



HAL
open science

Le produit sanguin labile, son impact immunologique dans l'oedème lésionnel pulmonaire TRALI

Kathy Khoy

► **To cite this version:**

Kathy Khoy. Le produit sanguin labile, son impact immunologique dans l'oedème lésionnel pulmonaire TRALI. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01341708

HAL Id: dumas-01341708

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01341708>

Submitted on 18 Jul 2016

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.

AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

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

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

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

Année : 2014

N°

Le produit sanguin labile, son impact immunologique dans l'œdème lésionnel pulmonaire TRALI

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE (IPR)

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de GRENOBLE

Et soutenue publiquement le 22 Octobre 2014

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Kathy KHOY

[Données à caractère personnel]

JURY

Président du jury : Madame le Docteur Delphine Aldebert

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Christian Drouet

Membres : Monsieur le Professeur Philippe Zaoui

Monsieur le Professeur Guillaume Monneret

Madame le Docteur Denise Ponard

Madame le Docteur Isabelle Hininger-Favier

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT****Année 2013-2014****ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE**

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM
PU-PH	ALLENET	Benoît	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
DCE	BEL	Coralie	D4	-
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLETT	Béatrice	D5	-
DCE	BERTHOIN	Lionel	D1	-
DCE	BOSSON	Anthony	D4	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoît	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
DCE	CAVAREC	Fanny	D5	-
AHU	CHANOINE	Sébastien	D5	IAB

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
DCE	CHRISTEN	Aude	D3	-
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
DCE	CRESPO	Xenia	D1	-
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB
MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
ATER	FALLECKER	Catherine	D5	HP2-Inserm U1042
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
AHU	FILIOL (VAN NOOLEN)	Laetitia	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
AHU	GARNAUD	Cécile	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
ATER	GRAS	Emmanuelle	D5	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV

DCE	LECERF-SCHIMDT	Florine	D3	-
ATER	LEHMANN	Sylvia	D1	-
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
DCE	MELAINE	Feriel	D1	-
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
DCE	MORAND	Jessica	D5	-
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
DCE	OUIDIR	Marion	D3	-
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
DCE	THOMAS	Amandine	D5	-
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT)»**

D2 : Département «Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

Mise à jour le 26 février 2014

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et

Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
et de Cognition et Ontogenèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maîtres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

Je remercie monsieur le Professeur Christian Drouet de m'avoir accueillie au sein de l'équipe du GREPI tout au long de mon internat.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma gratitude : aux membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail et dont les remarques vont permettre d'améliorer les perspectives de ce travail.

Je remercie madame le Docteur Marie-Hélène Palet qui est de loin la source de ce travail. Je te remercie sincèrement pour ton encadrement et de supporter ma maladresse quotidienne.

Je remercie madame le Docteur Dominique Masson. Tu sais que tu es comme ma seconde maman : merci pour l'aide et le soutien que tu m'apportes... J'apprécierai toujours nos discussions « minute ».

Je tiens à remercier tout particulièrement le laboratoire HLA : les biologistes, tous les techniciens ainsi que les secrétaires. Merci pour votre accueil chaleureux et les bons instants de rigolades.

Je remercie l'ensemble du GREPI : aux grands moments de partages scientifiques (et plus), de folies, de chamailleries, aux visites dans « ma chambre » qui me font enlever mes boules Quies.

A tous mes amis parisiens, grenoblois, lyonnais, suisses, clermontois, vésuliens... Aux rencontres fabuleuses et à l'amitié qui perdure...

A ma belle-famille

A ma grande famille

A Minh et à ce que tu représentes

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	6
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE.....	12
PARTIE 1 : Produit sanguin labile : le médicament de la transfusion sanguine	12
1. L'activité transfusionnelle	12
1.1. La transfusion sanguine	12
1.2. Les indications de la transfusion sanguine	13
1.2.1. Qui peut donner ?	13
1.2.2. Les indications des produits sanguins labiles	14
1.2.3. Les pathologies soignées grâce au don du sang.....	15
1.3. La sécurisation du don	18
1.3.1. Le prélèvement	18
1.3.2. La préparation et transformation	18
1.3.3. La qualification biologique du don (QBD)	18
1.3.4. La distribution et la délivrance.....	19
2. Les accidents transfusionnels	20
2.1. L'hémovigilance	20
2.2. Les effets indésirables et incidents déclarés	21
2.2.1. Effet indésirable du receveur (EIR)	21
2.2.2. Incident grave de la chaîne transfusionnelle (IG)	22
2.2.3. Effet indésirable grave du donneur (EIGD)	23
2.2.4. Incident post-don (IPD)	23
2.3. Evolution du nombre de TRALI déclaré de 2000 à 2012	23
PARTIE 2 : Le TRALI (Transfusion-related Acute Lung Injury)	26
Chapitre 1 : Du diagnostic à la prévention.....	26
1. Epidémiologie	26
2. Diagnostic clinique	27
3. Les produits sanguins mis en cause	29
4. Physiopathologie du TRALI.....	30
5. Le protagoniste cellulaire dans le TRALI : le polynucléaire neutrophile	31

