et al., *Platelet Activation and Thrombus Formation over IgG Immune Complexes Requires Integrin α IIb β 3 and Lyn Kinase*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0135738.
25. Tan Sardjono, C., et al., *Development of spontaneous multisystem autoimmune disease and hypersensitivity to antibody-induced inflammation in Fc γ receptor 1a-transgenic mice*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(10): p. 3220-9.
26. Jonsson, F. and M. Daeron, *Mast cells and company*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 16.
27. Dekkers, G., et al., *Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors*. *MAbs*, 2017. **9**(5): p. 767-773.
28. Khodoun, M.V., et al., *Rapid desensitization of mice with anti-Fc γ R1b/Fc γ R1c mAb safely prevents IgG-mediated anaphylaxis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **132**(6): p. 1375-87.
29. Welty-Wolf, K.E., et al., *Coagulation and inflammation in acute lung injury*. *Thromb Haemost*, 2002. **88**(1): p. 17-25.
30. McDonald, B., et al., *Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice*. *Blood*, 2017. **129**(10): p. 1357-1367.

31. Gould, T.J., et al., *Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(9): p. 1977-84.

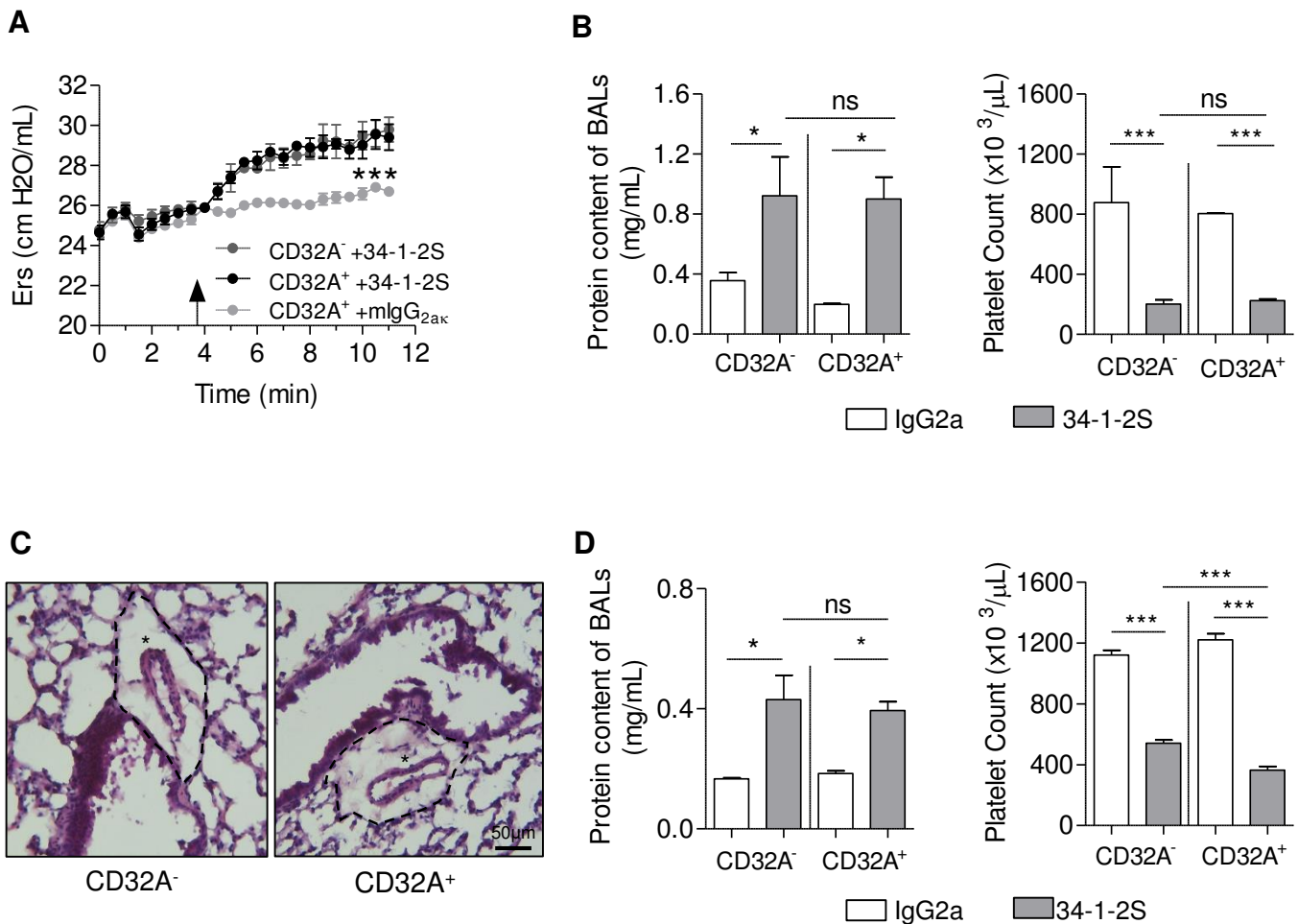


Figure 3-1. Early TRALI events are similar in wild-type and CD32A⁺ transgenic mice in a two- or a one-hit model

A) Two-hit model: assessment of airway responsiveness. Lung elastance (Ers) was measured in anesthetized, tracheotomized animals. After 4 min, once the lung parameters had stabilized, control mlgG_{2ak} or the mAb 34-1-2S (0.6 mg/kg) was injected into the jugular vein and lung parameters were monitored using a protocol alternating normal respiration with snapshot perturbations. Results are presented as the mean ± SEM (t-test, ***p<0.001; n=3 and 4 for mlgG_{2ak} and anti-MHC I, respectively). **B)** Two-hit model: assessment of edema, 10 min after injection of mlgG_{2ak} or 34-1-2S (0.6 mg/kg). **Left panel:** protein concentrations in bronchoalveolar lavages (BALs). **Right panel:** platelet count. Results are presented as the mean ± SEM (2-way ANOVA, ns, p>0.05; *p<0.05; ***p<0.001; n=3 and 5 for mlgG_{2ak} and 34-1-2S, respectively). **C)** Two-hit model: Representative images of interstitial edema. Hematoxylin and eosin staining of lung tissue sections; the edema is highlighted with a dotted line around the vessel. **D)** One-hit model: assessment of edema, 10 min after injection of PBS or 34-1-2S (5 mg/kg). **Left panel:** protein concentrations in bronchoalveolar lavages (BALs). **Right panel:** platelet count. Results are presented as the mean ± SEM (2-way ANOVA, ns, p>0.05; *p<0.05; ***p<0.001; n=3 and 9 for PBS and 34-1-2S, respectively).

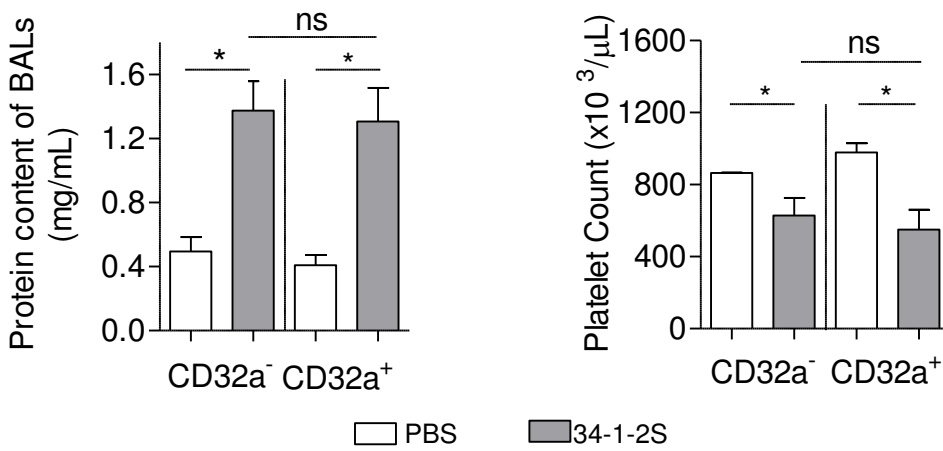
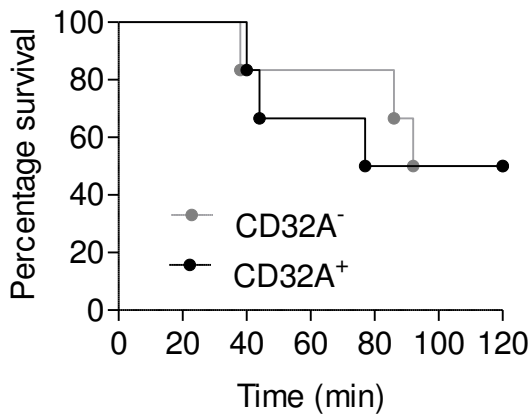
A**B**

Figure 3-2. Later stages of TRALI occur similarly in wild-type and CD32A⁺ transgenic mice (one-hit model)

Anesthetized animals received one injection of PBS or the mAb 34-1-2S (5 mg/kg) and were followed for 2 hours. **A)** TRALI parameters at the 2 h endpoint. **Left panel:** protein concentrations in bronchoalveolar lavages (BALs). **Right panel:** platelet count. Results are presented as the mean \pm SEM (2-way ANOVA, ns, $p > 0.05$; * $p < 0.05$; $n = 3$ and 6 for PBS and 34-1-2S, respectively). **B)** Survival curves (from 0 to 120 min; log-rank test, ns, $p = 0.8649$; $n = 6$).

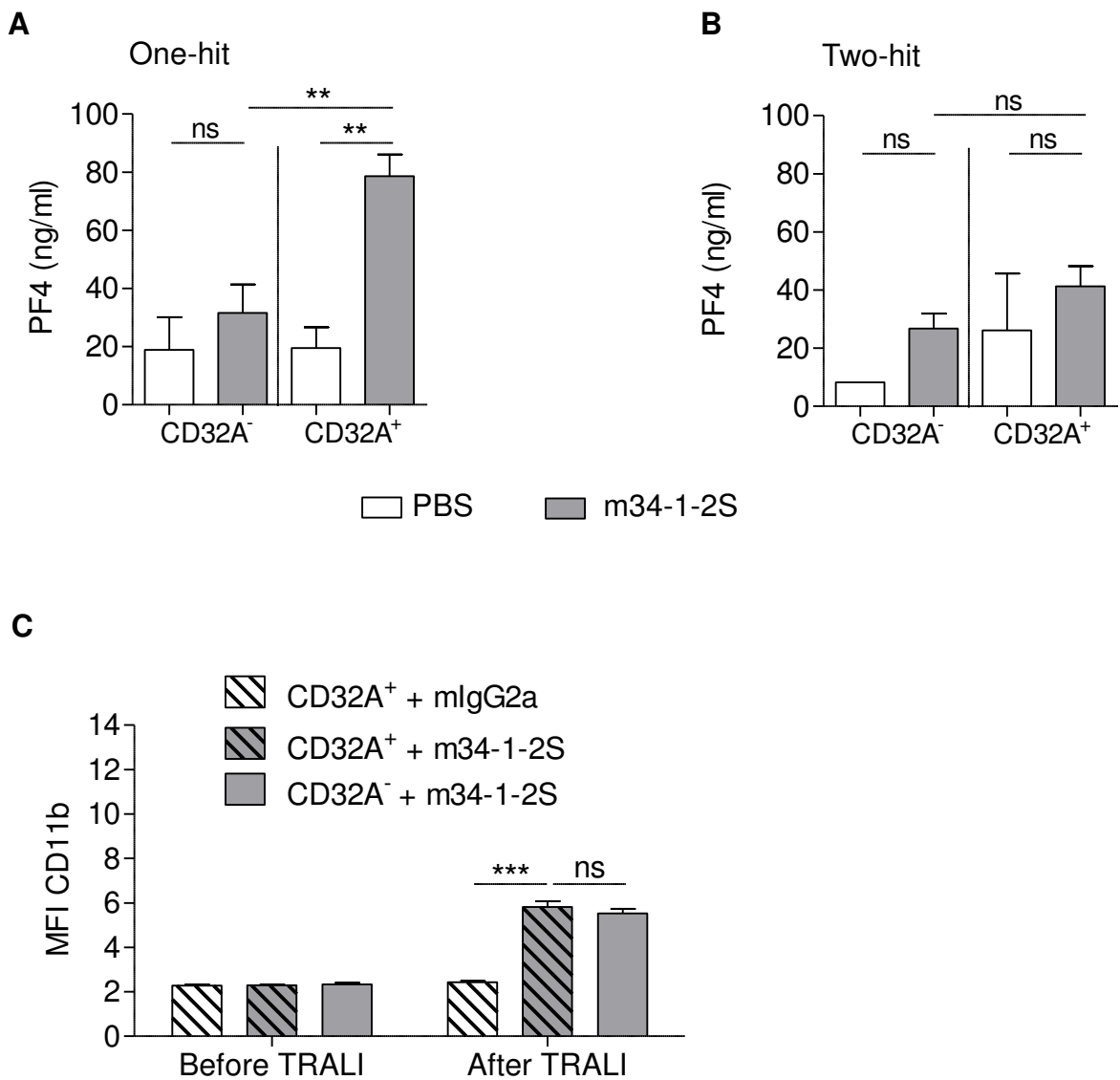


Figure 3-3. Weak effect of CD32A receptor on the activation of platelets and neutrophils during TRALI induced by mouse 34-1-2S (m34-1-2S)

A) ELISA analysis of plasma PF4 in the one-hit model. Results are presented as the mean \pm SEM (ns, $p > 0.05$, $**p < 0.01$, $n = 3-6$). **B)** ELISA analysis of plasma PF4 in the two-hit model. Results are presented as the mean \pm SEM (ns, $p > 0.05$, $n = 3-5$). **C)** Flow cytometric analysis of CD11b exposure on peripheral neutrophils after TRALI induction. Aortic blood was sampled from animals before sacrifice at the 10 min time point followed by staining with anti-Ly6G and anti-CD11b antibodies for flow cytometry analysis. Results are presented as the mean \pm SEM (ns, $p > 0.05$, $***p < 0.001$, $n = 3-6$).

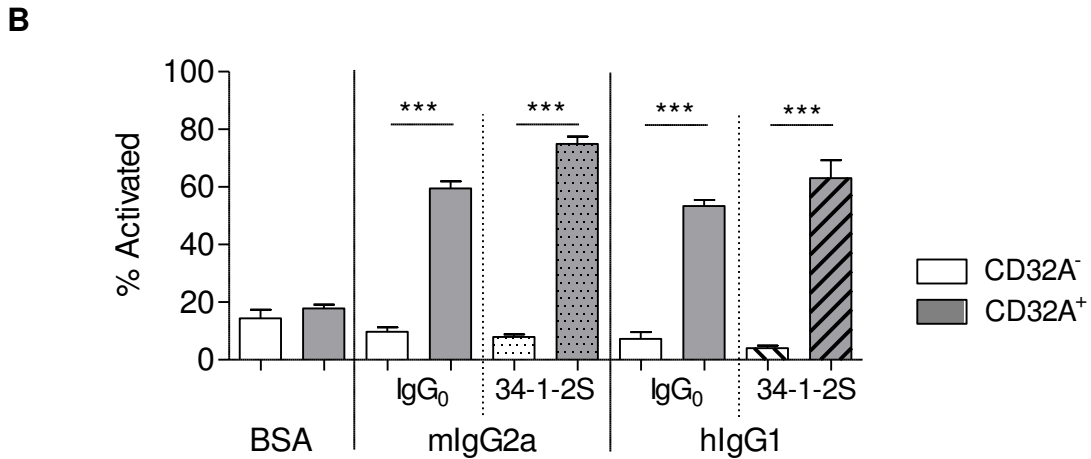


Figure 3-4. Mouse 34-1-2S and chimeric hIgG1-34-1-2S display similar *in vitro* properties

A) Blood cells were stained with mIgG2a-34-1-2S or hIgG1-34-1-2S anti-MHC I mAbs and anti-CD45 mAb as described in the methods. CD45⁺ leukocytes (10000 events) were analyzed by flow cytometry, and compared to MHC I-unstained cells (fluorescence minus one, FMO). **B)** Washed wild type or CD32A⁺ platelets were laid on glass slides coated with mIgG2a-34-1-2S or hIgG1-34-1-2S, or their respective isotype controls. After a 60 min incubation, platelets were fixed, stained with RAM1 and FITC-phalloidin, and then analyzed by immunofluorescence microscopy. The percentage of spreading (phalloidin-positive) platelets was then calculated.

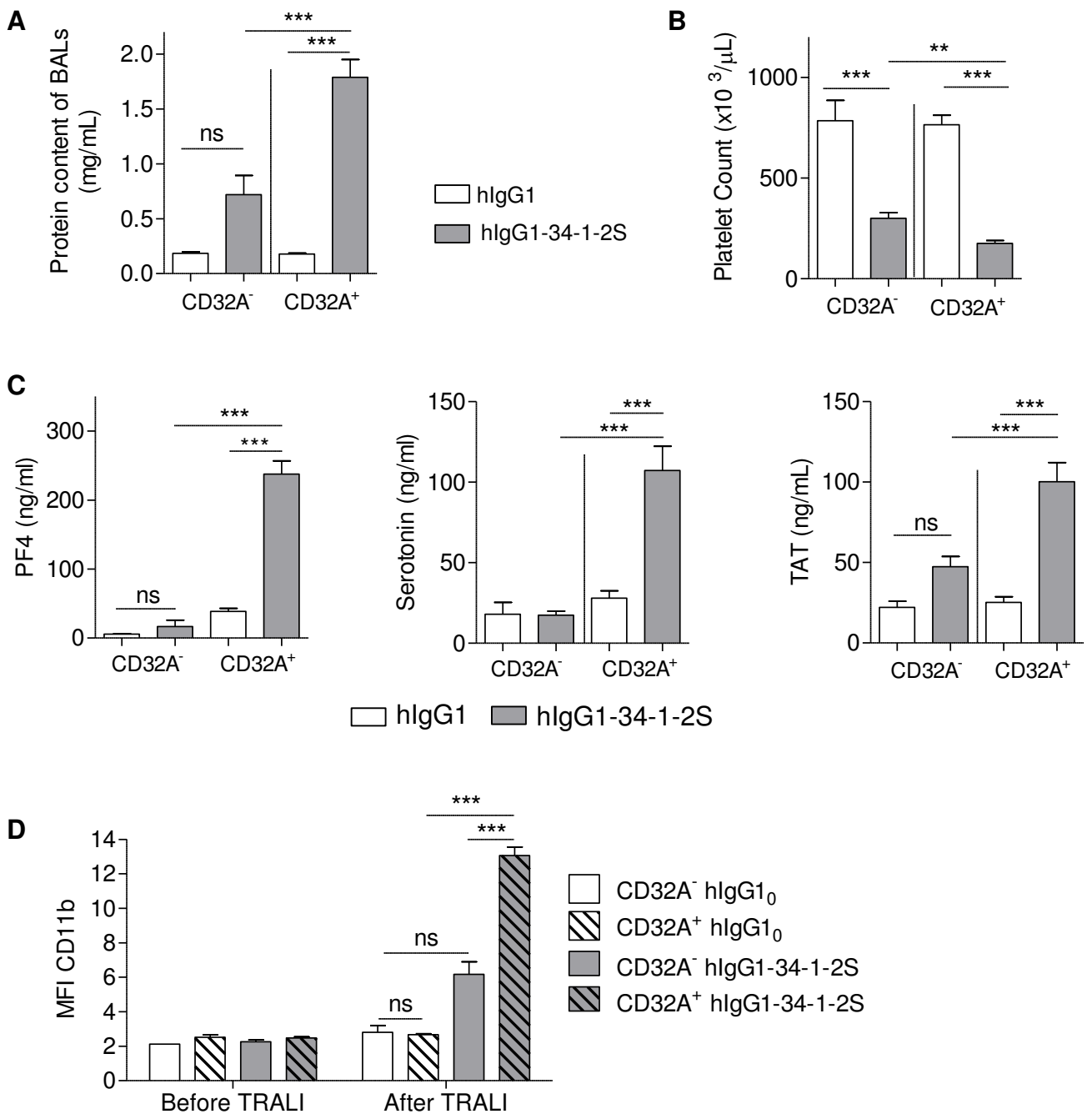


Figure 3-5. Chimeric hlgG1-34-1-2S induces more severe TRALI responses in CD32A⁺ mice

Two-hit model: assessment of TRALI 10 min after injection of hlgG1 isotype or hlgG1-34-1-2S (1 mg/kg). **A**) Protein concentrations in bronchoalveolar lavages (BALs). Results are presented as the mean \pm SEM (2-way ANOVA, ns, $p > 0.05$; *** $p < 0.0001$; $n = 3-5-12-14$ from left to right). **B**) Platelet count. Results are presented as the mean \pm SEM (2-way ANOVA, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n = 3-5-12-14$). **C**) ELISA analysis of plasma PF4, serotonin and TAT concentrations. Results are presented as the mean \pm SEM (2-way ANOVA, ns, $p > 0.05$, *** $p < 0.001$, $n = 5-13$). **D**) Flow cytometric analysis of CD11b expression on peripheral neutrophils after TRALI induction. Results are presented as the mean \pm SEM (2-way ANOVA, ns, $p > 0.05$; *** $p < 0.001$; $n = 2-6$).

II) DISCUSSION

Le TRALI immunologique est provoqué par des alloanticorps (IgGs) qui se lient par leur partie variable à leurs cibles moléculaires spécifiques, et par leur partie constante aux récepteurs Fc γ des cellules immunitaires dont l'implication dans le TRALI fait par ailleurs débat. La différence d'expression de ces récepteurs entre l'homme et la souris rend les modèles murins actuels incomplets et l'extrapolation des résultats plus délicate. Pour ces raisons, nous avons utilisé un modèle murin transgénique pour l'expression du Fc γ RIIA humain (CD32A), un récepteur activateur de faible affinité pour les IgGs, absent chez la souris, afin d'évaluer sa potentielle implication dans le TRALI immunologique.

Nos premières observations, avec deux modèles distincts de TRALI (one-hit et two-hit) et à des temps différents après l'induction de l'œdème (10 min et 2 h), montrent qu'il n'y a pas de différence de réponse nette entre les souris exprimant ou non ce récepteur suite à l'injection de l'anticorps murin anti-CMH I, le 34-1-2S, une IgG2a de souris. Cependant, une consommation plus importante des plaquettes est observée chez les souris CD32A⁺ suite à l'injection d'une grande quantité d'anticorps (5 mg/kg), accompagnée d'une légère augmentation de la concentration du PF4 plasmatique, tandis que la sérotonine plasmatique reste à des niveaux de base. Ces observations indiquent que les plaquettes CD32A⁺ sont dans une certaine mesure plus activées, mais sans que cela ne se traduise par une différence dans la formation de l'œdème pulmonaire, ou la survie des animaux.

La similarité des réactions chez les souris CD32A⁻ et CD32A⁺ peut résulter des différences d'affinité de l'anticorps murin (mIgG2a) pour les récepteurs Fc γ R endogènes de souris et le récepteur CD32A humain. L'affinité des IgG2a murines pour le CD32A humain n'est pas connue, cependant la capacité de l'IgG1 chimère à activer fortement les plaquettes au cours d'un TRALI (voir plus bas), et la faible réponse des plaquettes avec l'IgG2a de souris (34-1-2S) dans les deux modèles de TRALI (one-hit et two-hit) laisse envisager deux corollaires : (i) l'affinité des IgG2a murines pour le CD32A est plus faible que celle des IgG1 humaines, (ii) le 34-1-2S murin active faiblement le CD32A non seulement des plaquettes, mais aussi celui des cellules immunitaires des souris transgéniques.

Afin d'utiliser un ligand plus biologique du CD32A, nous avons amélioré notre approche en développant un anticorps chimère, le hIgG1-34-1-2S, qui possède la partie Fc d'une IgG1 humaine et les parties variables du 34-1-2S (collaboration avec le Dr F. Jönsson, Institut Pasteur). En effet, l'absence de différence entre les souris transgéniques ou non, pourrait résulter d'une affinité moins importante de l'IgG2a murine au récepteur CD32A comparé aux récepteurs Fc γ endogènes, et donc une insuffisance relative de l'activation du transgène dans ce modèle. Les IgG2a murines ont une forte affinité pour le Fc γ RIV murin, elle est de l'ordre

de 3×10^{-8} M (Bruhns and Jonsson 2015), mais leur affinité pour le CD32A humain n'est pas connue à ce jour. Cependant, la faible concentration de PF4 et de sérotonine après l'induction du TRALI avec l'anticorps murin 34-1-2S, comparée à celle induite par l'anticorps chimère, suggère une plus faible affinité que celle de l'IgG1 humaine pour le CD32A. L'affinité des IgG1 humaines pour le CD32A est de l'ordre de 2.5×10^{-7} M (Bruhns 2012), et de 2.8×10^{-7} M pour le Fc γ RIV murin (Dekkers et al. 2017). Ces affinités suggèrent donc que les réponses cellulaires induites par l'activation du CD32A ou du Fc γ RIV sont relativement plus fortes avec les IgG1 humaines via le CD32A, tandis que celles induites par l'IgG2a de souris le serait plutôt via le Fc γ RIV.

Les deux types d'anticorps montrent des propriétés similaires, que ce soit sur le plan de la reconnaissance des molécules H-2^d, que celui de l'activation statique des plaquettes. Dans le modèle de TRALI à deux évènements, l'anticorps chimérique hIgG1-34-1-2S (à 1 mg/kg) provoque un œdème alvéolaire plus sévère chez les souris CD32A⁺ que chez les souris CD32A⁻, comme le révèle la quantité plus importante de protéines dans le liquide bronchoalvéolaire. De plus, dans les souris exprimant le CD32A, la consommation des plaquettes augmente significativement, tandis que les concentrations plasmatiques de PF4 et de la sérotonine sont bien plus importantes. À noter que cette augmentation n'est pas observée en utilisant le 34-1-2S murin dans le même modèle (mais à 0.6 mg/kg) et qu'elle est largement supérieure à celle mesurée dans le modèle à un évènement avec 5 mg/kg d'anticorps murin (237 ng/mL avec le hIgG1-34-1-2S pour 78 ng/mL avec le mIgG2-34-1-2S concernant la concentration du PF4). La diversité dans les affinités des anticorps, décrite ci-dessus, permettrait d'expliquer la différence de réponses entre les souris CD32A⁺ et CD32A⁻, observées seulement avec le hIgG1-34-1-2S.

Ces résultats rappellent ceux obtenus dans un modèle de choc anaphylactique provoqué par des IgGs et des modèles de maladies immunitaires dépendantes des complexes immuns, où la présence du CD32A plaquettaire participe à l'état de choc, accompagné d'une augmentation similaire de sérotonine plasmatique (Beutier et al. 2018) (Cloutier et al. 2018). Il faut encore déterminer si, comme dans ces travaux, la sérotonine libérée est responsable de l'aggravation de l'œdème pulmonaire associé au TRALI, voire si une rupture de l'intégrité de la barrière endothéliale peut être observée dans des tissus distants. Afin d'évaluer le rôle de la sérotonine au cours d'un TRALI dans les souris CD32A⁺, des expériences supplémentaires sont nécessaires. D'une part, nous pouvons comparer les paramètres du TRALI dans les animaux CD32A⁺ et CD32A⁻ après avoir éliminé les plaquettes, et d'autre part, évaluer l'impact sur le TRALI de l'inhibition de la biosynthèse de la sérotonine avec du para-chlorophénylalanine (PCPA) (Beutier et al. 2018), ou analyser, dans les souris non transgéniques, l'effet de

l'administration de sérotonine juste avant l'induction d'un TRALI avec l'anticorps hIgG1-34-1-2S.

Compte tenu que le CD32A est exprimé par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, lesquels peuvent jouer un rôle dans le TRALI, des expériences complémentaires utilisant des techniques de déplétions cellulaires spécifiques (décrites dans les articles 1 et 2), permettront de déterminer via quelle(s) cellule(s) le CD32A exerce son effet pour exacerber la lésion pulmonaire.

Ce travail permet donc de proposer une meilleure modélisation de la pathologie humaine du TRALI immunologique, et montre un rôle du récepteur FcγRIIA dans sa pathogenèse. Une réévaluation de l'implication des cellules immunitaires et des plaquettes dans le modèle CD32A⁺ est nécessaire. De plus, les souris transgéniques humanisées ouvrent la possibilité d'évaluer dans quelle mesure les paramètres physiopathologiques du TRALI dépendent des parties Fc des alloanticorps humains, c'est-à-dire de la nature des isotypes.

D'autres aspects de la discussion de ce travail seront développés dans la discussion générale.

D) SUITE DU TRAVAIL ET DISCUSSION GÉNÉRALE

Le TRALI est un syndrome rare mais qui reste une complication grave de la thérapie transfusionnelle. Bien que nos connaissances concernant ses causes et ses conséquences ont bien évolué, les mécanismes qui conduisent au TRALI chez l'Homme restent encore largement incompris et beaucoup de questions non résolues. De plus, l'implication des plaquettes, des neutrophiles ou des monocytes/macrophages dans la pathogénèse du TRALI diffère selon les laboratoires, ou les protocoles expérimentaux. Selon M. Popovsky, celui qui a donné au TRALI son nom, nous avons parcouru trente ans de progrès dans notre compréhension, mais il nous reste du chemin à faire pour bien comprendre sa pathogénèse ; « TRALI : three decades of progress but miles to go before we sleep » (Popovsky 2015).

Des limites pour bien comprendre les mécanismes mis en jeu dans le TRALI immunologique sont, d'une part, la rareté de ce syndrome qui rend les études cliniques difficiles, et d'autre part, le nombre restreint de modèles animaux disponibles qui ne reproduisent pas parfaitement les acteurs de la pathologie humaine.

Dans le but de mieux saisir ces mécanismes, un premier objectif du travail de ma thèse a été d'explorer de nouvelles pistes moléculaires et de réévaluer, d'une façon plus spécifique, la contribution des cellules pouvant participer à la formation des lésions pulmonaires dans le modèle classique du TRALI immunologique. Un deuxième objectif a été de développer un nouveau modèle de TRALI immunologique dans des souris transgéniques, humanisées pour l'expression du récepteur FcγRIIA, ce qui permet d'envisager l'étude des mécanismes du TRALI sous un angle nouveau.

I) Rôle des inhibiteurs de P2RX₁ et TRPC6 dans la pathologie du TRALI : quelles cibles cellulaires ?

Nous avons montré que l'inhibition du P2RX₁ ou du TRPC6 diminue l'étendue de l'œdème pulmonaire et améliore la survie des souris dans un modèle expérimental de TRALI immunologique. Les déplétions cellulaires spécifiques indiquent que ces récepteurs peuvent contrôler des processus médiés par les monocytes/macrophages et/ou les cellules musculaires lisses, pouvant ainsi réguler le développement de l'œdème, sans exclure un potentiel rôle du TRPC6 sur les cellules endothéliales.

La diminution de l'œdème interstitiel péri-artériolaire dans les deux séries d'inhibition, et l'absence d'œdème interstitiel post-alvéolaire, pointent vers une contribution

probable de la tension pulmonaire artérielle, contrôlée par les cellules musculaires lisses, dans la perméabilité vasculaire. Deux arguments sont en faveur de cette hypothèse : d'une part, l'antagonisme du P2RX₁ bloque la contraction des cellules musculaires lisses pulmonaires qui participent à la dérégulation de l'hypertension artérielle pulmonaire (Robichaud and Visovatti 2018) ; et d'autre part, le TRPC6 est aussi décrit pour participer activement à l'hypertension systémique dans un modèle d'hypertension induite par l'ouabaïne, ainsi que la vasoconstriction et l'hypertension pulmonaires dans deux modèles d'hypoxie chronique respectivement chez la souris et le rat (Weissmann et al. 2006, Earley and Brayden 2015). L'implication de ces récepteurs dans la pathophysiologie humaine est d'ailleurs suggérée par l'augmentation de leur expression dans les poumons de patients souffrant d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (Yu et al. 2004, Visovatti et al. 2016).

D'autres cellules que les cellules musculaires lisses peuvent aussi être impliquées. Les récepteurs P2X₁ et TRPC6 sont exprimés par les monocytes/macrophages, aussi impliqués dans l'hypertension. En effet, la déplétion des monocytes/macrophages par un traitement clodronate diminue la pression systolique et protège les souris contre les lésions associées à l'hypertension rénale, et ceci dans deux modèles expérimentaux différents (l'un utilisant l'angiotensine II chez la souris, et l'autre utilisant un régime riche en sel dans des rats qui y sont sensibles) (Huang et al. 2018). À la différence du TRALI, ces modèles d'hypertension s'étalent sur une plus longue durée avec des injections tous les jours, et les observations ne sont relevées que 2 ou 4 semaines après l'induction de l'hypertension. Cependant, une diminution de la pression systolique est déjà observée le 5^{ème} jour suivant le début des traitements. Même si les cinétiques ne sont pas similaires, nous pouvons imaginer une contribution des monocytes/macrophages au niveau de l'hypertension pulmonaire, surtout qu'un faisceau d'observations suggère un rôle de ces cellules dans le TRALI (voir introduction générale, paragraphe XI-2 : les monocytes/macrophages).