5.1. Généralités.....	31
5.2. La formation du neutrophile.....	32
5.3. La migration du neutrophile.....	32
5.4. Les fonctions du neutrophile.....	33
5.5. Le complexe NADPH oxydase.....	36
5.5.1. Structure de la NADPH oxydase.....	36
5.5.2. Activation de la NADPH oxydase et dérivés réactifs de l'oxygène.....	38
5.6. Les médiateurs produits par les PMN.....	38
6. Le diagnostic différentiel du TRALI.....	39
6.1. L'œdème pulmonaire aigu de surcharge.....	39
6.2. Le choc anaphylactique post-transfusionnel.....	40
6.3. Le choc toxi-infectieux.....	40
6.4. Le choc hémolytique par incompatibilité ABO.....	40
7. Evolution et traitement.....	40
8. Stratégies et prévention.....	41
8.1. La déleucocytation.....	41
8.2. La déplasmatisation.....	41
8.3. L'élimination des donneurs impliqués et/ou à risque dans le déclenchement du TRALI chez le receveur.....	41
Chapitre 2 : Les mécanismes physiopathologiques du TRALI.....	42
1. Les hypothèses pathogéniques.....	42
1.1. Mécanisme en une étape.....	42
1.2. Mécanisme en deux étapes.....	43
1.3. Hypothèse d'un seuil de déclenchement du TRALI.....	43
2. Les deux étapes de la survenue du TRALI.....	44
2.1. La première étape.....	44
2.2. La deuxième étape.....	45
3. Les facteurs de risque chez le patient transfusé.....	46
4. Les facteurs activant les PMN et les cellules endothéliales des capillaires.....	46
4.1. Le conflit immunologique.....	46
4.1.1. Les anticorps anti-HLA.....	47
4.1.1.1. Le système HLA.....	47
4.1.1.2. L'allo-immunisation.....	50
4.1.1.3. Les anticorps anti-HLA de classe I.....	51
4.1.1.4. Les anticorps anti-HLA de classe II.....	52
4.1.2. Les anticorps anti-HNA.....	53

4.2. Le conflit non immunologique.....	54
4.2.1. Les lipides activateurs.....	54
4.2.2. Les autres facteurs non spécifiques.....	54
4.3. Un cas particulier : le TRALI inversé.....	55
5. Modèles expérimentaux.....	56
MATERIEL ET METHODES.....	59
1. Préparations biologiques.....	59
1.1. Purification de neutrophiles humains à partir de sang frais.....	59
1.1.1. Prélèvement de tube de sang à l'Etablissement Français du Sang.....	59
1.1.2. Technique par gradient de Ficoll.....	59
1.2. Séparation des cellules mononucléées.....	60
1.2.1. Séparation des lymphocytes totaux.....	60
1.2.2. Séparation des lymphocytes T.....	60
2. Typage HLA.....	60
2.1. Nomenclature HLA.....	60
2.2. Technique de sérologie.....	61
2.2.1. Lymphocytotoxicité complément-dépendante (LCT) : principe.....	61
2.2.2. Protocole.....	62
2.3. Technique de biologie moléculaire.....	63
2.3.1. Principe du Sequencing based typing (SBT).....	64
2.3.2. Extraction d'ADN génomique.....	65
2.3.3. Amplification des gènes HLA par PCR pour la méthode de SBT.....	66
2.3.4. Contrôle d'amplification par migration sur gel d'agarose 1%.....	67
2.3.5. Purification des produits d'amplification.....	67
2.3.6. Réaction de séquençage.....	67
2.3.7. Purification des réactions de séquence obtenues.....	69
2.3.8. Séparation des séquences par électrophorèse capillaire.....	69
3. Dépistage et Recherche d'anticorps anti-HLA.....	70
3.1. Choix des échantillons de sérum pour l'essai.....	70
3.1.1. Sélection des sérums ne présentant pas d'anticorps anti-HLA.....	70
3.1.2. Sélection des sérums présentant des anticorps anti-HLA.....	70
3.2. La lymphocytotoxicité-complément dépendante : technique de référence.....	71
3.3. Technique Luminex.....	71
4. Analyse des protéines.....	74
4.1. Purification des Immunoglobulines G à partir de sérum.....	74

4.1.1. Chromatographie d'affinité	74
4.1.2. Dessalage.....	74
4.1.3. Dialyse sur membrane poreuse.....	74
4.2. Dosage des protéines	75
4.2.1. Mesure absorbance à 280nm.....	75
4.2.2. Méthode de Bradford	75
4.3. Electrophorèse en milieu dénaturant (SDS- PAGE)	75
4.3.1. Préparation du gel.....	76
4.3.2. Préparation des échantillons	76
4.3.3. Migration par électrophorèse des échantillons	76
4.3.4. Révélation des protéines sur gel de polyacrylamide.....	77
5. Mesure de l'activité NADPH oxydase.....	77
5.1. Principe.....	77
5.2. Protocole.....	78
6. Cytométrie en flux	78
6.1. Principe.....	78
6.2. Protocole.....	79
7. Méthodes statistiques	79
RESULTATS	80
PARTIE 1 : LES OUTILS DE TRAVAIL	80
1. Du dépistage des anticorps anti-HLA à leur purification	80
1.1. Dépistage et recherche d'anticorps anti-HLA	80
1.2. Préparation des immunoglobulines G.....	83
2. Identification des antigènes HLA : phénotypage HLA.....	84
PARTIE 2 : IMPACT DES ANTICORPS ANTI-HLA SUR LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES.....	87
1. Activation des neutrophiles par les immunoglobulines G.....	87
1.1. Activation des neutrophiles de typage non HLA-A2.....	87
1.2. Activation des neutrophiles de typage HLA-A2 par les immunoglobulines G	88
2. Effet des immunoglobulines G sur les neutrophiles préalablement sensibilisés : « le priming »	91
2.1. Mesure de l'activité oxydase des neutrophiles sensibilisés	91
2.1.1. Sensibilisation des neutrophiles par le LPS.....	91
2.1.2. Sensibilisation des neutrophiles par le fMLP	92