La mesure de la tension dans l'artère pulmonaire avant et au cours du TRALI sera effectuée pour évaluer directement sa contribution à la formation de l'œdème.

Cependant, dans deux autres modèles murins d'atteinte pulmonaire aiguë, la contribution du TRPC6 sur les cellules myéloïdes a été écartée. Ainsi, la formation d'œdèmes pulmonaires provoqués par administration de LPS (par nébulisation) (Tauseef et al. 2012), ou par une ischémie des poumons suivie d'une reperfusion (Weissmann et al. 2012), est aussi observée chez des souris sauvages irradiées et transplantées avec les cellules de la moelle osseuse de souris déficientes pour ce

récepteur (sur le fond C57BL/6). Ces résultats sont donc en défaveur de la nécessité du TRPC6 des monocytes/macrophages dans le processus de formation d'un œdème pulmonaire, mais n'exclut pas le rôle de ces cellules via d'autres mécanismes tels l'activation du P2RX₁ ou la production des espèces réactives de l'oxygène.

Parmi les cellules non hématologiques, nous ne pouvons pas formellement exclure les cellules endothéliales. En effet, des expériences *in vitro* montrent que la signalisation calcique médiée par le TRPC6 est nécessaire pour le réarrangement du cytosquelette et la rupture des jonctions intercellulaires, augmentant ainsi la perméabilité de la barrière endothéliale (Singh et al. 2007). Nous pouvons donc aussi proposer que l'inhibition du TRPC6 par le SAR7334 diminue le flux calcique entrant dans les cellules endothéliales et protège par la suite contre la formation de l'œdème lors du TRALI.

En accord, des expériences *in vitro*, utilisant des cellules endothéliales isolées de souris déficientes ou non pour le TRPC6, et soumises à des conditions de perméabilité vasculaire (activation par la thrombine ou le LPS, ischémie et reperfusion en condition de flux), montrent que le TRPC6 est responsable de l'augmentation de la perméabilité et de la rupture de l'intégrité de la couche endothéliale (Singh et al. 2007, Tauseef et al. 2012, Weissmann et al. 2012).

Nous ne pouvons pas utiliser facilement ces cellules dans notre modèle qui nécessite l'utilisation de souris de fond génétique CMH d'haplotype H-2^d (par exemple BALB/c). Néanmoins, nous pouvons envisager d'étudier l'effet du 34-1-2S *in vitro* sur la perméabilité des cellules endothéliales issues de souris BALB/c, la lignée bEnd.3, et évaluer l'effet de l'antagoniste sélectif (SAR7334) sur l'intégrité de la barrière endothéliale.

L'inhibition du P2RX₁ réduit de plus de 50% la quantité des protéines dans le liquide bronchoalvéolaire, l'aire des œdèmes interstitiels et la mortalité associée au TRALI, permettant d'envisager une amélioration de la protection au moyen d'un traitement complémentaire avec la molécule SAR7334. Pour cela, nous prévoyons de tester si la combinaison des deux traitements peut avoir un effet protecteur sur la formation de l'œdème et l'amélioration de la survie. Si l'inhibition du TRPC6, en plus du P2RX₁, conduit à une correction plus importante des paramètres du TRALI, cela serait en faveur de la contribution des cellules endothéliales, vu que le P2RX₁ n'est pas exprimé par ces dernières, même si nous ne pouvons pas exclure un effet additif sur les cellules musculaires lisses exprimant les deux récepteurs. Si, au contraire, la protection reste du même ordre, nous pouvons exclure la contribution des cellules endothéliales.

II) Rôle du récepteur FcγRIIA dans la pathologie du TRALI

L'expression du FcγRIIA est restreinte aux primates supérieurs. Nos résultats indiquent que l'expression de ce récepteur dans des souris transgéniques participe à la gravité de l'œdème pulmonaire induit par l'injection d'un anticorps chimérique hIgG1-34-1-2S. Cette aggravation de l'œdème alvéolaire est accompagnée d'une augmentation importante de l'activation plaquettaire, comme le montrent les dosages ELISA du PF4 et de la sérotonine, ainsi que de la consommation accrue de plaquettes après TRALI. De plus, la concentration des complexes thrombine/anti-thrombine (TAT) est augmentée dans le plasma des souris transgéniques, pouvant refléter l'exposition du sous-endothélium, et/ou l'activation des monocytes, tous deux étant une source importante de facteur tissulaire nécessaire pour la génération de thrombine par la voie extrinsèque de la coagulation. Alternativement, cette augmentation peut refléter l'activation directe de la voie de contact suite à l'exposition des polyphosphates contenus dans les granules des plaquettes, permettant l'auto-activation du facteur XII et ensuite l'activation séquentielle des facteurs XI et IX (Muller et al. 2009, Verhoef et al. 2017). La première hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant des inhibiteurs de la protéine disulfide isomérase PDI, nécessaire pour l'activation du facteur tissulaire présent sous forme inactive à la membrane plasmique des monocytes (Langer et al. 2013). La seconde hypothèse pourrait être testée en administrant un inhibiteur du XIIa avant l'induction du TRALI (Phe-Pro-Arg-Chlorométhylcétone) (Kleinschnitz et al. 2006).

Les neutrophiles présentent aussi un état d'activation plus prononcé, comme le montre l'augmentation de l'expression du CD11b à leur surface.

Il s'agit donc d'un modèle de TRALI potentiellement novateur en raison des mécanismes cellulaires particuliers, différents ou supplémentaires de ceux caractérisés dans le modèle classique de TRALI en deux étapes, et donc capable de mieux refléter la pathogénèse du TRALI immunologique chez l'Homme.

Toutes les questions déjà étudiées dans le passé se posent de nouveau, en raison des nouvelles interactions possibles entre les cellules sanguines et l'endothélium vasculaire. En premier lieu, des expériences de déplétions et de transfusion de plaquettes, de neutrophiles, ou de monocytes/macrophages permettront de tester l'implication de ces cellules FcγRIIA⁺ dans l'initiation du TRALI.

Si l'expression du CD32A rend un de ces types cellulaires nécessaire ou suffisant pour la survenue de l'œdème dans les souris transgéniques, les interactions avec les cellules endothéliales pourront être étudiées *in vitro* au moyen de cultures cellulaires.

Il se pose d'ailleurs la question du devenir de ces cellules, en particulier de leur extravasation vers l'espace alvéolaire, qui pourra être d'abord abordée par l'histologie des poumons.

L'activation des cellules endothéliales induit la formation de fibres de stress, la sécrétion de molécules qui recrutent et activent les plaquettes et les leucocytes circulants, et l'expression de davantage de molécules d'adhérence. De façon complémentaire, la lignée endothéliale bEnd.3 pourra être utilisée pour évaluer *in vitro*, d'une part l'effet du hIgG1-34-1-2S sur les cellules endothéliales, en matière de formation de fibres de stress et de perte de l'intégrité des contacts intercellulaires ; et d'autre part, l'adhérence des cellules immunitaires et des plaquettes exprimant ou non le CD32A, sur ces cellules en présence de l'anticorps. En outre, ces expériences mériteraient d'être effectuées dans des chambres de flux, permettant une évaluation dynamique des interactions. Une équipe a mis en place récemment un nouveau système de chambre microfluidique mimant la microcirculation pulmonaire, qui serait donc très utile dans le cadre de l'analyse des processus biologiques associés au TRALI (Ekpenyong et al. 2017).

Ces expérimentations seront aussi conduites en condition de transwell, ce qui nous permettra d'évaluer la perméabilité des cellules endothéliales en ajoutant de l'albumine fluorescente que nous pouvons quantifier dans le puits sous-jacent.

Le CX3CR1 joue un rôle important dans l'adhésion et la transmigration des monocytes/macrophages, et l'expression de son ligand (CX3CL1) est augmenté sur les cellules endothéliales activées par la thrombine, favorisant la production de cytokine chimio-attractante (MCP-1) et la migration trans-endothéliale des monocytes, quantifiée après 4 heures de co-culture (Popovic et al. 2008). Ce mécanisme pourrait aussi avoir lieu dans notre modèle de TRALI étant donné l'augmentation des complexes thrombine/anti-thrombine, reflétant l'activation de la coagulation et la production importante de thrombine. Les cellules endothéliales ainsi activées favoriseraient l'afflux des cellules inflammatoires, et par la suite les lésions tissulaires seraient aggravées, conduisant à l'œdème. L'utilisation d'un anticorps bloquant anti-CX3CR1 avant l'injection du hIgG1-34-1-2S permettrait d'évaluer son rôle, qui serait probablement impliqué à un temps tardif du TRALI à la vue des données *in vitro*.

Mes observations montrent d'ores et déjà que les plaquettes des animaux CD32A⁺ libèrent des quantités plus importantes de PF4 et de sérotonine. Une première question est de définir si ces molécules participent à la formation de l'œdème. L'utilisation de plaquettes déficientes pour le PF4 n'est pas envisageable à court terme, pour des

raisons de fond génétique. Il serait par contre possible de vérifier si l'administration de PF4 recombinant modifie les paramètres du TRALI dans les souris non transgéniques.

La sérotonine est aussi augmentée dans le plasma des souris transgéniques suite au TRALI. Un rôle de la sérotonine dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire a déjà été montré, et ceci en favorisant la formation de brèches inter-endothéliales (Cloutier et al. 2012). Pour évaluer sa contribution à l'œdème durant le TRALI, nous pouvons, comme mentionné dans la discussion de l'article 3, utiliser un inhibiteur de sa biosynthèse, le para-chlorophénylalanine (PCPA) (Beutier et al. 2018), ou analyser l'effet de l'administration de sérotonine aux souris n'exprimant pas le CD32A, juste avant l'induction d'un TRALI avec l'anticorps hlgG1-34-1-2S. En outre, nous pouvons rechercher si une fuite de plasma est observée ailleurs que dans les poumons, en injectant au préalable du bleu Evans, et évaluant par la suite l'extravasation du colorant au niveau des extrémités et dans les autres organes.

L'élévation de la concentration sérique des complexes TAT est un marqueur de génération de thrombine qui peut jouer un rôle pathologique en activant davantage les plaquettes, les cellules endothéliales et les monocytes. Afin de montrer si l'augmentation de la génération de thrombine est responsable de l'aggravation du syndrome, nous envisageons d'administrer de l'hirudine recombinante dans les souris transgéniques pour inhiber la thrombine, et comparer leur réponse à celle des souris n'exprimant pas le CD32A. Une coloration de Carstairs des coupes de poumons après TRALI permettra d'identifier la présence ou non de dépôt de fibrine et d'agrégats plaquettaires dans le tissu pulmonaire, et montrer ainsi si le rôle pro-coagulant de la thrombine est responsable des dégâts tissulaires.

L'augmentation de l'expression du CD11b par les neutrophiles des souris transgéniques après le TRALI avec l'anticorps chimère indique une activation plus importante. Le récepteur FcγRIIA est connu pour augmenter l'expression de la molécule d'adhésion L-sélectine (Rosales 2017), et induire la production des espèces réactives de l'oxygène ainsi que la libération des NETs (Tsuboi et al. 2008) (Thomas et al. 2012). Si les neutrophiles contribuent au développement du TRALI, nous pouvons cibler ces processus qui résultent de l'activation de ces cellules.

La L-sélectine pourrait être inhibée avec un anticorps bloquant, permettant de réduire l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales et donc empêcher leur infiltration dans le tissu interstitiel.

En ce qui concerne la production des ERO, les neutrophiles n'expriment que la NOX2, une isoforme de la NADPH oxydase, responsable de la production des ERO par ces

cellules. Un premier défi serait de confirmer la production des ERO par les neutrophiles *in vivo*. Pour cela, nous pouvons envisager des expériences de bioluminescence/fluorescence avec des sondes spécifiques pour visualiser, en temps réel, la production des ERO dans les souris ayant reçu l'anticorps chimérique, en comparant les conditions normale et neutropénique. L'inhibition de cette enzyme par un inhibiteur sélectif, l'apocynine (Stolk et al. 1994), permettrait de préciser la nécessité de cette voie dans le TRALI. Même si nous avons testé l'effet de l'apocynine dans le modèle classique du TRALI sans que cela n'affecte la survenue de l'œdème, les neutrophiles ne jouaient pas de rôle dans ce modèle, ce qui laisse la question ouverte dans le modèle transgénique.

Afin de vérifier la production des NETs au cours du TRALI et la cinétique de leur génération, des immunomarquages seront effectués sur des coupes de poumons à différents temps après l'injection du hlgG1-34-1-2S. Un traitement par la DNase permettrait de tester l'implication de cette production dans la formation de lésions pulmonaires (Caudrillier et al. 2012).

E) PERSPECTIVES

Les perspectives de ce travail sont principalement fondamentales à court terme, permettant une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la survenue du TRALI, et proposant un nouveau modèle pour l'étude de ces derniers.

La mise en évidence d'un rôle du P2RX₁ et d'autres récepteurs calciques tel que le TRPC6, pourrait être une observation clé ouvrant la possibilité de revisiter l'implication des adénosines et du flux calcique dans le maintien de l'intégrité vasculaire non seulement dans le TRALI, mais aussi dans les modèles lésionnels aboutissant à des œdèmes, surtout dans le cas des syndromes de détresse respiratoire aiguë.

Même si les TRALI sont rares, nous pouvons imaginer, à long terme, le développement de nouveaux antagonistes pour cibler les récepteurs impliqués dans cette pathogenèse. Ces inhibiteurs peuvent être utilisés de façon préventive chez des sujets présentant un risque de développement de détresse respiratoire aiguë au moment de leur admission à l'hôpital (souffrant de sepsis par exemple), voire tenter un traitement une fois la détresse déclarée. Pour le dernier aspect, même si l'œdème pulmonaire est présent, nous ne pouvons exclure que de tels inhibiteurs, chez l'Homme, puissent ralentir les processus pathologiques et améliorer ainsi le pronostic vital et la prise en charge des patients, surtout que la ventilation mécanique peut parfois aggraver la situation. De plus, ces potentiels traitements pourront être validés en premier temps dans le modèle de souris humanisées, permettant l'étude de leur efficacité dans un contexte proche de la pathologie humaine.

Dans un autre ordre d'idées, ce modèle transgénique nous ouvre la possibilité d'étudier l'implication des parties Fc des anticorps humains dans le développement du TRALI. Le FcγRIIA ayant différentes affinités pour les sous-classes des IgGs (IgG1>IgG3>IgG4=IgG2), ce modèle nous permettra de mettre en évidence si l'un ou l'autre des isotypes induit des réponses différentes dans les cellules, en utilisant des anticorps chimères exprimant la partie Fc des différentes sous-classes d'IgGs humaines.

À noter que les souris transgéniques expriment le FcγRIIA-R131 et qu'il existe un polymorphisme chez l'Homme, le FcγRIIA-H131, qui présente une affinité plus importante pour les IgG2 humaines (voir l'introduction de la partie 3, 2- le récepteur FcγRIIA), et de ce fait, l'implication des parties Fc pourrait être différente en fonction du polymorphisme exprimé par l'individu. Ce polymorphisme influence d'ailleurs la réponse des leucocytes aux complexes immuns avec des IgGs, en particulier la production des cytokines inflammatoires (IFNγ, IL-12, IL-2, TNFα) (Stein et al. 2018), et une variation de la sensibilité des réponses des neutrophiles a été décrite selon que les individus soient hétérozygotes ou homozygotes pour les deux

allotypes (van der Heijden et al. 2014). En outre, une nouvelle variante d'épissage -gain de fonction- au niveau de l'exon 6 (FcγRIIA^{exon6*}) a été découverte en 2013 ; cette mutation est rare (1/287 personnes saines testées), et le récepteur qui lui est associé, a le même niveau d'expression que le récepteur sauvage sur les neutrophiles et les monocytes. La présence de cette mutation a été associée au risque d'anaphylaxie chez les patients souffrant d'hypogammaglobulinémie, où la mutation est plus fréquente (3/53 patients testés) (van der Heijden et al. 2013). Concernant la présence/expression de cette mutation dans les plaquettes, aucun test n'a été fait.

Ces données soulèvent la complexité de l'extrapolation, à terme, des résultats obtenus avec le modèle murin humanisé, qui pourront s'appliquer seulement à une partie de la population.

Basé sur mon travail de thèse, nous pouvons donc proposer une nouvelle vision des mécanismes qui jouent un rôle dans la survenue de TRALI immunologique, permettant à terme d'améliorer les mesures de prise en charge, et un nouveau modèle pour tester les hypothèses émergentes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbas, A. L., A. Pillai, S. (2015). The major histocompatibility complex (MHC). Cellular and Molecular Immunology, ELSEVIER SAUNDERS: 115-118.

Achour K., R. M. (2011). "Anatomie chirurgicale des lymphatiques du thorax." CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE **15**(1): 37-44.

Akbar, G. K., D. C. Mills and S. P. Kunapuli (1997). "Characterization of extracellular nucleotide-induced Mac-1 (alphaM beta2 integrin) surface expression on peripheral blood leukocytes." Biochem Biophys Res Commun **233**(1): 71-75.

Alvarez, D. F., J. A. King, D. Weber, E. Addison, W. Liedtke and M. I. Townsley (2006). "Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury." Circ Res **99**(9): 988-995.

Andreu, G., K. Boudjedir, J. Y. Muller, E. Pouchol, Y. Ozier, G. Fevre, C. Gautreau, J. F. Quaranta, C. Drouet, C. Rieux, P. M. Mertes, B. Clavier, M. Carlier and I. Sandid (2018). "Analysis of Transfusion-Related Acute Lung Injury and Possible Transfusion-Related Acute Lung Injury Reported to the French Hemovigilance Network From 2007 to 2013." Transfus Med Rev **32**(1): 16-27.

Andrews, A. T., C. M. Zmijewski, H. S. Bowman and J. K. Reihart (1976). "Transfusion reaction with pulmonary infiltration associated with HL-A-specific leukocyte antibodies." Am J Clin Pathol **66**(3): 483-487.

ANSM (2016). "Rapport d'activité hémovigilance 2015 " **13ème rapport des données nationales d'hémovigilance 2015** (13).

ANSM (2017). "Rapport d'activité hémovigilance 2016 " **14ème rapport des données nationales d'hémovigilance 2016**.

Arman, M. and K. Krauel (2015). "Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis." J Thromb Haemost **13**(6): 893-908.

Asaduzzaman, M., S. Lavasani, M. Rahman, S. Zhang, O. O. Braun, B. Jeppsson and H. Thorlacius (2009). "Platelets support pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis." Crit Care Med **37**(4): 1389-1396.

Balakrishna, S., W. Song, S. Achanta, S. F. Doran, B. Liu, M. M. Kaelberer, Z. Yu, A. Sui, M. Cheung, E. Leishman, H. S. Eidam, G. Ye, R. N. Willette, K. S. Thorneloe, H. B. Bradshaw, S. Matalon and S. E. Jordt (2014). "TRPV4 inhibition counteracts edema and inflammation and improves pulmonary function and oxygen saturation in chemically induced acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **307**(2): L158-172.

Barnard, R. D. (1951). "Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions." N Y State J Med **51**(20): 2399-2402.

Bartlett, R., L. Stokes and R. Sluyter (2014). "The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease." Pharmacol Rev **66**(3): 638-675.

Bayat, B., Y. Tjahjono, A. Sydykov, S. Werth, S. Hippenstiel, N. Weissmann, U. J. Sachs and S. Santoso (2013). "Anti-human neutrophil antigen-3a induced transfusion-related acute lung injury in mice by direct disturbance of lung endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(11): 2538-2548.

Berthold, T., S. Muschter, N. Schubert, J. Wesche, S. Ameling, A. Teumer, A. Reil, J. Bux, T. Bakchoul and A. Greinacher (2015). "Impact of priming on the response of neutrophils to human neutrophil alloantigen-3a antibodies." Transfusion **55**(6 Pt 2): 1512-1521.

Beutier, H., B. Hechler, O. Godon, Y. Wang, C. M. Gillis, L. de Chaisemartin, A. Gouel-Cheron, S. Magnenat, L. E. Macdonald, A. J. Murphy, N. s. group, S. Chollet-Martin, D. Longrois, C. Gachet, P. Bruhns and F. Jonsson (2018). "Platelets expressing IgG receptor FcγRIIA/CD32A determine the severity of experimental anaphylaxis." Sci Immunol **3**(22).

Bilgin, Y. M., L. M. van de Watering and A. Brand (2011). "Clinical effects of leucoreduction of blood transfusions." Neth J Med **69**(10): 441-450.

Blumberg, N., J. M. Heal, K. F. Gettings, R. P. Phipps, D. Masel, M. A. Refaai, S. A. Kirkley and L. B. Fialkow (2010). "An association between decreased cardiopulmonary complications (transfusion-related acute lung injury and transfusion-associated circulatory overload) and implementation of universal leukoreduction of blood transfusions." Transfusion **50**(12): 2738-2744.

Boillard, E., G. Pare, M. Rousseau, N. Cloutier, I. Dubuc, T. Levesque, P. Borgeat and L. Flamand (2014). "Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation." Blood **123**(18): 2854-2863.

Boulaftali, Y., P. R. Hess, T. M. Getz, A. Cholka, M. Stolla, N. Mackman, A. P. Owens, 3rd, J. Ware, M. L. Kahn and W. Bergmeier (2013). "Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation." J Clin Invest **123**(2): 908-916.

Boulaftali, Y., P. R. Hess, M. L. Kahn and W. Bergmeier (2014). "Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity." Circ Res **114**(7): 1174-1184.

Bours, M. J., E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein and P. C. Dagnelie (2006). "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation." Pharmacol Ther **112**(2): 358-404.

Boylan, B., C. Gao, V. Rathore, J. C. Gill, D. K. Newman and P. J. Newman (2008). "Identification of FcγRIIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets." Blood **112**(7): 2780-2786.

Bozza, F. A., A. M. Shah, A. S. Weyrich and G. A. Zimmerman (2009). "Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation." Am J Respir Cell Mol Biol **40**(2): 123-134.

Brass, D., M. R. Grably, N. Bronstein-Sitton, O. Gohar and A. Meir (2012). "Using antibodies against P2Y and P2X receptors in purinergic signaling research." Purinergic Signal **8**(Suppl 1): 61-79.

Brittingham, T. E. (1957). "Immunologic studies on leukocytes." Vox Sang **2**(4): 242-248.

Brittingham, T. E. and H. Chaplin, Jr. (1957). "Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets." J Am Med Assoc **165**(7): 819-825.

Bruhns, P. (2012). "Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models." Blood **119**(24): 5640-5649.

Bruhns, P. and F. Jonsson (2015). "Mouse and human FcR effector functions." Immunol Rev **268**(1): 25-51.

Burnstock, G. (2007). "Purine and pyrimidine receptors." Cell Mol Life Sci **64**(12): 1471-1483.

Burnstock, G. (2016). "P2X ion channel receptors and inflammation." Purinergic Signal **12**(1): 59-67.

Burnstock, G. and V. Ralevic (2014). "Purinergic signaling and blood vessels in health and disease." Pharmacol Rev **66**(1): 102-192.

Burstein, S. A., P. Friese, T. Downs and R. L. Mei (1992). "Characteristics of a novel rat anti-mouse platelet monoclonal antibody: application to studies of megakaryocytes." Exp Hematol **20**(10): 1170-1177.

Bux, J. (2005). "Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion." Vox Sang **89**(1): 1-10.

Bux, J. (2011). "Antibody-mediated (immune) transfusion-related acute lung injury." Vox Sang **100**(1): 122-128.

Bux, J., F. Becker, W. Seeger, D. Kilpatrick, J. Chapman and A. Waters (1996). "Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood." Br J Haematol **93**(3): 707-713.

Bux, J. and U. J. Sachs (2007). "The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI)." Br J Haematol **136**(6): 788-799.

Caudrillier, A., K. Kessenbrock, B. M. Gilliss, J. X. Nguyen, M. B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb and M. R. Looney (2012). "Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury." J Clin Invest **122**(7): 2661-2671.

Chapman, C. E., D. Stainsby, H. Jones, E. Love, E. Massey, N. Win, C. Navarrete, G. Lucas, N. Soni, C. Morgan, L. Choo, H. Cohen, L. M. Williamson and G. Serious Hazards of Transfusion Steering (2009). "Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma." Transfusion **49**(3): 440-452.

Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Deviney, C. J. Doig, F. H. Green and P. Kubes (2007). "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood." Nat Med **13**(4): 463-469.

Claushuis, T. A., L. A. van Vught, B. P. Scicluna, M. A. Wiewel, P. M. Klein Klouwenberg, A. J. Hoogendijk, D. S. Ong, O. L. Cremer, J. Horn, M. Franitza, M. R. Toliat, P. Nurnberg, A. H. Zwinderman, M. J. Bonten, M. J. Schultz, T. van der Poll, D. Molecular and C. Risk Stratification of Sepsis (2016). "Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients." Blood **127**(24): 3062-3072.

Clifford, L., Q. Jia, A. Subramanian, H. Yadav, G. A. Wilson, S. P. Murphy, J. Pathak, D. R. Schroeder and D. J. Kor (2015). "Characterizing the epidemiology of postoperative transfusion-related acute lung injury." Anesthesiology **122**(1): 12-20.

Cloutier, N., I. Allaey, G. Marcoux, K. R. Machlus, B. Mailhot, A. Zufferey, T. Levesque, Y. Becker, N. Tessandier, I. Melki, H. Zhi, G. Poirier, M. T. Rondina, J. E. Italiano, L. Flamand, S. E. McKenzie, F. Cote, B. Nieswandt, W. I. Khan, M. J. Flick, P. J. Newman, S. Lacroix, P. R. Fortin and E. Boilard (2018). "Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(7): E1550-E1559.

Cloutier, N., A. Pare, R. W. Farndale, H. R. Schumacher, P. A. Nigrovic, S. Lacroix and E. Boilard (2012). "Platelets can enhance vascular permeability." Blood **120**(6): 1334-1343.

Cognasse, F., C. Aloui, K. Anh Nguyen, H. Hamzeh-Cognasse, J. Fagan, C. A. Arthaud, M. A. Eyraud, M. Sebban, E. Fromont, B. Pozzetto, S. Laradi and O. Garraud (2016). "Platelet components associated with adverse reactions: predictive value of mitochondrial DNA relative to biological response modifiers." Transfusion **56**(2): 497-504.

Cohn, C. S., J. Stubbs, J. Schwartz, R. Francis, C. Goss, M. Cushing, B. Shaz, D. Mair, B. Brantigan and W. A. Heaton (2014). "A comparison of adverse reaction rates for PAS C versus plasma platelet units." Transfusion **54**(8): 1927-1934.

Crapo, J. D., B. E. Barry, P. Gehr, M. Bachofen and E. R. Weibel (1982). "Cell number and cell characteristics of the normal human lung." Am Rev Respir Dis **125**(6): 740-745.

Culliford, A. T., S. Thomas and F. C. Spencer (1980). "Fulminating noncardiogenic pulmonary edema. A newly recognized hazard during cardiac operations." J Thorac Cardiovasc Surg **80**(6): 868-875.

Cunningham, A. C., J. G. Zhang, J. V. Moy, S. Ali and J. A. Kirby (1997). "A comparison of the antigen-presenting capabilities of class II MHC-expressing human lung epithelial and endothelial cells." Immunology **91**(3): 458-463.

Daeron, M. (1997). "Fc receptor biology." Annu Rev Immunol **15**: 203-234.

Davoren, A., B. R. Curtis, I. A. Shulman, A. F. Mohrbacher, J. Bux, B. J. Kwiatkowska, J. G. McFarland and R. H. Aster (2003). "TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities." Transfusion **43**(5): 641-645.

de Stoppelaar, S. F., C. van 't Veer, T. A. Claushuis, B. J. Albersen, J. J. Roelofs and T. van der Poll (2014). "Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice." Blood **124**(25): 3781-3790.

de Vroege, R., W. R. Wildevuur, J. A. Muradin, D. Graves and W. van Oeveren (2007). "Washing of stored red blood cells by an autotransfusion device before transfusion." Vox Sang **92**(2): 130-135.

Dekkers, G., A. E. H. Bentlage, T. C. Stegmann, H. L. Howie, S. Lissenberg-Thunnissen, J. Zimring, T. Rispens and G. Vidarsson (2017). "Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors." MAbs **9**(5): 767-773.

Deppermann, C. (2018). "Platelets and vascular integrity." Platelets: 1-7.

Deppermann, C. and P. Kubes (2016). "Platelets and infection." Semin Immunol **28**(6): 536-545.

Dietrich, A., Y. S. M. Mederos, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaya, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova, H. Kalwa, K. Essin, O. Pinkenburg, F. C. Luft, T. Gudermann and L. Birnbaumer (2005). "Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice." Mol Cell Biol **25**(16): 6980-6989.

Doerschuk, C. M. (1999). "Neutrophil rheology and transit through capillaries and sinusoids." Am J Respir Crit Care Med **159**(6): 1693-1695.

Doerschuk, C. M. (2001). "Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs." Microcirculation **8**(2): 71-88.

Dooren, M. C., W. H. Ouwehand, A. J. Verhoeven, A. E. von dem Borne and R. W. Kuijpers (1998). "Adult respiratory distress syndrome after experimental intravenous gamma-globulin concentrate and monocyte-reactive IgG antibodies." Lancet **352**(9140): 1601-1602.

Dry, S. M., K. M. Bechard, E. L. Milford, W. H. Churchill and R. J. Benjamin (1999). "The pathology of transfusion-related acute lung injury." Am J Clin Pathol **112**(2): 216-221.

Dykes, A., D. Smallwood, T. Kotsimbos and A. Street (2000). "Transfusion-related acute lung injury (Trali) in a patient with a single lung transplant." Br J Haematol **109**(3): 674-676.

Earley, S. and J. E. Brayden (2015). "Transient receptor potential channels in the vasculature." Physiol Rev **95**(2): 645-690.

Eastlund, D. T., P. C. McGrath and P. Burkart (1988). "Platelet transfusion reaction associated with interdonor HLA incompatibility." Vox Sang **55**(3): 157-160.

Eder, A. F., B. A. Dy and E. M. O'Neill (2016). "Predicted effect of selectively testing female donors for HLA antibodies to mitigate transfusion-related acute lung injury risk from apheresis platelets." Transfusion **56**(6 Pt 2): 1608-1615.

Eder, A. F., R. Herron, A. Strupp, B. Dy, E. P. Notari, L. A. Chambers, R. Y. Dodd and R. J. Benjamin (2007). "Transfusion-related acute lung injury surveillance (2003-2005) and the potential impact of the selective use of plasma from male donors in the American Red Cross." Transfusion **47**(4): 599-607.

Eder, A. F., R. M. Herron, Jr., A. Strupp, B. Dy, J. White, E. P. Notari, R. Y. Dodd and R. J. Benjamin (2010). "Effective reduction of transfusion-related acute lung injury risk with male-predominant plasma strategy in the American Red Cross (2006-2008)." Transfusion **50**(8): 1732-1742.

Ekpenyong, A. E., N. Toepfner, E. R. Chilvers and J. Guck (2015). "Mechanotransduction in neutrophil activation and deactivation." Biochim Biophys Acta **1853**(11 Pt B): 3105-3116.

Ekpenyong, A. E., N. Toepfner, C. Fiddler, M. Herbig, W. Li, G. Cojoc, C. Summers, J. Guck and E. R. Chilvers (2017). "Mechanical deformation induces depolarization of neutrophils." Sci Adv **3**(6): e1602536.

Elliott, M. R., F. B. Chekeni, P. C. Trampont, E. R. Lazarowski, A. Kadl, S. F. Walk, D. Park, R. I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J. J. Lysiak, T. K. Harden, N. Leitinger and K. S. Ravichandran (2009). "Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance." Nature **461**(7261): 282-286.

Engelmann, B. and S. Massberg (2013). "Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity." Nat Rev Immunol **13**(1): 34-45.

Erhardt, W., A. Hebestedt, G. Aschenbrenner, B. Pichotka and G. Blumel (1984). "A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate)." Res Exp Med (Berl) **184**(3): 159-169.

FDA (2016). "Fatalities Reported to FDA Following Blood Collection and Transfusion Annual Summary for Fiscal Year 2016".

Fernandez-Borja, M., J. D. van Buul and P. L. Hordijk (2010). "The regulation of leucocyte transendothelial migration by endothelial signalling events." Cardiovasc Res **86**(2): 202-210.

Finlayson, J., D. Grey, L. Kavanagh and C. Witt (2011). "Transfusion-related acute lung injury in a neutropenic patient." Intern Med J **41**(8): 638-641.

Flesch, B. K. and J. Neppert (2002). "Transfusion-related acute lung injury caused by human leucocyte antigen class II antibody." Br J Haematol **116**(3): 673-676.