2.2. Mesure de l'activité oxydase des neutrophiles sensibilisés en présence d'immunoglobulines G.....	93
2.2.1. Effet des IgG sur les neutrophiles sensibilisés par le fMLP	93
2.2.2. Effet des IgG sur les neutrophiles sensibilisés par le LPS	94
3. Implication de la NADPH oxydase phagocytaire	96
4. Expression de l'antigène HLA A2 à la surface des PMN: effet du priming des neutrophiles	97
5. Etude des récepteurs aux immunoglobulines G des polynucléaires neutrophiles : les récepteurs au Fcγ	98
DISCUSSION	100
CONCLUSION.....	107
BIBLIOGRAPHIE	108

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures

Figure 1. Evolution du nombre de TRALI d'imputabilité 2 et 3 entre 2000 et 2012	24
Figure 2. Radiographie thoracique de face	27
Figure 3. Hypothèse du mécanisme en deux étapes expliquant la survenue du TRALI ...	30
Figure 4. La migration trans-endothéliale du neutrophile vers les tissus.....	33
Figure 5. Les différents récepteurs au fragment Fc à la surface des neutrophiles.....	34
Figure 6. Les différents granules des neutrophiles.....	35
Figure 7. Le complexe NADPH oxydase.....	36
Figure 8. La déformation du neutrophile lors de son passage dans le capillaire pulmonaire	45
Figure 9. Représentation schématique des gènes HLA	48
Figure 10. Représentation des molécules HLA de classe I	49
Figure 11. Représentation des molécules HLA de classe II	50
Figure 12. La nomenclature HLA	61
Figure 13. La technique de lymphocytotoxicité complément-dépendante (LCT)	62
Figure 14. Grille d'évaluation de la lymphocytotoxicité, selon les recommandations de l'ASHI	63
Figure 15. Comparaison des techniques de typage HLA de PCR-SSP, PCR-SSO et PCR-SBT	64
Figure 16. Exemple du résultat de la séquence obtenue par le séquenceur 3730 ABI® Prism (Applied Biosystem)	70
Figure 17. Le dépistage ou la recherche d'anticorps anti-HLA par la technologie Luminex™	72
Figure 18. Exemple d'un résultat de dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™	73
Figure 19. Le principe de réaction par chimiluminescence.....	77
Figure 20. Le dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex	80
Figure 21. L'étape de purification des Immunoglobulines G.....	83
Figure 22. Contrôle de l'amplification des exons 2, 3 et 4 du gène HLA du locus A sur gel d'agarose 1%.....	84

Figure 23. Résultat du séquençage de l'exon 2 sous forme d'electrophorégramme.....	85
Figure 24. Activité oxydase des PMN de typage non HLA-A2 après stimulation par les immunoglobulines G	87
Figure 25. Activité oxydase des PMN de typage non HLA-A2 après stimulation par les immunoglobulines G	88
Figure 26. Activité oxydase des PMN de typage HLA-A2 après stimulation par les immunoglobulines G	89
Figure 27. Activité oxydase des PMN de typage HLA-A2 après stimulation par des immunoglobulines G	90
Figure 28. Activité oxydase des PMN stimulées par le LPS	91
Figure 29. Activité oxydase des PMN stimulées par le fMLP.....	92
Figure 30. Activité oxydase des PMN préalablement stimulés par le fMLP	93
Figure 31. Activité oxydase des PMN préalablement stimulés par le LPS.....	94
Figure 32. Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'antigène HLA-A2 sur des PMN au repos après sensibilisation au fMLP ou au LPS (priming)	97
Figure 33. Analyse par cytométrie en flux de l'expression des récepteurs Fc γ (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) à la surface des PMN	98
Figure 34. Analyse par cytométrie en flux de l'expression du récepteur Fc γ RI (CD64) sur des PMN au repos et activés par les immunoglobulines G.....	99

Liste des Tableaux

Tableau I. Récapitulatif de la durée du prélèvement et du nombre de dons autorisé par an	13
Tableau II. Les contre-indications au don.....	14
Tableau III. Répartition des effets indésirables du receveur selon leur délai d'apparition .	21
Tableau IV. Appréciation de l'EIR selon le grade de sévérité et le niveau d'imputabilité ..	22
Tableau V. Nombre de TRALI d'imputabilité 2 et 3 en 2012.....	24
Tableau VI. Critères de l'ALI selon la conférence de consensus Américano-Européenne de 1994.....	28
Tableau VII. Critères du TRALI selon la conférence de consensus canadienne, 2004.....	28
Tableau VIII. Incidence du TRALI selon les produits sanguins transfusés.....	29
Tableau IX. Situations favorisant la survenue du TRALI	46

Tableau X. Le système HNA (Human Neutrophil Antigen)	53
Tableau XI. Données expérimentales contribuant à une meilleure connaissance physiopathologique dans la survenue du TRALI	56
Tableau XII. Mélange réactionnel pour l'amplification des gènes HLA par PCR.....	66
Tableau XIII. Le programme d'amplification de l'ADN génomique par PCR	66
Tableau XIV. Le programme de purification des produits de PCR	67
Tableau XV. Mélange réactionnel pour le séquençage des gènes HLA par PCR.....	68
Tableau XVI. Les amorces de séquences AllemeSEQR® HLA-A pour l'amplification et le séquençage du locus HLA-A.....	69
Tableau XVII. Le programme d'amplification pour le séquençage.....	70
Tableau XVIII. La préparation du gel en SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)	76
Tableau XIX. La recherche d'anticorps anti-HLA par Lymphocytotoxicité.....	81
Tableau XX. La recherche d'anticorps anti-HLA par Lymphocytotoxicité.....	82
Tableau XXI. Récapitulatif des étapes de sélection des sérums	84
Tableau XXII. Acronymes utilisés pour les PMN de cette étude.....	86
Tableau XXIII. Effet du DPI sur l'activité oxydase des PMN HLA-A2.....	96