Flesch, B. K., J. Wesche, T. Berthold, T. Goldmann, M. Hundt, A. Greinacher and J. Bux (2013). "Expression of the CTL2 transcript variants in human peripheral blood cells and human tissues." Transfusion **53**(12): 3217-3223.

Florey, O. J., M. Johns, O. O. Esho, J. C. Mason and D. O. Haskard (2007). "Antiendothelial cell antibodies mediate enhanced leukocyte adhesion to cytokine-activated endothelial cells through a novel mechanism requiring cooperation between Fc{gamma}RIIIa and CXCR1/2." Blood **109**(9): 3881-3889.

Fung, Y. L., M. Kim, A. Tabuchi, R. Aslam, E. R. Speck, L. Chow, W. M. Kuebler, J. Freedman and J. W. Semple (2010). "Recipient T lymphocytes modulate the severity of antibody-mediated transfusion-related acute lung injury." Blood **116**(16): 3073-3079.

Funk, M. B., S. Guenay, A. Lohmann, O. Henseler, M. Heiden, K. M. Hanschmann and B. Keller-Stanislawski (2012). "Benefit of transfusion-related acute lung injury risk-minimization measures--German haemovigilance data (2006-2010)." Vox Sang **102**(4): 317-323.

Gajic, O., M. A. Gropper and R. D. Hubmayr (2006). "Pulmonary edema after transfusion: how to differentiate transfusion-associated circulatory overload from transfusion-related acute lung injury." Crit Care Med **34**(5 Suppl): S109-113.

Gajic, O., R. Rana, J. L. Winters, M. Yilmaz, J. L. Mendez, O. B. Rickman, M. M. O'Byrne, L. K. Evenson, M. Malinchoc, S. R. DeGoey, B. Afessa, R. D. Hubmayr and S. B. Moore (2007). "Transfusion-related acute lung injury in the critically ill: prospective nested case-control study." Am J Respir Crit Care Med **176**(9): 886-891.

Gargani, L., V. Lionetti, C. Di Cristofano, G. Bevilacqua, F. A. Recchia and E. Picano (2007). "Early detection of acute lung injury uncoupled to hypoxemia in pigs using ultrasound lung comets." Crit Care Med **35**(12): 2769-2774.

Garraud, O., S. Tariket, C. Sut, A. Haddad, C. Aloui, T. Chakroun, S. Laradi and F. Cognasse (2016). "Transfusion as an Inflammation Hit: Knowns and Unknowns." Front Immunol **7**: 534.

Gasmi, L., A. G. McLennan and S. W. Edwards (1996). "The diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil: platelet interactions during inflammation." Blood **87**(8): 3442-3449.

Gebb, S. A., J. A. Graham, C. C. Hanger, P. S. Godbey, R. L. Capen, C. M. Doerschuk and W. W. Wagner, Jr. (1995). "Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation." J Appl Physiol **79**(2): 493-497.

Geelhoed, G. W. and S. H. Bennett (1975). "'Shock lung" resulting from perfusion of canine lungs with stored bank blood." Am Surg **41**(11): 661-682.

Gillis, C., A. Gouel-Cheron, F. Jonsson and P. Bruhns (2014). "Contribution of Human FcγR2b to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies." Front Immunol **5**: 254.

Goepfert, C., C. Sundberg, J. Sevigny, K. Enyoji, T. Hoshi, E. Csizmadia and S. Robson (2001). "Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice." Circulation **104**(25): 3109-3115.

Goerge, T., B. Ho-Tin-Noe, C. Carbo, C. Benarafa, E. Remold-O'Donnell, B. Q. Zhao, S. M. Cifuni and D. D. Wagner (2008). "Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia." Blood **111**(10): 4958-4964.

Goldman, M., K. E. Webert, D. M. Arnold, J. Freedman, J. Hannon and M. A. Blajchman (2005). "Proceedings of a Consensus Conference: Towards an Understanding of TRALI." Transfusion Medicine Reviews **19**(1): 2-31.

Gonzalez-Cobos, J. C. and M. Trebak (2010). "TRPC channels in smooth muscle cells." Front Biosci (Landmark Ed) **15**: 1023-1039.

Greinacher, A., J. Wesche, E. Hammer, B. Furl, U. Volker, A. Reil and J. Bux (2010). "Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a." Nat Med **16**(1): 45-48.

Gros, A., V. Syvannarath, L. Lamrani, V. Ollivier, S. Loyau, T. Goerge, B. Nieswandt, M. Jandrot-Perrus and B. Ho-Tin-Noe (2015). "Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice." Blood **126**(8): 1017-1026.

Gulliksson, H. (2003). "Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets." Transfus Med Rev **17**(3): 209-215.

Hamanaka, K., M. Y. Jian, M. I. Townsley, J. A. King, W. Liedtke, D. S. Weber, F. G. Eyal, M. M. Clapp and J. C. Parker (2010). "TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **299**(3): L353-362.

Hamanaka, K., M. Y. Jian, D. S. Weber, D. F. Alvarez, M. I. Townsley, A. B. Al-Mehdi, J. A. King, W. Liedtke and J. C. Parker (2007). "TRPV4 initiates the acute calcium-dependent

permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(4): L923-932.

Han, S. and R. K. Mallampalli (2015). "The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections." Ann Am Thorac Soc **12**(5): 765-774.

Hechler, B. and C. Gachet (2015). "Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **35**(11): 2307-2315.

Hechler, B., B. Maitre, S. Magnenat, V. Heim, M. B. El Mdawar, C. Gachet and H. de la Salle (2016). "Platelets are dispensable for antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in the mouse." J Thromb Haemost **14**(6): 1255-1267.

Hess, J. R. (2014). "Measures of stored red blood cell quality." Vox Sang **107**(1): 1-9.

Hibbs, M. L., L. Bonadonna, B. M. Scott, I. F. McKenzie and P. M. Hogarth (1988). "Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(7): 2240-2244.

Hidalgo, A., J. Chang, J. E. Jang, A. J. Peired, E. Y. Chiang and P. S. Frenette (2009). "Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury." Nat Med **15**(4): 384-391.

Ho-Tin-Noé, B. (2018). "The multifaceted roles of platelets in inflammation and innate immunity." Platelets.

Ho-Tin-Noe, B., Y. Boulaftali and E. Camerer (2018). "Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation." Blood **131**(3): 277-288.

Ho-Tin-Noe, B., M. Demers and D. D. Wagner (2011). "How platelets safeguard vascular integrity." J Thromb Haemost **9 Suppl 1**: 56-65.

Hou, Y., N. Carrim, Y. Wang, R. C. Gallant, A. Marshall and H. Ni (2015). "Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis." J Biomed Res **29**.

Huang, L., A. Wang, Y. Hao, W. Li, C. Liu, Z. Yang, F. Zheng and M. S. Zhou (2018). "Macrophage Depletion Lowered Blood Pressure and Attenuated Hypertensive Renal Injury and Fibrosis." Front Physiol **9**: 473.

Hui, P., D. J. Cook, W. Lim, G. A. Fraser and D. M. Arnold (2011). "The frequency and clinical significance of thrombocytopenia complicating critical illness: a systematic review." Chest **139**(2): 271-278.

Immunobiology, I. W. P. o. G., P. Bierling, J. Bux, B. Curtis, B. Flesch, L. Fung, G. Lucas, M. Macek, E. Muniz-Diaz, L. Porcelijn, A. Reil, U. Sachs, R. Schuller, N. Tsuno, M. Uhrynowska, S. Urbaniak, N. Valentin, A. Wikman and B. Zupanska (2009). "Recommendations of the ISBT

Working Party on Granulocyte Immunobiology for leucocyte antibody screening in the investigation and prevention of antibody-mediated transfusion-related acute lung injury." Vox Sang **96**(3): 266-269.

Iniotaki-Theodoraki, A. (2001). "The role of HLA class I and class II antibodies in renal transplantation." Nephrol Dial Transplant **16 Suppl 6**: 150-152.

Jacobson, K. A. (2010) "P2X and P2Y Receptors." **33**.

Jacobson, K. A. and C. E. Muller (2016). "Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors." Neuropharmacology **104**: 31-49.

Janssen, B. J., T. De Celle, J. J. Debets, A. E. Brouns, M. F. Callahan and T. L. Smith (2004). "Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(4): H1618-1624.

Jonsson, F., D. A. Mancardi, W. Zhao, Y. Kita, B. Iannascoli, H. Khun, N. van Rooijen, T. Shimizu, L. B. Schwartz, M. Daeron and P. Bruhns (2012). "Human FcγRIIA induces anaphylactic and allergic reactions." Blood **119**(11): 2533-2544.

Kaczmarek, E., K. Koziak, J. Sevigny, J. B. Siegel, J. Anrather, A. R. Beaudoin, F. H. Bach and S. C. Robson (1996). "Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase." J Biol Chem **271**(51): 33116-33122.

Kao, G. S., I. G. Wood, D. M. Dorfman, E. L. Milford and R. J. Benjamin (2003). "Investigations into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI." Transfusion **43**(2): 185-191.

Kao, K. J., J. C. Scornik, W. J. Riley and C. F. McQueen (1988). "Association between HLA phenotype and HLA concentration in plasma or platelets." Hum Immunol **21**(2): 115-124.

Kapur, R., M. Kim, R. Aslam, M. J. McVey, A. Tabuchi, A. Luo, J. Liu, Y. Li, S. Shanmugabhavanathan, E. R. Speck, A. Zufferey, G. Yousef, H. Zhang, M. T. Rondina, A. S. Weyrich, L. Porcelijn, W. M. Kuebler, A. S. Slutsky and J. W. Semple (2017a). "T regulatory cells and dendritic cells protect against transfusion-related acute lung injury via IL-10." Blood **129**(18): 2557-2569.

Kapur, R., M. Kim, J. Rebetz, B. Hallstrom, J. T. Bjorkman, A. Takabe-French, N. Kim, J. Liu, S. Shanmugabhavanathan, S. Milosevic, M. J. McVey, E. R. Speck and J. W. Semple (2018). "Gastrointestinal microbiota contributes to the development of murine transfusion-related acute lung injury." Blood Adv **2**(13): 1651-1663.

Kapur, R., M. Kim, J. Rebetz, M. T. Rondina, L. Porcelijn and J. W. Semple (2017b). "Low levels of interleukin-10 in patients with transfusion-related acute lung injury." Ann Transl Med **5**(16): 339.

Kapur, R., M. Kim, M. T. Rondina, L. Porcelijn and J. W. Semple (2016). "Elevation of C-reactive protein levels in patients with transfusion-related acute lung injury." Oncotarget **7**(47): 78048-78054.

Kapur, R., M. Kim, S. Shanmugabhavananthan, J. Liu, Y. Li and J. W. Semple (2015). "C-reactive protein enhances murine antibody-mediated transfusion-related acute lung injury." Blood **126**(25): 2747-2751.

Karas, S. P., W. F. Rosse and R. J. Kurlander (1982). "Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets." Blood **60**(6): 1277-1282.

Kawamura, H., T. Kawamura, Y. Kanda, T. Kobayashi and T. Abo (2012). "Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration." Immunology **136**(4): 448-458.

Keane, C., H. Petersen, K. Reynolds, D. K. Newman, D. Cox, H. F. Jenkinson, P. J. Newman and S. W. Kerrigan (2010a). "Mechanism of outside-in α IIb β 3-mediated activation of human platelets by the colonizing Bacterium, *Streptococcus gordonii*." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2408-2415.

Keane, C., D. Tilley, A. Cunningham, A. Smolenski, A. Kadioglu, D. Cox, H. F. Jenkinson and S. W. Kerrigan (2010b). "Invasive *Streptococcus pneumoniae* trigger platelet activation via Toll-like receptor 2." J Thromb Haemost **8**(12): 2757-2765.

Kelher, M. R., A. Banerjee, F. Gamboni, C. Anderson and C. C. Silliman (2016). "Antibodies to major histocompatibility complex class II antigens directly prime neutrophils and cause acute lung injury in a two-event in vivo rat model." Transfusion **56**(12): 3004-3011.

Kelher, M. R., T. Masuno, E. E. Moore, S. Damle, X. Meng, Y. Song, X. Liang, J. Niedzinski, S. S. Geier, S. Y. Khan, F. Gamboni-Robertson and C. C. Silliman (2009). "Plasma from stored packed red blood cells and MHC class I antibodies causes acute lung injury in a 2-event in vivo rat model." Blood **113**(9): 2079-2087.

Kelton, J. G., D. Sheridan, A. Santos, J. Smith, K. Steeves, C. Smith, C. Brown and W. G. Murphy (1988). "Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies." Blood **72**(3): 925-930.

Khan, S. Y., M. R. Kelher, J. M. Heal, N. Blumberg, L. K. Boshkov, R. Phipps, K. F. Gettings, N. J. McLaughlin and C. C. Silliman (2006). "Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury." Blood **108**(7): 2455-2462.

Khoy, K., M. V. C. Nguyen, D. Masson, B. Bardy, C. Drouet and M. H. Paclet (2017). "Transfusion-related acute lung injury: critical neutrophil activation by anti-HLA-A2 antibodies for endothelial permeability." Transfusion **57**(7): 1699-1708.

Kleinman, S., T. Caulfield, P. Chan, R. Davenport, J. McFarland, S. McPhedran, M. Meade, D. Morrison, T. Pinsent, P. Robillard and P. Slinger (2004). "Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel." Transfusion **44**(12): 1774-1789.

Kleinschnitz, C., G. Stoll, M. Bendszus, K. Schuh, H. U. Pauer, P. Burfeind, C. Renne, D. Gailani, B. Nieswandt and T. Renne (2006). "Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis." J Exp Med **203**(3): 513-518.

Komatsu, T., M. Yamamoto, K. Shimokata and H. Nagura (1989). "Phenotypic characterization of alveolar capillary endothelial cells, alveolar epithelial cells and alveolar macrophages in patients with pulmonary fibrosis, with special reference to MHC class II antigens." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **415**(1): 79-90.

Kopko, P. M., C. S. Marshall, M. R. MacKenzie, P. V. Holland and M. A. Popovsky (2002). "Transfusion-related acute lung injury: report of a clinical look-back investigation." JAMA **287**(15): 1968-1971.

Kopko, P. M., T. G. Paglieroni, M. A. Popovsky, K. N. Muto, M. R. MacKenzie and P. V. Holland (2003). "TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs." Transfusion **43**(2): 177-184.

Kopko, P. M., M. A. Popovsky, M. R. MacKenzie, T. G. Paglieroni, K. N. Muto and P. V. Holland (2001). "HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury." Transfusion **41**(10): 1244-1248.

Kor, D. J., R. E. Carter, P. K. Park, E. Festic, V. M. Banner-Goodspeed, R. Hinds, D. Talmor, O. Gajic, L. B. Ware, M. N. Gong, U. S. C. Illness and G. Injury Trials Group: Lung Injury Prevention with Aspirin Study (2016). "Effect of Aspirin on Development of ARDS in At-Risk Patients Presenting to the Emergency Department: The LIPS-A Randomized Clinical Trial." JAMA **315**(22): 2406-2414.

Kunert-Keil, C., F. Bisping, J. Kruger and H. Brinkmeier (2006). "Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains." BMC Genomics **7**: 159.

Kuroki, M. and S. Minakami (1989). "Extracellular ATP triggers superoxide production in human neutrophils." Biochem Biophys Res Commun **162**(1): 377-380.

Langer, F., B. Spath, C. Fischer, M. Stolz, F. A. Ayuk, N. Kroger, C. Bokemeyer and W. Ruf (2013). "Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase." Blood **121**(12): 2324-2335.

Laufe, M. D., R. H. Simon, A. Flint and J. B. Keller (1986). "Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients." Am J Med **80**(6): 1022-1026.

Le, V. B., J. G. Schneider, Y. Boergeling, F. Berri, M. Ducatez, J. L. Guerin, I. Adrian, E. Errazuriz-Cerda, S. Frasilho, L. Antunes, B. Lina, J. C. Bordet, M. Jandrot-Perrus, S. Ludwig and B. Riteau (2015). "Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis." Am J Respir Crit Care Med **191**(7): 804-819.

Leach, M., A. J. Vora, D. A. Jones and G. Lucas (1998). "Transfusion-related acute lung injury (TRALI) following autologous stem cell transplant for relapsed acute myeloid leukaemia: a case report and review of the literature." Transfus Med **8**(4): 333-337.

Lecut, C., K. Frederix, D. M. Johnson, C. Deroanne, M. Thiry, C. Faccinetto, R. Maree, R. J. Evans, P. G. Volders, V. Bours and C. Oury (2009). "P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation." J Immunol **183**(4): 2801-2809.

Levi, M., T. van der Poll and H. R. Buller (2004). "Bidirectional relation between inflammation and coagulation." Circulation **109**(22): 2698-2704.

Li, G., S. Rachmale, M. Kojicic, K. Shahjehan, M. Malinchoc, D. J. Kor and O. Gajic (2011). "Incidence and transfusion risk factors for transfusion-associated circulatory overload among medical intensive care unit patients." Transfusion **51**(2): 338-343.

Lin, Y., C. L. Saw, B. Hannach and M. Goldman (2012). "Transfusion-related acute lung injury prevention measures and their impact at Canadian Blood Services." Transfusion **52**(3): 567-574.

Linke, B., Y. Schreiber, B. Picard-Willems, P. Slattery, R. M. Nusing, S. Harder, G. Geisslinger and K. Scholich (2017). "Activated Platelets Induce an Anti-Inflammatory Response of Monocytes/Macrophages through Cross-Regulation of PGE2 and Cytokines." Mediators Inflamm **2017**: 1463216.

Lo, S. K., K. E. Burhop, J. E. Kaplan and A. B. Malik (1988). "Role of platelets in maintenance of pulmonary vascular permeability to protein." Am J Physiol **254**(4 Pt 2): H763-771.

Logdberg, L. E., T. Vikulina, J. C. Zimring and C. D. Hillyer (2009). "Animal models of transfusion-related acute lung injury." Transfus Med Rev **23**(1): 13-24.

Looney, M. R., J. X. Nguyen, Y. Hu, J. A. Van Ziffle, C. A. Lowell and M. A. Matthay (2009). "Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury." J Clin Invest **119**(11): 3450-3461.

Looney, M. R., X. Su, J. A. Van Ziffle, C. A. Lowell and M. A. Matthay (2006). "Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury." J Clin Invest **116**(6): 1615-1623.

Lopez-Lopez, C., J. Jaramillo-Polanco, D. P. Portales-Perez, K. S. Gomez-Coronado, J. G. Rodriguez-Melendez, J. D. Cortes-Garcia, R. Espinosa-Luna, L. M. Montano and C. Barajas-Lopez (2016). "Two P2X1 receptor transcripts able to form functional channels are present in most human monocytes." Eur J Pharmacol **793**: 82-88.

Lucas, G., S. Rogers, R. Evans, H. Hambley and N. Win (2000). "Transfusion-related acute lung injury associated with interdonor incompatibility for the neutrophil-specific antigen HNA-1a." Vox Sang **79**(2): 112-115.

Lucas, G., N. Win, A. Calvert, A. Green, E. Griffin, N. Bendukidze, M. Hopkins, T. Browne, A. Poles, C. Chapman and E. Massey (2012). "Reducing the incidence of TRALI in the UK: the results of screening for donor leucocyte antibodies and the development of national guidelines." Vox Sang **103**(1): 10-17.

Maeda, K., T. Tsutamoto, A. Wada, T. Hisanaga and M. Kinoshita (1998). "Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction." Am Heart J **135**(5 Pt 1): 825-832.

Maier, T., M. Follmann, G. Hessler, H. W. Kleemann, S. Hachtel, B. Fuchs, N. Weissmann, W. Linz, T. Schmidt, M. Lohn, K. Schroeter, L. Wang, H. Rutten and C. Strubing (2015). "Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels." Br J Pharmacol **172**(14): 3650-3660.

Maisel, A. S., P. Krishnaswamy, R. M. Nowak, J. McCord, J. E. Hollander, P. Duc, T. Omland, A. B. Storrow, W. T. Abraham, A. H. Wu, P. Clopton, P. G. Steg, A. Westheim, C. W. Knudsen, A. Perez, R. Kazanegra, H. C. Herrmann, P. A. McCullough and I. Breathing Not Properly Multinational Study (2002). "Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure." N Engl J Med **347**(3): 161-167.

Maitre, B., S. Magnenat, V. Heim, C. Ravanat, R. J. Evans, H. de la Salle, C. Gachet and B. Hechler (2015). "The P2X1 receptor is required for neutrophil extravasation during lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia in mice." J Immunol **194**(2): 739-749.

Malczyk, M., A. Erb, C. Veith, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, T. Gudermann, A. Dietrich, N. Weissmann and A. Sydykov (2017). "The Role of Transient Receptor Potential Channel 6 Channels in the Pulmonary Vasculature." Front Immunol **8**: 707.

Marik, P. E. and H. L. Corwin (2008). "Acute lung injury following blood transfusion: expanding the definition." Crit Care Med **36**(11): 3080-3084.

Maslanka, K., H. Michur, B. Zupanska, M. Uhrynowska and J. Nowak (2007). "Leucocyte antibodies in blood donors and a look back on recipients of their blood components." Vox Sang **92**(3): 247-249.

Maxwell, K. F., M. S. Powell, M. D. Hulett, P. A. Barton, I. F. McKenzie, T. P. Garrett and P. M. Hogarth (1999). "Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa." Nat Struct Biol **6**(5): 437-442.

Mazzucco, L., P. Borzini and R. Gope (2010). "Platelet-derived factors involved in tissue repair-from signal to function." Transfus Med Rev **24**(3): 218-234.

McKenzie, C. G., M. Kim, T. K. Singh, Y. Milev, J. Freedman and J. W. Semple (2014). "Peripheral blood monocyte-derived chemokine blockade prevents murine transfusion-related acute lung injury (TRALI)." Blood **123**(22): 3496-3503.

McKenzie, S. E., S. M. Taylor, P. Malladi, H. Yuhan, D. L. Cassel, P. Chien, E. Schwartz, A. D. Schreiber, S. Surrey and M. P. Reilly (1999). "The role of the human Fc receptor Fc gamma

RIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model." J Immunol **162**(7): 4311-4318.

McVey, M. J., M. Kim, A. Tabuchi, V. Srbely, L. Japtok, C. Arenz, O. Rotstein, B. Kleuser, J. W. Semple and W. M. Kuebler (2017). "Acid sphingomyelinase mediates murine acute lung injury following transfusion of aged platelets." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **312**(5): L625-L637.

Middelburg, R. A., L. Porcelijn, N. Lardy, E. Briet and H. Vrieling (2011). "Prevalence of leucocyte antibodies in the Dutch donor population." Vox Sang **100**(3): 327-335.

Middelburg, R. A. and J. G. van der Bom (2015). "Transfusion-related acute lung injury not a two-hit, but a multicausal model." Transfusion **55**(5): 953-960.

Middelburg, R. A., D. Van Stein, B. Zupanska, M. Uhrynowska, O. Gajic, E. Muniz-Diaz, N. N. Galvez, C. C. Silliman, T. Krusius, J. P. Wallis, J. P. Vandenbroucke, E. Briet and J. G. Van Der Bom (2010). "Female donors and transfusion-related acute lung injury: A case-referent study from the International TRALI Unisex Research Group." Transfusion **50**(11): 2447-2454.

Middleton, E. A., A. S. Weyrich and G. A. Zimmerman (2016). "Platelets in Pulmonary Immune Responses and Inflammatory Lung Diseases." Physiol Rev **96**(4): 1211-1259.

Mikelis, C. M., M. Simaan, K. Ando, S. Fukuhara, A. Sakurai, P. Amornphimoltham, A. Masedunskas, R. Weigert, T. Chavakis, R. H. Adams, S. Offermanns, N. Mochizuki, Y. Zheng and J. S. Gutkind (2015). "RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock." Nat Commun **6**: 6725.

Moore, S. B. (2006). "Transfusion-related acute lung injury (TRALI): clinical presentation, treatment, and prognosis." Crit Care Med **34**(5 Suppl): S114-117.

Moritz, E., A. M. Norcia, J. D. Cardone, S. T. Kuwano, A. K. Chiba, M. Yamamoto and J. O. Bordin (2009). "Human neutrophil alloantigen systems." An Acad Bras Cienc **81**(3): 559-569.

Morsing, K. S. H., A. L. Peters, J. D. van Buul and A. P. J. Vlaar (2018). "The role of endothelium in the onset of antibody-mediated TRALI." Blood Rev **32**(1): 1-7.

Morty, R. E. and W. M. Kuebler (2014). "TRPV4: an exciting new target to promote alveolocapillary barrier function." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **307**(11): L817-821.

Muller, F., N. J. Mutch, W. A. Schenk, S. A. Smith, L. Esterl, H. M. Spronk, S. Schmidbauer, W. A. Gahl, J. H. Morrissey and T. Renne (2009). "Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo." Cell **139**(6): 1143-1156.

Muller, M. C., L. Porcelijn and A. P. Vlaar (2012). "Prevention of immune-mediated transfusion-related acute lung injury; from bloodbank to patient." Curr Pharm Des **18**(22): 3241-3248.

Muller, M. C., D. van Stein, J. M. Binnekade, D. J. van Rhenen and A. P. Vlaar (2015). "Low-risk transfusion-related acute lung injury donor strategies and the impact on the onset of transfusion-related acute lung injury: a meta-analysis." Transfusion **55**(1): 164-175.

Murphy, S. (1999). "The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion." Transfus Med Rev **13**(3): 153-163.

Murray, J. F. (2011). "Pulmonary edema: pathophysiology and diagnosis." Int J Tuberc Lung Dis **15**(2): 155-160, i.

Nachman, R. L. and S. Rafii (2008). "Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall." N Engl J Med **359**(12): 1261-1270.

Nakagawa, M. and P. Toy (2004). "Acute and transient decrease in neutrophil count in transfusion-related acute lung injury: cases at one hospital." Transfusion **44**(12): 1689-1694.

Nakamura, J., F. Nakajima, H. Kamada, K. Tadokoro, T. Nagai and M. Satake (2017). "Males without apparent alloimmunization could have HLA antibodies that recognize target HLA specificities expressed on cells." HLA **89**(5): 285-292.

Narick, C., D. J. Triulzi and M. H. Yazer (2012). "Transfusion-associated circulatory overload after plasma transfusion." Transfusion **52**(1): 160-165.

Nicholson, S. E., R. A. Johnson, T. Craig, J. G. Myers, W. Durante, R. M. Stewart and F. K. Johnson (2011). "Transfusion-related acute lung injury in a rat model of trauma-hemorrhage." J Trauma **70**(2): 466-471.

Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2008). "Fcγ receptors as regulators of immune responses." Nat Rev Immunol **8**(1): 34-47.

Nishimura, M., S. Hashimoto, M. Satake, H. Okazaki and K. Tadokoro (2007a). "Interference with TRALI-causing anti-HLA DR alloantibody induction of human pulmonary microvascular endothelial cell injury by purified soluble HLA DR." Vox Sang **93**(1): 78-82.

Nishimura, M., S. Hashimoto, M. Takanashi, H. Okazaki, M. Satake and K. Nakajima (2007b). "Role of anti-human leucocyte antigen class II alloantibody and monocytes in development of transfusion-related acute lung injury." Transfus Med **17**(2): 129-134.

O'Connor, D. L., M. F. Picciano and A. R. Sherman (1988). "Impact of maternal iron deficiency on quality and quantity of milk ingested by neonatal rats." Br J Nutr **60**(3): 477-485.

Okazaki, H., O. Ishikawa, T. Iijima, T. Kohira, M. Teranishi, S. Kawasaki, A. Saito, Y. Mikami, A. Sugiura, S. Hashimoto, E. Shimada, M. Uchikawa, M. Matsushashi, N. H. Tsuno, M. Tanaka, N. Kiyokawa, J. Fujimoto, T. Nagase, K. Tadokoro and K. Takahashi (2014). "Novel swine model of transfusion-related acute lung injury." Transfusion **54**(12): 3097-3107.

Ortiz-Munoz, G., B. Mallavia, A. Bins, M. Headley, M. F. Krummel and M. R. Looney (2014). "Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 regulates neutrophil-platelet aggregation and attenuates acute lung injury in mice." Blood **124**(17): 2625-2634.

Oryu, M., H. Sakamoto, Y. Ogawa, S. Tanaka and N. Sakamoto (1996). "Effects of released products from platelets on neutrophilic adhesion to endothelial cells and nylon fibers." J Leukoc Biol **60**(1): 77-80.

Ozier, Y. and P. M. Mertes (2009). "[TRALI and TACO: diagnostic and clinical management of patients]." Transfus Clin Biol **16**(2): 152-158.

Palfi, M., S. Berg, J. Ernerudh and G. Berlin (2001). "A randomized controlled trial of transfusion-related acute lung injury: is plasma from multiparous blood donors dangerous?" Transfusion **41**(3): 317-322.

Papayannopoulos, V. (2018). "Neutrophil extracellular traps in immunity and disease." Nat Rev Immunol **18**(2): 134-147.

Pasceri, V., J. T. Willerson and E. T. Yeh (2000). "Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells." Circulation **102**(18): 2165-2168.

Patel, N. N., H. Lin, C. Jones, G. Walkden, P. Ray, P. A. Sleeman, G. D. Angelini and G. J. Murphy (2013). "Interactions of cardiopulmonary bypass and erythrocyte transfusion in the pathogenesis of pulmonary dysfunction in Swine." Anesthesiology **119**(2): 365-378.

Peters, A. L., M. E. van Hezel, B. Cortjens, A. M. Tuij-de Boer, R. van Bruggen, D. de Korte, R. E. Jonkers, P. I. Bonta, S. S. Zeerleder, R. Lutter, N. P. Juffermans and A. P. Vlaar (2016). "Transfusion of 35-Day Stored RBCs in the Presence of Endotoxemia Does Not Result in Lung Injury in Humans." Crit Care Med **44**(6): e412-419.

Peters, A. L., M. E. van Hezel, N. P. Juffermans and A. P. Vlaar (2015a). "Pathogenesis of non-antibody mediated transfusion-related acute lung injury from bench to bedside." Blood Rev **29**(1): 51-61.

Peters, A. L., D. Van Stein and A. P. Vlaar (2015b). "Antibody-mediated transfusion-related acute lung injury; from discovery to prevention." Br J Haematol **170**(5): 597-614.

Peters, A. L., M. A. Vervaart, R. van Bruggen, D. de Korte, R. Nieuwland, W. Kulik and A. P. Vlaar (2017). "Non-polar lipids accumulate during storage of transfusion products and do not contribute to the onset of transfusion-related acute lung injury." Vox Sang **112**(1): 25-32.

Peters, A. M. (1998). "Just how big is the pulmonary granulocyte pool?" Clin Sci (Lond) **94**(1): 7-19.

Philipps, E. and F. G. Fleischner (1966). "Pulmonary edema in the course of a blood transfusion without overloading the circulation." Dis Chest **50**(6): 619-623.

Phipps, R. P., J. Kaufman and N. Blumberg (2001). "Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion." Lancet **357**(9273): 2023-2024.

Pierrakos, C., M. Karanikolas, S. Scolletta, V. Karamouzos and D. Velissaris (2012). "Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options." J Clin Med Res **4**(1): 7-16.

Pitchford, S., D. Pan and H. C. Welch (2017). "Platelets in neutrophil recruitment to sites of inflammation." Curr Opin Hematol **24**(1): 23-31.

Popovic, M., Y. Laumonnier, L. Burysek, T. Syrovets and T. Simmet (2008). "Thrombin-induced expression of endothelial CX3CL1 potentiates monocyte CCL2 production and transendothelial migration." J Leukoc Biol **84**(1): 215-223.

Popovic, M., K. Smiljanic, B. Dobutovic, T. Syrovets, T. Simmet and E. R. Isenovic (2012). "Thrombin and vascular inflammation." Mol Cell Biochem **359**(1-2): 301-313.

Popovsky, M. A. (2004). "Transfusion and the lung: circulatory overload and acute lung injury." Vox Sang **87 Suppl 2**: 62-65.

Popovsky, M. A. (2015). "Transfusion-related acute lung injury: three decades of progress but miles to go before we sleep." Transfusion **55**(5): 930-934.

Popovsky, M. A., M. D. Abel and S. B. Moore (1983). "Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies." Am Rev Respir Dis **128**(1): 185-189.

Popovsky, M. A. and S. B. Moore (1985). "Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury." Transfusion **25**(6): 573-577.

Pottecher, J., A. C. Roche, T. Degot, O. Helms, J. G. Hentz, J. P. Schmitt, P. E. Falcoz, N. Santelmo, F. Levy, O. Collange, B. Uring-Lambert, S. Bahram, M. Schaeffer, N. Meyer, B. Geny, P. Lassalle, P. Diemunsch, G. Massard, R. Kessler, A. Steib and S. Groupe de Transplantation Pulmonaire des Hopitaux Universitaires de (2017). "Increased Extravascular Lung Water and Plasma Biomarkers of Acute Lung Injury Precede Oxygenation Impairment in Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation." Transplantation **101**(1): 112-121.