LISTE DES ABREVIATIONS

ANSM	Agence française de la sécurité sanitaire des produits de santé (anciennement AFSSAPS)
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CD	Cluster de différenciation
CGR	Concentré de Globules Rouges
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPS	Concentré Plaquettaire Standard
CTSA	Centre de Transfusion Sanguine des Armées
DPI	Diphénylène Iodonium
EFS	Etablissement Français du Sang
EIGD	Effet Indésirable Grave du Donneur
EIR	Effet Indésirable du Receveur
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FC	Fragment cristallisable
FMLP	formyl-Met-Leu-Phe
HLA	Human Leucocyte Antigen
HNA	Human Neutrophil Antigen
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IG	Incident Grave de la chaîne transfusionnelle
IgG	Immunoglobuline G
IPD	Incident Post Don
LFB	Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies
LCT	Lymphocytotoxicité-complément Dépendante
LPS	Lipopolysaccharide
Lyso-PC	Lysophosphatidylcholine
MDS	Médicaments Dérivés du Sang
NADPH	Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NOX	NADPH Oxydase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFC	Plasma Frais Congelé
PHOX	Phagocytic Oxidase
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
PMN	Polynucléaire Neutrophile (polymorphonuclear)

PSL	Produit Sanguin Labile
QBD	Qualité Biologique du Don
RLU	Relative Luminescence Unit
ROS	Reactive Oxygen Species
SBT	Sequencing Based Typing
SSO	Sequence Specific Oligonucleotide
SSP	Sequence Specific Primer
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu
TACO	Transfusion-Associated Circulatory Overloaded
TCA	Temps de Céphaline Activé
TNF	Tumor Necrosis Factor
TLR	Toll-Like Receptor
TRALI	Transfusion-Related Acute Lung Injury
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

INTRODUCTION

L'œdème lésionnel pulmonaire post-transfusionnel a été initialement décrit en 1951 (1) mais ce n'est qu'en 1983 (2) qu'il fut identifié comme une entité post-transfusionnelle avec pour la première fois le terme Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI). Deux ans plus tard, plusieurs cas de TRALI établis sur une série de 36 patients ont permis de présenter ses caractéristiques cliniques : une détresse respiratoire liée à un œdème pulmonaire bilatéral, l'absence de dysfonctionnement cardiaque et le lien temporel avec une transfusion sanguine (3). De nombreux travaux furent ensuite consacrés au TRALI, à ses circonstances de survenue et à ses caractéristiques cliniques sans jamais clairement définir son mécanisme précis. Les hypothèses qui ont conduit à une compréhension du TRALI ont été fondées sur les observations suivantes : sur le plan anatomique, l'évidence du caractère lésionnel de cet œdème et sur la physiopathologie, le rôle pathogène de l'activation des neutrophiles au contact de l'endothélium lésé des capillaires pulmonaires.

L'importance et la fréquence du TRALI sont encore sous-évaluées. En effet, cette sous-estimation est le fait de la connaissance imparfaite de son mécanisme avec un diagnostic de certitude difficile. Cette difficulté du diagnostic peut engager le pronostic vital du patient du fait d'une prise en charge inadaptée. Ce n'est que depuis une dizaine d'années que le TRALI est considéré comme une cause majeure de morbidité et de mortalité post-transfusionnelle par le système français d'hémovigilance et par les réseaux européens et nord-américains. Les données de la littérature contribuant aux hypothèses physiopathologiques des conditions de survenue de cet accident ainsi que les données épidémiologiques apportées par les rapports d'hémovigilance justifient que des stratégies de prévention soient envisagées.

Nous développerons dans ce travail, en appui avec les résultats expérimentaux, les points importants pour une meilleure compréhension de la survenue du TRALI sur le plan immunologique afin d'en réduire l'incidence, tout en soulignant ceux susceptibles de faire l'objet de travaux visant à améliorer les mesures de préventions stratégiques déjà mises en place.

**REVUE GENERALE DE LA
LITTERATURE**

PARTIE 1 : PRODUIT SANGUIN LABILE : LE MEDICAMENT DE LA TRANSFUSION SANGUINE

1. L'activité transfusionnelle

1.1. La transfusion sanguine

La transfusion sanguine est une thérapeutique substitutive indispensable car il n'existe pas de produit capable de se substituer complètement au sang humain. Elle consiste à administrer un des composants issus du sang d'un donneur vivant humain : globules rouges, plaquettes, globules blancs et plasma. Ce sont les produits sanguins labiles (PSL). Les PSL proviennent d'un ou plusieurs sujets appelés « donneurs » et vont être administrés à un ou plusieurs patients appelés « receveurs ». Les PSL proviennent de dons de sang prélevés lors de collectes organisées. En France, il existe 151 sites de prélèvements et 40 000 collectes mobiles organisées sur l'ensemble du territoire. La mise à disposition des produits doit obligatoirement se référer aux principes de bonnes pratiques de transfusion définis par la décision du 6 novembre 2006 (4) : le prélèvement, la préparation, la qualification biologique ainsi que la sécurisation des PSL répondant à ces principes valident la sécurité de leur distribution après prescription médicale par les sites transfusionnels dont l'Etablissement Français du Sang (EFS).