Praetorius, H. A. and J. Leipziger (2009). "ATP release from non-excitabile cells." Purinergic Signal **5**(4): 433-446.

Ralevic, V. (2012). "P2X receptors in the cardiovascular system." Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling **1**(5): 663-674.

Rana, R., E. R. Fernandez-Perez, S. A. Khan, S. Rana, J. L. Winters, T. G. Lesnick, S. B. Moore and O. Gajic (2006). "Transfusion-related acute lung injury and pulmonary edema in critically ill patients: a retrospective study." Transfusion **46**(9): 1478-1483.

Rayes, J., S. Jadoui, S. Lax, A. Gros, S. Wichaiyo, V. Ollivier, C. V. Denis, J. Ware, B. Nieswandt, M. Jandrot-Perrus, S. P. Watson and B. Ho-Tin-Noe (2018). "The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent." Haematologica **103**(6): e256-e258.

Reesink, H. W., J. Lee, A. Keller, P. Dennington, J. Pink, R. Holdsworth, H. Schennach, M. Goldman, T. Petraszko, J. Sun, Y. Meng, K. Qian, V. Rehacek, P. Turek, T. Krusius, E. Juvonen, P. Tiberghien, D. Legrand, G. Semana, J. Y. Muller, J. Bux, A. Reil, C. K. Lin, H. Daly, E. McSweeney, L. Porretti, N. Greppi, P. Rebullà, H. Okazaki, S. A. Sanchez-Guerrero, H. A. Baptista-Gonzalez, C. Martinez-Murillo, A. Guerra-Marquez, H. Rodriguez-Moyado, R. A. Middelburg, J. C. Wiersum-Osselton, A. Brand, C. van Tilburg, D. Dinesh, J. Dagger, P. Dunn, E. Brojer, M. Letowska, K. Maslanka, E. Lachert, M. Uhrynowska, E. Zhiburt, M. Palfi, G. Berlin, B. M. Frey, L. Puig Rovira, E. Muniz-Diaz, E. Castro, C. Chapman, A. Green, E. Massey, N. Win, L. Williamson, C. C. Silliman, D. J. Chaffin, D. R. Ambruso, N. Blumberg, P. Tomasulo, K. J. Land, P. J. Norris, O. C. Illoh, R. J. Davey, R. J. Benjamin, A. F. Eder, L. McLaughlin, S. Kleinman and S. Panzer (2012). "Measures to prevent transfusion-related acute lung injury (TRALI)." Vox Sang **103**(3): 231-259.

Reil, A., B. Keller-Stanislawski, S. Gunay and J. Bux (2008). "Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors." Vox Sang **95**(4): 313-317.

Reilly, M. P., S. M. Taylor, N. K. Hartman, G. M. Arepally, B. S. Sachais, D. B. Cines, M. Poncz and S. E. McKenzie (2001). "Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA." Blood **98**(8): 2442-2447.

Renaudier, P., D. Rebibo, C. Waller, S. Schlanger, M. P. Vo Mai, N. Ounnoughene, P. Breton, S. Cheze, A. Girard, L. Hauser, J. F. Legras, A. Saillol, B. Willaert and C. Caldani (2009). "[Pulmonary complications of transfusion (TACO-TRALI)]." Transfus Clin Biol **16**(2): 218-232.

Renaudier, P., S. Schlanger, M. P. Vo Mai, N. Ounnoughene, P. Breton, S. Cheze, A. Girard, L. Hauser, J. F. Legras, H. Odent-Malaure, D. Rebibo, C. Waller, B. Willaert, C. Caldani and N. on behalf of the French Hemovigilance (2008). "Epidemiology of Transfusion Related Acute Lung Injury in France: Preliminary Results." Transfus Med Hemother **35**(2): 89-91.

Riquet, M., G. Hidden and B. Debesse (1989). "Direct lymphatic drainage of lung segments to the mediastinal nodes. An anatomic study on 260 adults." J Thorac Cardiovasc Surg **97**(4): 623-632.

Riteau, N., P. Gasse, L. Fauconnier, A. Gombault, M. Couegnat, L. Fick, J. Kanellopoulos, V. F. Quesniaux, S. Marchand-Adam, B. Crestani, B. Ryffel and I. Couillin (2010). "Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **182**(6): 774-783.

Robichaud, P. and S. H. Visovatti (2018). P2X1 Antagonism Blocks Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Contraction. ATS Conferences. San Diego Convention Center, RIDE THE LIGHTNING: BASIC AND TRANSLATIONAL STUDIES IN PULMONARY HYPERTENSION.
Rosales, C. (2017). "Fcγ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses." Front Immunol **8**: 280.

Rosenfeld, S. I., R. J. Looney, J. P. Leddy, D. C. Phipps, G. N. Abraham and C. L. Anderson (1985). "Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes." J Clin Invest **76**(6): 2317-2322.

Sachs, U. J. and J. Bux (2003). "TRALI after the transfusion of cross-match-positive granulocytes." Transfusion **43**(12): 1683-1686.

Sachs, U. J., K. Hattar, N. Weissmann, R. M. Bohle, T. Weiss, U. Sibelius and J. Bux (2006). "Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model." Blood **107**(3): 1217-1219.

Sachs, U. J., D. Kauschat and G. Bein (2005). "White blood cell-reactive antibodies are undetectable in solvent/detergent plasma." Transfusion **45**(10): 1628-1631.

Sachs, U. J., V. Kiefel, H. Kroll, G. Bein and S. Santoso (2012). "Report on the 15th International Society of Blood Transfusion platelet immunology workshop." Vox Sang **103**(4): 343-351.

Sachs, U. J., W. Wasel, B. Bayat, R. M. Bohle, K. Hattar, H. Berghofer, A. Reil, J. Bux, G. Bein, S. Santoso and N. Weissmann (2011). "Mechanism of transfusion-related acute lung injury induced by HLA class II antibodies." Blood **117**(2): 669-677.

Samapati, R., Y. Yang, J. Yin, C. Stoerger, C. Arenz, A. Dietrich, T. Gudermann, D. Adam, S. Wu, M. Freichel, V. Flockerzi, S. Uhlig and W. M. Kuebler (2012). "Lung endothelial Ca²⁺ and permeability response to platelet-activating factor is mediated by acid sphingomyelinase and transient receptor potential classical 6." Am J Respir Crit Care Med **185**(2): 160-170.

Savas, M. C., M. Ozguner, I. F. Ozguner and N. Delibas (2003). "Splenectomy attenuates intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury." J Pediatr Surg **38**(10): 1465-1470.

Schmickl, C. N., S. Mastrobuoni, F. T. Filippidis, S. Shah, J. Radic, M. H. Murad, P. Toy and O. Gajic (2015). "Male-predominant plasma transfusion strategy for preventing transfusion-related acute lung injury: a systematic review." Crit Care Med **43**(1): 205-225.

Seeger, W., U. Schneider, B. Kreuzler, E. von Witzleben, D. Walmrath, F. Grimminger and J. Neppert (1990). "Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model." Blood **76**(7): 1438-1444.

Semple, J. W., J. E. Italiano, Jr. and J. Freedman (2011). "Platelets and the immune continuum." Nat Rev Immunol **11**(4): 264-274.

Semple, J. W., M. Kim, J. Hou, M. McVey, Y. J. Lee, A. Tabuchi, W. M. Kuebler, Z. W. Chai and A. H. Lazarus (2012). "Intravenous immunoglobulin prevents murine antibody-mediated acute lung injury at the level of neutrophil reactive oxygen species (ROS) production." PLoS One **7**(2): e31357.

Serhan, C. N. (2005). "Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **73**(3-4): 141-162.

Shah, D., F. Romero, W. Stafstrom, M. Duong and R. Summer (2014). "Extracellular ATP mediates the late phase of neutrophil recruitment to the lung in murine models of acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **306**(2): L152-161.

Sheppard, C. A., L. E. Logdberg, J. C. Zimring and C. D. Hillyer (2007). "Transfusion-related acute lung injury." Hematol Oncol Clin North Am **21**(1): 163-176.

Silliman, C. C., A. J. Bjornsen, T. H. Wyman, M. Kelher, J. Allard, S. Bieber and N. F. Voelkel (2003a). "Plasma and lipids from stored platelets cause acute lung injury in an animal model." Transfusion **43**(5): 633-640.

Silliman, C. C., L. K. Boshkov, Z. Mehdizadehkashi, D. J. Elzi, W. O. Dickey, L. Podlosky, G. Clarke and D. R. Ambruso (2003b). "Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors." Blood **101**(2): 454-462.

Silliman, C. C., B. R. Curtis, P. M. Kopko, S. Y. Khan, M. R. Kelher, R. M. Schuller, B. Sannoh and D. R. Ambruso (2007). "Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model." Blood **109**(4): 1752-1755.

Silliman, C. C., Y. L. Fung, J. B. Ball and S. Y. Khan (2009). "Transfusion-related acute lung injury (TRALI): current concepts and misconceptions." Blood Rev **23**(6): 245-255.

Silliman, C. C., M. R. Kelher, S. Y. Khan, M. LaSarre, F. B. West, K. J. Land, B. Mish, L. Ceriano and S. Sowemimo-Coker (2014). "Experimental prestorage filtration removes antibodies and decreases lipids in RBC supernatants mitigating TRALI in vivo." Blood **123**(22): 3488-3495.

Silliman, C. C., S. Y. Khan, J. B. Ball, M. R. Kelher and S. Marschner (2010). "Mirasol Pathogen Reduction Technology treatment does not affect acute lung injury in a two-event in vivo model caused by stored blood components." Vox Sang **98**(4): 525-530.

Silliman, C. C. and N. J. McLaughlin (2006). "Transfusion-related acute lung injury." Blood Rev **20**(3): 139-159.

Silliman, C. C., E. E. Moore, M. R. Kelher, S. Y. Khan, L. Gellar and D. J. Elzi (2011). "Identification of lipids that accumulate during the routine storage of prestorage leukoreduced red blood cells and cause acute lung injury." Transfusion **51**(12): 2549-2554.

Silliman, C. C., A. J. Paterson, W. O. Dickey, D. F. Stroneck, M. A. Popovsky, S. A. Caldwell and D. R. Ambruso (1997). "The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study." Transfusion **37**(7): 719-726.

Silliman, C. C., N. F. Voelkel, J. D. Allard, D. J. Elzi, R. M. Tuder, J. L. Johnson and D. R. Ambruso (1998). "Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model." J Clin Invest **101**(7): 1458-1467.

Singh, I., N. Knezevic, G. U. Ahmmed, V. Kini, A. B. Malik and D. Mehta (2007). "Galphaq-TRPC6-mediated Ca²⁺ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin." J Biol Chem **282**(11): 7833-7843.

Sinnott, P., S. Bodger, A. Gupta and M. Brophy (2004). "Presence of HLA antibodies in single-donor-derived fresh frozen plasma compared with pooled, solvent detergent-treated plasma (Octaplas)." Eur J Immunogenet **31**(6): 271-274.

Smyth, S. S., R. P. McEver, A. S. Weyrich, C. N. Morrell, M. R. Hoffman, G. M. Arepally, P. A. French, H. L. Dauerman, R. C. Becker and P. Platelet Colloquium (2009). "Platelet functions beyond hemostasis." J Thromb Haemost **7**(11): 1759-1766.

Sparrow, R. L., A. Sran, G. Healey, M. F. Veale and P. J. Norris (2014). "In vitro measures of membrane changes reveal differences between red blood cells stored in saline-adenine-glucose-mannitol and AS-1 additive solutions: a paired study." Transfusion **54**(3): 560-568.

Staub, N. C., H. Nagano and M. L. Pearce (1967). "Pulmonary edema in dogs, especially the sequence of fluid accumulation in lungs." J Appl Physiol **22**(2): 227-240.

Stein, M. M., C. L. Hrusch, A. I. Sperling and C. Ober (2018). "Effects of an FcγRIIA polymorphism on leukocyte gene expression and cytokine responses to anti-CD3 and anti-CD28 antibodies." Genes Immun.

Stolk, J., T. J. Hiltermann, J. H. Dijkman and A. J. Verhoeven (1994). "Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol." Am J Respir Cell Mol Biol **11**(1): 95-102.

Strait, R., B. Susskind and F. Finkelman (2005). "Murine TRALI: 1-hit vs. 2-hit model." Human Immunology **66**(8): 18.

Strait, R. T., W. Hicks, N. Barasa, A. Mahler, M. Khodoun, J. Kohl, K. Stringer, D. Witte, N. Van Rooijen, B. M. Susskind and F. D. Finkelman (2011). "MHC class I-specific antibody binding to nonhematopoietic cells drives complement activation to induce transfusion-related acute lung injury in mice." J Exp Med **208**(12): 2525-2544.

Sugiyama, M. G., A. Gamage, R. Zyla, S. M. Armstrong, S. Advani, A. Advani, C. Wang and W. L. Lee (2016). "Influenza Virus Infection Induces Platelet-Endothelial Adhesion Which Contributes to Lung Injury." J Virol **90**(4): 1812-1823.

Summers, C., N. R. Singh, J. F. White, I. M. Mackenzie, A. Johnston, C. Solanki, K. K. Balan, A. M. Peters and E. R. Chilvers (2014). "Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome." Thorax **69**(7): 623-629.

Tariket, S., C. Sut, H. Hamzeh-Cognasse, S. Laradi, B. Pozzetto, O. Garraud and F. Cognasse (2016). "Transfusion-related acute lung injury: transfusion, platelets and biological response modifiers." Expert Rev Hematol **9**(5): 497-508.

Tauseef, M., N. Knezevic, K. R. Chava, M. Smith, S. Sukriti, N. Gianaris, A. G. Obukhov, S. M. Vogel, D. E. Schraufnagel, A. Dietrich, L. Birnbaumer, A. B. Malik and D. Mehta (2012). "TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation." J Exp Med **209**(11): 1953-1968.

Taylor, S. M., M. P. Reilly, A. D. Schreiber, P. Chien, J. R. Tuckosh and S. E. McKenzie (2000). "Thrombosis and shock induced by activating antiplatelet antibodies in human Fc gamma RIIA transgenic mice: the interplay among antibody, spleen, and Fc receptor." Blood **96**(13): 4254-4260.

Thomas, G. M., C. Carbo, B. R. Curtis, K. Martinod, I. B. Mazo, D. Schatzberg, S. M. Cifuni, T. A. Fuchs, U. H. von Andrian, J. H. Hartwig, R. H. Aster and D. D. Wagner (2012). "Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice." Blood **119**(26): 6335-6343.

Thomas, M. R. and R. F. Storey (2015). "The role of platelets in inflammation." Thromb Haemost **114**(3): 449-458.

Thompson, J. S., C. D. Severson, M. J. Parmely, B. L. Marmorstein and A. Simmons (1971). "Pulmonary "hypersensitivity" reactions induced by transfusion of non-HL-A leukoagglutinins." N Engl J Med **284**(20): 1120-1125.

Thorneloe, K. S., M. Cheung, W. Bao, H. Alsaïd, S. Lenhard, M. Y. Jian, M. Costell, K. Maniscalco-Hauk, J. A. Krawiec, A. Olzinski, E. Gordon, I. Lozinskaya, L. Elefante, P. Qin, D. S. Matasic, C. James, J. Tunstead, B. Donovan, L. Kallal, A. Waszkiewicz, K. Vaidya, E. A. Davenport, J. Larkin, M. Burgert, L. N. Casillas, R. W. Marquis, G. Ye, H. S. Eidam, K. B. Goodman, J. R. Toomey, T. J. Roethke, B. M. Jucker, C. G. Schnackenberg, M. I. Townsley, J. J. Lepore and R. N. Willette (2012). "An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure." Sci Transl Med **4**(159): 159ra148.

Townsley, M. I. (2012). "Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins." Compr Physiol **2**(1): 675-709.

Toy, P., O. Gajic, P. Bacchetti, M. R. Looney, M. A. Gropper, R. Hubmayr, C. A. Lowell, P. J. Norris, E. L. Murphy, R. B. Weiskopf, G. Wilson, M. Koenigsberg, D. Lee, R. Schuller, P. Wu, B. Grimes, M. J. Gandhi, J. L. Winters, D. Mair, N. Hirschler, R. Sanchez Rosen, M. A. Matthay and T. S. Group (2012). "Transfusion-related acute lung injury: incidence and risk factors." Blood **119**(7): 1757-1767.

Toy, P., K. M. Hollis-Perry, J. Jun and M. Nakagawa (2004). "Recipients of blood from a donor with multiple HLA antibodies: a lookback study of transfusion-related acute lung injury." Transfusion **44**(12): 1683-1688.

Toy, P., S. H. Kleinman and M. R. Looney (2017). "Proposed revised nomenclature for transfusion-related acute lung injury." Transfusion **57**(3): 709-713.

Triulzi, D. J., S. Kleinman, R. M. Kakaiya, M. P. Busch, P. J. Norris, W. R. Steele, S. A. Glynn, C. D. Hillyer, P. Carey, J. L. Gottschall, E. L. Murphy, J. A. Rios, P. M. Ness, D. J. Wright, D. Carrick and G. B. Schreiber (2009). "The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy." Transfusion **49**(9): 1825-1835.

Tsuboi, N., K. Asano, M. Lauterbach and T. N. Mayadas (2008). "Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases." Immunity **28**(6): 833-846.

Tuinman, P. R., M. C. Gerards, G. Jongsma, A. P. Vlaar, L. Boon and N. P. Juffermans (2011). "Lack of evidence of CD40 ligand involvement in transfusion-related acute lung injury." Clin Exp Immunol **165**(2): 278-284.

Tuinman, P. R., A. P. Vlaar, J. M. Binnenkade and N. P. Juffermans (2012). "The effect of aspirin in transfusion-related acute lung injury in critically ill patients." Anaesthesia **67**(6): 594-599.

Tung, J. P., J. F. Fraser, M. Nataatmadja, K. I. Colebourne, A. G. Barnett, K. M. Glenister, A. Y. Zhou, P. Wood, C. C. Silliman and Y. L. Fung (2012). "Age of blood and recipient factors determine the severity of transfusion-related acute lung injury (TRALI)." Crit Care **16**(1): R19.

Tung, J. P., Y. L. Fung, M. Nataatmadja, K. I. Colebourne, H. M. Esmaeel, K. Wilson, A. G. Barnett, P. Wood, C. C. Silliman and J. F. Fraser (2011). "A novel in vivo ovine model of transfusion-related acute lung injury (TRALI)." Vox Sang **100**(2): 219-230.

Valenzuela, N. M., A. Mulder and E. F. Reed (2013). "HLA class I antibodies trigger increased adherence of monocytes to endothelial cells by eliciting an increase in endothelial P-selectin and, depending on subclass, by engaging FcγRs." J Immunol **190**(12): 6635-6650.

Valenzuela, N. M. and E. F. Reed (2013). "Antibodies in transplantation: the effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury." Methods Mol Biol **1034**: 41-70.

Van Buren, N. L., D. F. Stroncek, M. E. Clay, J. McCullough and A. P. Dalmasso (1990). "Transfusion-related acute lung injury caused by an NB2 granulocyte-specific antibody in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura." Transfusion **30**(1): 42-45.

Van de Velde, N. C., P. L. Mottram, M. S. Powell, B. Lim, R. Holmdahl and P. M. Hogarth (2010). "Transgenic mice expressing human FcγRIIa have enhanced sensitivity to induced autoimmune arthritis as well as elevated Th17 cells." Immunol Lett **130**(1-2): 82-88.

van den Boogaard, F. E., M. Schouten, S. F. de Stoppelaar, J. J. Roelofs, X. Brands, M. J. Schultz, C. van't Veer and T. van der Poll (2015). "Thrombocytopenia impairs host defense during murine *Streptococcus pneumoniae* pneumonia." Crit Care Med **43**(3): e75-83.

van der Heijden, J., J. Geissler, E. van Mirre, M. van Deuren, J. W. van der Meer, A. Salama, T. K. van den Berg, D. Roos and T. W. Kuijpers (2013). "A novel splice variant of FcγRIIIa: a risk factor for anaphylaxis in patients with hypogammaglobulinemia." J Allergy Clin Immunol **131**(5): 1408-1416 e1405.

van der Heijden, J., S. Nagelkerke, X. Zhao, J. Geissler, T. Rispens, T. K. van den Berg and T. W. Kuijpers (2014). "Haplotypes of FcγRIIIa and FcγRIIIb polymorphic variants influence IgG-mediated responses in neutrophils." J Immunol **192**(6): 2715-2721.

van Hout, F. M. A., P. F. van der Meer, J. C. Wiersum-Osselton, R. A. Middelburg, M. R. Schipperus, J. G. van der Bom and J. L. Kerkhoffs (2018). "Transfusion reactions after transfusion of platelets stored in PAS-B, PAS-C, or plasma: a nationwide comparison." Transfusion.

Vassort, G. and J. Fauconier (2008). "[Transient receptor potential, TRP channels: a new family of channels broadly expressed]." Med Sci (Paris) **24**(2): 163-168.

Verhoef, J. J., A. D. Barendrecht, K. F. Nickel, K. Dijkxhoorn, E. Kenne, L. Labberton, O. J. McCarty, R. Schiffelers, H. F. Heijnen, A. P. Hendrickx, H. Schellekens, M. H. Fens, S. de Maat, T. Renne and C. Maas (2017). "Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation." Blood **129**(12): 1707-1717.

Villalta, P. C., P. Rocic and M. I. Townsley (2014). "Role of MMP2 and MMP9 in TRPV4-induced lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **307**(8): L652-659.

Villalta, P. C. and M. I. Townsley (2013). "Transient receptor potential channels and regulation of lung endothelial permeability." Pulm Circ **3**(4): 802-815.

Visovatti, S. H., M. C. Hyman, S. N. Goonewardena, A. C. Anyanwu, Y. Kanthi, P. Robichaud, J. Wang, D. Petrovic-Djergovic, R. Rattan, C. F. Burant and D. J. Pinsky (2016). "Purinergic dysregulation in pulmonary hypertension." Am J Physiol Heart Circ Physiol **311**(1): H286-298.

Vlaar, A. P., J. J. Hofstra, R. M. Determann, D. P. Veelo, F. Paulus, W. Kulik, J. Korevaar, B. A. de Mol, M. M. Koopman, L. Porcelijn, J. M. Binnekade, M. B. Vroom, M. J. Schultz and N. P. Juffermans (2011). "The incidence, risk factors, and outcome of transfusion-related acute lung injury in a cohort of cardiac surgery patients: a prospective nested case-control study." Blood **117**(16): 4218-4225.

Vlaar, A. P., J. J. Hofstra, W. Kulik, H. van Lenthe, R. Nieuwland, M. J. Schultz, M. M. Levi, J. J. Roelofs, A. T. Tool, D. de Korte and N. P. Juffermans (2010a). "Supernatant of stored platelets causes lung inflammation and coagulopathy in a novel in vivo transfusion model." Blood **116**(8): 1360-1368.

Vlaar, A. P., J. J. Hofstra, M. Levi, W. Kulik, R. Nieuwland, A. T. Tool, M. J. Schultz, D. de Korte and N. P. Juffermans (2010b). "Supernatant of aged erythrocytes causes lung inflammation and coagulopathy in a "two-hit" in vivo syngeneic transfusion model." Anesthesiology **113**(1): 92-103.

Vlaar, A. P., E. K. Wolthuis, J. J. Hofstra, J. J. Roelofs, L. Boon, M. J. Schultz, R. Lutter and N. P. Juffermans (2010c). "Mechanical ventilation aggravates transfusion-related acute lung injury induced by MHC-I class antibodies." Intensive Care Med **36**(5): 879-887.

Vlaar, A. P. J. and N. P. Juffermans (2013). "Transfusion-related acute lung injury: a clinical review." The Lancet **382**(9896): 984-994.

Wakamoto, S., M. Fujihara, H. Sakagawa, D. Takahashi, K. Niwa, M. Morioka, S. Sato, T. Kato, H. Azuma and H. Ikeda (2008). "Endothelial permeability is increased by the supernatant of peripheral blood mononuclear cells stimulated with HLA Class II antibody." Transfusion **48**(10): 2060-2068.

Wang, T., Z. Liu, Z. Wang, M. Duan, G. Li, S. Wang, W. Li, Z. Zhu, Y. Wei, D. C. Christiani, A. Li and X. Zhu (2014). "Thrombocytopenia is associated with acute respiratory distress syndrome mortality: an international study." PLoS One **9**(4): e94124.

Ward, H. N. (1970). "Pulmonary infiltrates associated with leukoagglutinin transfusion reactions." Ann Intern Med **73**(5): 689-694.

Ware, L. B. and M. A. Matthay (2005). "Clinical practice. Acute pulmonary edema." N Engl J Med **353**(26): 2788-2796.

Warmerdam, P. A., J. G. van de Winkel, A. Vlug, N. A. Westerdaal and P. J. Capel (1991). "A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding." J Immunol **147**(4): 1338-1343.

Warner, M. A., I. J. Welsby, P. J. Norris, C. C. Silliman, S. Armour, E. D. Wittwer, P. J. Santrach, L. A. Meade, L. M. Liedl, C. M. Nieuwenkamp, B. Douthit, C. M. van Buskirk, P. J. Schulte, R. E. Carter and D. J. Kor (2017). "Point-of-care washing of allogeneic red blood cells for the prevention of transfusion-related respiratory complications (WAR-PRC): a protocol for a multicenter randomised clinical trial in patients undergoing cardiac surgery." BMJ Open **7**(8): e016398.

Weisberg, S. P., B. H. Shaz, G. Tumer, C. C. Silliman, M. R. Kelher and C. S. Cohn (2018). "PAS-C platelets contain less plasma protein, lower anti-A and anti-B titers, and decreased HLA antibody specificities compared to plasma platelets." Transfusion.

Weissmann, N., A. Dietrich, B. Fuchs, H. Kalwa, M. Ay, R. Dumitrascu, A. Olschewski, U. Storch, M. Mederos y Schnitzler, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, O. Pinkenburg, W. Seeger, F. Grimminger and T. Gudermann (2006). "Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19093-19098.

Weissmann, N., A. Sydykov, H. Kalwa, U. Storch, B. Fuchs, M. Mederos y Schnitzler, R. P. Brandes, F. Grimminger, M. Meissner, M. Freichel, S. Offermanns, F. Veit, O. Pak, K. H. Krause, R. T. Schermuly, A. C. Brewer, H. H. Schmidt, W. Seeger, A. M. Shah, T. Gudermann, H. A. Ghofrani and A. Dietrich (2012). "Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice." Nat Commun **3**: 649.

Wenzel, F., W. Gunther, A. Baertl, R. Lasshofer, J. Rox, J. C. Fischer and G. Giers (2011). "Comparison of soluble CD40L concentrations and release capacities in apheresis and prestorage pooled platelet concentrates." Clin Hemorheol Microcirc **47**(4): 269-278.

Weyrich, A. S. and G. A. Zimmerman (2013). "Platelets in lung biology." Annu Rev Physiol **75**: 569-591.

Wiersum-Osselton, J. C., R. A. Middelburg, E. A. Beckers, A. J. van Tilborgh, P. Y. Zijlker-Jansen, A. Brand, J. G. van der Bom and M. R. Schipperus (2011). "Male-only fresh-frozen plasma for transfusion-related acute lung injury prevention: before-and-after comparative cohort study." Transfusion **51**(6): 1278-1283.

Win, N., C. E. Chapman, K. M. Bowles, A. Green, S. Bradley, D. Edmondson and J. P. Wallis (2008). "How much residual plasma may cause TRALI?" Transfus Med **18**(5): 276-280.

Wolf, C. F. and V. C. Canale (1976). "Fatal pulmonary hypersensitivity reaction to HL-A incompatible blood transfusion: report of a case and review of the literature." Transfusion **16**(2): 135-140.

Wyman, T. H., A. J. Bjornsen, D. J. Elzi, C. W. Smith, K. M. England, M. Kelher and C. C. Silliman (2002). "A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release." Am J Physiol Cell Physiol **283**(6): C1592-1603.

Xia, Y., Z. Fu, J. Hu, C. Huang, O. Paudel, S. Cai, W. Liedtke and J. S. Sham (2013). "TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension." Am J Physiol Cell Physiol **305**(7): C704-715.

Xu, J., X. Zhang, R. Pelayo, M. Monestier, C. T. Ammollo, F. Semeraro, F. B. Taylor, N. L. Esmon, F. Lupu and C. T. Esmon (2009). "Extracellular histones are major mediators of death in sepsis." Nat Med **15**(11): 1318-1321.

Yadav, H. and D. J. Kor (2015). "Platelets in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **309**(9): L915-923.

Yamamoto, K., R. Korenaga, A. Kamiya, Z. Qi, M. Sokabe and J. Ando (2000). "P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(1): H285-292.

Yin, J., L. Michalick, C. Tang, A. Tabuchi, N. Goldenberg, Q. Dan, K. Awwad, L. Wang, L. Erfinanda, G. Nouailles, M. Witzernath, A. Vogelzang, L. Lv, W. L. Lee, H. Zhang, O. Rotstein, A. Kapus, K. Szaszi, I. Fleming, W. B. Liedtke, H. Kuppe and W. M. Kuebler (2016). "Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Neutrophil Activation and Acute Lung Injury." Am J Respir Cell Mol Biol **54**(3): 370-383.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Yomtovian, R., W. Kline, C. Press, M. Clay, H. Engman, D. Hammerschmidt and J. McCullough (1984). "Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of a neutrophil-specific antibody." Lancet **1**(8371): 244-246.

Yu, Y., I. Fantozzi, C. V. Remillard, J. W. Landsberg, N. Kunichika, O. Platoshyn, D. D. Tigno, P. A. Thistlethwaite, L. J. Rubin and J. X. Yuan (2004). "Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13861-13866.

Zarbock, A., K. Singbartl and K. Ley (2006). "Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation." J Clin Invest **116**(12): 3211-3219.

Zhi, H., L. Rauova, V. Hayes, C. Gao, B. Boylan, D. K. Newman, S. E. McKenzie, B. C. Cooley, M. Poncz and P. J. Newman (2013). "Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo." Blood **121**(10): 1858-1867.

Zoon, K. C. (2011) "Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI)."

Études des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement du syndrome de détresse respiratoire post-transfusionnel (TRALI)

Résumé

Le TRALI immunologique est un syndrome de détresse respiratoire aiguë rare, provoqué par la présence d'alloanticorps dans les produits transfusés. Il est classiquement étudié au moyen d'un modèle de souris qui reçoivent un anticorps monoclonal contre les molécules d'histocompatibilité de classe I, anti-H-2^d. Or les mécanismes qui conduisent au TRALI restent encore largement incompris. Dans ce travail de thèse, je montre que l'inhibition des récepteurs P2X₁ à l'ATP et du canal calcique TRPC6, diminue le développement des œdèmes péri-artériolaires pulmonaires lors d'un TRALI, suggérant un rôle des cellules musculaires lisses. Les expériences de déplétions cellulaires spécifiques montrent que les plaquettes et les neutrophiles ne sont pas nécessaires pour l'initiation du TRALI, contrairement à ce qui avait été montré par d'autres équipes. Les monocytes et/ou les macrophages sont par contre indispensables. J'ai aussi développé un modèle de TRALI immunologique utilisant des souris transgéniques pour le récepteur humain FcγRIIA, et un anticorps recombinant muni d'une partie Fc d'IgG1 humaine. Mes travaux montrent que le TRALI est plus sévère dans les souris transgéniques, accompagné d'une activation plus importante des plaquettes et des neutrophiles. Ce modèle permet d'envisager l'étude des mécanismes du TRALI sous un nouvel angle, plus proche de la physiopathologie humaine, ainsi que celle de la contribution des parties Fc des anticorps humains.

Mots-clés : TRALI, œdème pulmonaire, plaquettes, récepteur P2X₁, CD32A.

Résumé en anglais

Immunological TRALI is a rare acute respiratory distress syndrome induced by the presence of alloantibodies in transfused products. A mouse model using a monoclonal antibody against the major histocompatibility complex class I, anti-H-2^d, is usually used to study its mechanisms. Nevertheless, there is a lack in our understanding regarding the course of events. In this thesis, I show that the inhibitions of the ATP-gated receptor P2X₁ and of the TRPC6 channel reduce the development of periarteriolar pulmonary edema occurring during TRALI, pointing to a role of smooth muscles cells. Specific cell depletions show that platelets and neutrophils are dispensable for TRALI initiation, in contrast to previous reports. Monocytes and/or macrophages are however necessary. I also developed a model of immune TRALI using transgenic mice expressing the human receptor FcγRIIA, and a recombinant antibody with a human IgG1-Fc fragment. My work reveal a more severe TRALI response in transgenic mice, with enhanced activation of platelets and neutrophils. This model allow a finer study of mechanisms underlying TRALI, moving towards the human actors of the pathology. We can also use this novel approach to assess the contribution of human Fc fragment.

Key words: TRALI, lung edema, platelets, P2X₁ receptor, CD32A.