En France, environ 3 millions de PSL sont transfusés tous les ans à plus de 500 000 malades (5). Selon la loi du 4 janvier 1993 (6), le don de sang en France est bénévole, volontaire, anonyme et sans profit. Le respect des bonnes pratiques de transfusion est sous la responsabilité de deux organismes : l'EFS et le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA).

Depuis sa création au 1^{er} janvier 2000, l'EFS est un établissement public sous autorité du Ministère de la Santé. Il est chargé de veiller à satisfaire les besoins en PSL et à l'adaptation de l'activité transfusionnelle aux évolutions médicales, scientifiques et technologiques dans le respect des principes éthiques. Il approvisionne le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) en plasma, matière première nécessaire pour la production des médicaments dérivés du sang (MDS) tels que l'albumine, les facteurs de coagulation et les immunoglobulines. A l'inverse des produits sanguins labiles issus directement du don, les médicaments dérivés du sang permettent la production de produits stables.

Le CTSA est un organisme du Service de Santé des Armées sous autorité du Ministère de la Défense. Sa mission prioritaire est l'approvisionnement en sang des forces

armées en opération. Il collecte le sang dans les établissements du Ministère de la Défense. Il prépare, contrôle et distribue les produits sanguins obtenus.

Il existe 2 types de don :

➤ **Le don de sang total**

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

➤ **Le don par aphérèse**

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

1.2. Les indications de la transfusion sanguine

1.2.1. Qui peut donner ?

Selon la législation française (7), toute personne en bonne santé, pesant au moins 50 kg et âgée de 18 à 65 ans (plasma et plaquettes) ou 70 ans (sang total) peut donner son sang. La durée de prélèvement pour chaque type de PSL ainsi que le nombre de dons maximum autorisés sont illustrés dans le Tableau I:

Tableau I. Récapitulatif de la durée du prélèvement et du nombre de dons autorisé par an. JORF n°0015 du 18 janvier 2009. p.1067 (7)

Type de don	Sang total	Plasma Frais Congelé (PFC)	Plaquettes
Durée de prélèvement	10 min	1h30	2h30
Nombre de dons maximum dans l'année	6 pour un homme et 4 pour une femme	24	12
Intervalle minimum entre 2 dons	8 semaines	2 semaines	4 semaines

La compensation des pertes subies lors d'un don de sang total s'effectue normalement en une semaine.

Pour chaque don, le donneur fait l'objet d'un entretien médical confidentiel et d'un examen général pour s'assurer que le don ne présente pas de risque ni pour lui ni pour le receveur. Un document de préparation à l'entretien médical est remis à chaque donneur lors de l'enregistrement afin d'éliminer certaines contre-indications au don. Une contre-indication est une mesure réglementaire définie sur la base de critères médicaux et épidémiologiques. Elle est temporaire et de courte durée, dans 80% des cas.

Les différentes contre-indications au don peuvent être répertoriées selon le tableau suivant (Tableau II) :

Tableau II. Les contre-indications au don. JORF n°0015 du 18 janvier 2009. p.1067 (7)

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

Cette liste n'est pas exhaustive et fait l'objet de mises à jour régulières.

1.2.2. Les indications des produits sanguins labiles

o Les globules rouges

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

La quantité de CGR à transfuser est la quantité minimale pour remonter l'hémoglobine à un niveau acceptable. Cette quantité dépend donc du taux d'hémoglobine du patient et de

la valeur cible souhaitée en sachant que pour augmenter de 1g/dL le taux d'hémoglobine, il faut transfuser approximativement un CGR (soit une poche) chez l'adulte ou 4 ml/kg de CGR chez l'enfant. La valeur référence (8) du taux d'hémoglobine est de 13 à 17 g/dL chez l'homme et de 12 à 16 g/dL chez la femme.

Chez le patient ne présentant pas de facteur de mauvaise tolérance, la transfusion de globules rouges est recommandée pour maintenir le taux d'hémoglobine au-dessus de :

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

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

- Selon la directive européenne (9), les CGR se conservent entre +2°C et +6°C pendant 42 jours à partir de la date de prélèvement.

- **Le plasma frais congelé**

Il contient notamment les facteurs de l'hémostase. Leur transfusion est nécessaire lorsque la concentration de ces facteurs est trop basse, dans le but de prévenir une hémorragie ou d'en faciliter l'arrêt.

Les PFC sont préparés et délivrés dans des volumes compris entre 200 et 600 mL. Le volume initial de PFC à prescrire est de 10 à 15mL/kg.

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

- La concentration de fibrinogène plasmatique est inférieure à 1 g/L [valeur de référence : 2 - 4g/L]
- Le temps de céphaline activé (TCA) s'inscrit entre 1,5 à 1,8 fois supérieur de la valeur témoin [valeur de référence : 0,8 - 1,2]
- L'activité du complexe prothrombinique est inférieure à 40% [valeur de référence : 70 - 130%].

- Selon la directive européenne (9), les PFC se conservent à -25°C jusqu'à 1 an à partir de la date de prélèvement.

- **Les plaquettes**

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

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

Pour les thrombopénies centrales, la prévention des accidents hémorragiques est réservée principalement aux hémorragies aiguës ou iatrogènes (chimiothérapies). La concentration de plaquettes doit être maintenue au dessus de 10 G/L. Néanmoins, ce seuil est porté à 20 G/L en présence de facteurs de risque hémorragique et du risque de diminution du rendement transfusionnel.

- Selon la directive européenne (9), les CPS se conservent entre +20°C à +24°C sous agitation lente et continue pendant 5 jours à partir de la date de prélèvement.

- **Les globules blancs**

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

1.2.3. Les pathologies soignées grâce au don du sang

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

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

Les patients atteints d'hémopathies malignes représentent près d'un tiers des patients transfusés et un peu plus de la moitié des produits sanguins utilisés. L'induction thérapeutique intensive avec les traitements par chimiothérapie ou les greffes de moelle osseuse diminue fortement la capacité de l'organisme à produire les composants du sang

par la moelle osseuse. Pendant cette période critique, la transfusion de concentrés de globules rouges et de concentrés de plaquettes est indispensable pour prévenir les complications d'une anémie profonde et le risque hémorragique lié à la baisse des plaquettes. Les infections liées à la leucopénie sont le plus souvent traitées par des antibiotiques, mais, dans de rares cas, une infection résistant aux antibiotiques peut être traitée par des concentrés de globules blancs.

Concernant les maladies du sang, la thalassémie, maladie héréditaire qui se traduit dans sa forme grave par une anémie récurrente, nécessite l'apport d'un support transfusionnel récurrent. En outre, la drépanocytose, maladie génétique qui touche un nouveau-né sur 6 000, se caractérise par la présence d'hématies falciformes, de faible demi-vie et sujettes à l'agrégation, entraînant des crises vasculo-occlusives. Le sang de ces malades doit être renouvelé à intervalles réguliers (10).

○ **Les saignements importants.**

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

○ **Les interventions chirurgicales.**

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

Outre ces trois grands domaines représentant plus de 90% des patients transfusés et près de 95% des produits sanguins, il faut ajouter les patients pris en charge dans les unités de soins intensifs pour 5 à 10% des malades transfusés soit moins de 5% des produits sanguins. La transfusion chez les femmes parturientes lors de situations obstétricales difficiles concerne 2% des patients transfusés (1% des produits sanguins). Enfin, de manière beaucoup plus rare le nouveau-né peut nécessiter l'apport d'une transfusion (moins de 1 % des transfusés) lors qu'il s'agit de prématurés ou à la suite d'une anémie hémolytique consécutive à la présence d'anticorps chez la mère.

1.3. La Sécurisation du don

Les poches de sang recueillies lors des dons ne sont jamais transfusées directement au patient. Après le prélèvement, elles sont préparées, transformées et qualifiées avant d'être distribuées.

1.3.1. Le prélèvement

La sécurisation du PSL commence dès le prélèvement. La sélection du donneur par le médecin est la première étape de la sécurisation pour la transfusion (11). Le donneur remplit un questionnaire l'interrogeant sur son mode de vie et ses antécédents médicaux qui est analysé par le médecin lors de l'entretien médical. Celui-ci évalue si le donneur est apte au don. Le prélèvement est ensuite effectué par une infirmière spécialement formée.

1.3.2. La préparation et transformation

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

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

1.3.3. La qualification biologique du don (QBD)

Lors du prélèvement, des tubes supplémentaires sont recueillis pour des examens biologiques. La qualification biologique détermine le statut immuno-hématologique du donneur afin de garantir la compatibilité des produits sanguins avec le receveur et assure sa sécurité vis-à-vis des agents transmissibles.

Selon l'article D.1221-6 du Code de la Santé Publique (12), sur chaque prélèvement sont effectués :

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

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

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

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

4°/ Le dosage de l'hémoglobine

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

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

Les analyses ci-dessous sont effectuées en fonction du contexte épidémiologique et clinique :

1°/ Le dépistage des anticorps anti CMV

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

4°/ Le dépistage des anticorps anti HLA chez les femmes participant au don de plasma ou plaquettes et ayant eu au moins un enfant dans le but de réduire la survenue du TRALI.

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

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

1.3.4. La distribution et délivrance

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

2. Les accidents transfusionnels

2.1. L'hémovigilance

La loi du lundi 4 janvier 1993 relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament a mis en place un dispositif d'hémovigilance (6). L'hémovigilance est un organisme de la chaîne transfusionnelle qui a pour objet la surveillance, l'évaluation et la prévention des incidents et des effets indésirables survenant chez les donneurs ou les receveurs de PSL.

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

En France, le système d'hémovigilance comprend :

Un niveau national :

- L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (ANSM, antérieurement AFFSaPS)
- La Commission Nationale d'Hémovigilance
- L'Institut de Veille Sanitaire (InVS)

Un niveau régional :

- Les coordonnateurs régionaux d'hémovigilance (CRH)

Un niveau local :

- Les correspondants d'hémovigilance des établissements de transfusion (EFS et CTSA)
- Les correspondants d'hémovigilance des établissements de santé, les syndicats inter-hospitaliers et groupements de coopération sanitaire
- Le personnel de santé

L'ANSM assure la mise en œuvre de l'hémovigilance. En 2012 (5), elle a reçu plus de 14 000 déclarations d'incidents et d'effets indésirables causés lors de la transfusion. Ces déclarations sont effectuées par des établissements de transfusion et des établissements de santé. L'unité d'hémovigilance de l'ANSM a pour mission d'examiner et

d'évaluer, dans les plus brefs délais, tout incident en relation avec l'activité transfusionnelle. Ces incidents peuvent concerner les receveurs (effet indésirable receveur, EIR), les donneurs (effet indésirable grave donneur, EIGD) et le fonctionnement de la chaîne transfusionnelle (incident grave, IG).

Dans le rapport d'activité 2012 de l'hémovigilance (5), 3 206 778 PSL ont été distribués dont 78% de CGR, 9% de plaquettes et 12% de plasmas. Le nombre de patients transfusés était de 544 594 soit un ratio du nombre de PSL de 5,9 par patient. Ces PSL sont issus de 1 728 950 donneurs qui représentent 4,3% de la population de 18 à 65 ans. Les dons sont constitués pour 84,2% de dons de sang total et pour 15,8% de dons d'aphérèse.

2.2. Les effets indésirables et les incidents déclarés

2.2.1. Les Effets indésirables du Receveur (EIR)

Ce sont tous les effets indésirables survenus chez un receveur de PSL liés ou susceptibles d'être liés à l'usage thérapeutique de ces produits.

On distingue les incidents immédiats qui surviennent dans les 8 jours qui suivent l'acte transfusionnel et les incidents retardés s'ils surviennent au-delà de 8 jours (Tableau III).

Tableau III. Répartition des effets indésirables du receveur selon leur délai d'apparition. Rapport d'activité hémovigilance 2012 (5)

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

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

Tableau IV. Appréciation de l'EIR selon le grade de sévérité et le niveau d'imputabilité. Rapport d'activité hémovigilance 2012 (5)

Grade de sévérité (N=4)	Niveau d'imputabilité (N=5)
Grade 1: EIR non sévère	Imputabilité NE (non-évaluable): données insuffisantes pour évaluer l'imputabilité
Grade 2: EIR sévère	Imputabilité 0 (exclue/improbable): éléments d'appréciation disponibles incitant clairement à attribuer l'EIR à d'autres causes que les PSL
Grade 3: Menace vitale immédiate	Imputabilité 1 (possible): éléments d'appréciation disponibles ne permettant pas d'attribuer clairement l'EIR, ni à la transfusion, ni à d'autres causes
Grade 4: Décès	Imputabilité 2 (probable): éléments d'appréciation disponibles incitant clairement à attribuer l'EIR à la transfusion
	Imputabilité 3 (certaine): éléments probants ne pouvant être mis en doute et permettant d'attribuer avec certitude l'EIR à la transfusion

Chiffres 2012 :

Dans le rapport d'activité de l'hémovigilance (5), 7 788 EIR ont été déclarés. Le taux de déclaration est de 243,6 pour 100.000 PSL.

Les 3 principaux diagnostics d'imputabilité 1 à 3 concernent les allo-immunisations isolées (36,4%), les réactions fébriles non hémolytiques (RFNH) (30,5%) et les allergies (15,4%).

13 décès ont été déclarés en 2012, 8 sont d'imputabilité faible et 5 d'imputabilité forte. Il s'agissait de 2 infections bactériennes, 1 TRALI d'imputabilité certaine et de 2 œdèmes pulmonaires de surcharge d'imputabilité probable.

2.2.2. Les incidents graves de la chaîne transfusionnelle (IG)

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

la vie en danger, entraînant une incapacité, ou provoquant/prolongeant une hospitalisation ou tout autre état morbide).

Chiffre 2012 :

766 incidents graves de la chaîne transfusionnelle ont été déclarés : 72,5% des IG sont des incidents isolés sans transfusion et pour les 27,5% survenus avec transfusion, la majorité sont des incidents de grade 0. Les principales catégories d'incidents déclarés sont des erreurs d'identification des patients, des erreurs de distribution, le non respect de procédures de transfusion, des erreurs de receveur de PSL, erreurs de patients prélevés pour analyses biologiques.

2.2.3. Les effets indésirables graves du donneur (EIGD)

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

Chiffre 2012 :

4271 effets indésirables graves chez les donneurs ont été déclarés. 82% sont de grade modérée (grade 2) mais 18% de grave sévère (grade 3). 2 décès ont été déclarés : l'un d'imputabilité possible et l'autre d'imputabilité non évaluable.

2.2.4. L'incident post-don (IPD)

L'information post-don est définie comme toute information communiquée à un établissement de santé après un don, concernant le donneur et mettant en cause la sécurité d'un ou plusieurs de ses dons antérieurs. Toutes les IPD pouvant comporter un risque sanitaire potentiel ou avéré et dont les PSL issus du don ont quitté l'établissement de santé, sont notifiées à l'ANSM.

Chiffre 2012 :

1396 IPD ont été déclarés principalement par le donneur lui-même ou sa famille (82%). Il s'agit principalement d'informations portant sur des risques infectieux.

2.3. L'évolution du nombre de TRALI déclaré de 2000 à 2012

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

La Figure 1 montre l'évolution du nombre de TRALI d'imputabilité 2 et 3 entre 2000 et 2012. L'incidence moyenne des déclarations d'œdèmes lésionnels pulmonaires entre

2003 et 2012 est de 0,9 pour 100 000 PSL. On note en particulier une augmentation du nombre de déclarations de TRALI à partir de 2003 dû à la mise en place à cette même année d'un groupe de travail d'experts dont le but était d'informer les cliniciens prescripteurs de PSL sur la connaissance de cet accident transfusionnel afin d'évaluer au plus juste la survenue du TRALI même s'il reste encore sous-évalué actuellement.

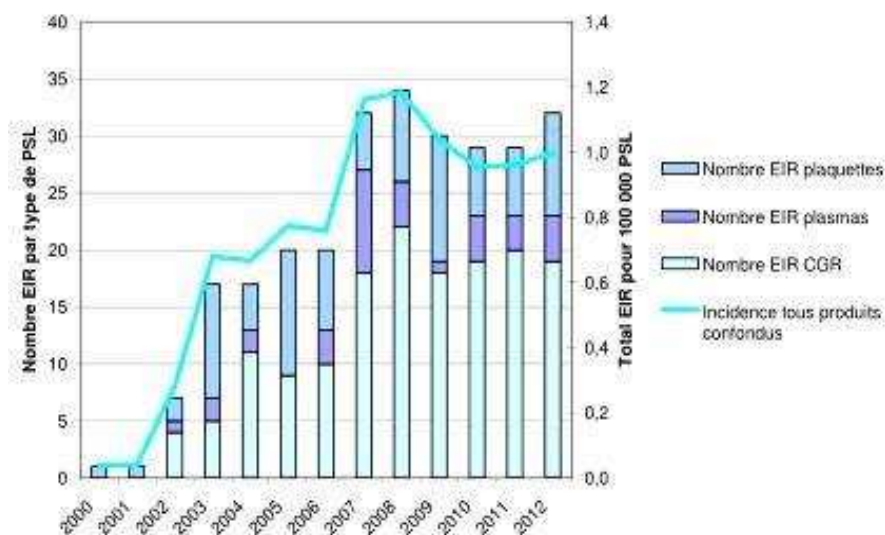


Figure 1. Evolution du nombre de TRALI d'imputabilité 2 et 3 entre 2000 et 2012. Rapport d'activité hémovigilance 2012 (5)

Chiffres 2012 (Figure 1 et Tableau V)

Le Tableau V détaille le nombre et l'incidence des œdèmes pulmonaires lésionnels d'imputabilité 2 ou 3 en 2012 par type de PSL. En 2012, 32 TRALI d'imputabilité 2 à 3 ont été déclarés : 66% avec des CGR, 28% avec les plaquettes, 6% avec le plasma. L'incidence est de 1 EIR pour 100000 PSL.

Parmi ces EIR, 53% sont de grade 3 (N=17). Un décès d'imputabilité certaine a été déclaré.

Tableau V. Nombre de TRALI d'imputabilité 2 et 3 en 2012.

PSL	Grade 1 (non sévère)	Grade 2 (sévère)	Grade 3 (menace vitale)	Grade 4 (décès)	Total	100.000 PSL
CGR*	3	6	11	1	21	0,8
CPA*	0	1	1	0	2	21,3
MCP*	0	3	4	0	7	202,4
PFC*	0	1	1	0	2	4,3
Total	3	11	17	1	32	1,0

*CGR= concentré de globules rouges, CPA= concentré de plaquettes d'aphérèse, MCP= mélange de concentrés plaquettaires, PFC : plasma frais congelé. Rapport d'activité hémovigilance 2012 (5)

Le TRALI représente la 3^{ème} cause d'EIR de grade 3 et d'imputabilités possible à certaine derrière le TACO et les allergies.

Le TRALI fut pendant longtemps l'une des premières causes de mortalité transfusionnelle en France (13) et dans le monde (14).

Malgré cela, souvent confondu avec l'œdème pulmonaire de surcharge (TACO), le TRALI reste encore méconnu et sous-diagnostiqué (15). Du fait d'un diagnostic d'interprétation difficile, une sous-déclaration du TRALI auprès de l'Hémovigilance rend les données étiologiques compliquées et biaisées, d'autant plus que le TACO représente également l'une des premières causes de mortalité transfusionnelle (14). Malgré la mise en œuvre en 2003 de la déclaration électronique du TRALI et de la sensibilisation auprès des prescripteurs et des transfuseurs sur cet EIR, la méconnaissance des mécanismes dans la survenue du TRALI ne permet pas de cerner clairement sa participation dans l'activité transfusionnelle.

D'autre part, en se basant uniquement sur les données cliniques attestant que la survenue du TRALI résulte d'un conflit immunologique avec la présence d'anticorps anti-HLA apportés lors de la transfusion, des mesures préventives ont été mises en œuvre entraînant l'éviction des donneurs immunisés pour le don de plasma et les plaquettes d'aphérèse. Aujourd'hui, cette prévention a permis de réduire de manière significative l'incidence du TRALI dans les accidents transfusionnels. En revanche, ces mesures radicales ne font qu'accroître le peu de réserves en PSL dont dispose l'EFS, ne représentant que dix jours de consommation (15). Cette mesure ne permet pas actuellement de couvrir le besoin de tous les patients en cas de surconsommation d'autant plus que la demande en PSL ne cesse d'augmenter (multiplication des traitements de cancers par chimiothérapie, population vieillissante nécessitant une hospitalisation et statistiquement plus de transfusion).

PARTIE 2 : TRALI (Transfusion-related Acute Lung Injury)

Chapitre 1 : Du diagnostic à la prévention

1. Epidémiologie

L'œdème lésionnel pulmonaire aigu post-transfusionnel fut initialement décrit en 1951 chez cinq sujets (1). Ce n'est qu'en 1983 avec les travaux de Popovsky (2) que l'œdème lésionnel pris le nom de TRALI, acronyme de « Transfusion-Related Acute Lung Injury ». Il s'agit d'un syndrome de détresse respiratoire survenant dans les six heures suivant la transfusion de PSL. Les premières données ont rapidement fait reconnaître l'étiologie possible d'un conflit immunologique par les anticorps apportés avec le produit transfusé. En effet, deux ans plus tard, Popovsky avait rapporté que parmi une série de 36 patients, 89% d'entre eux présentaient des anticorps anti-HLA dans le produit sanguin transfusé (3). C'est à partir de cette publication que les médecins transfuseurs prirent conscience de cet incident et de nombreux travaux furent consacrés au TRALI, à ses mécanismes physiopathologiques, à ses circonstances de survenue et à ses caractéristiques cliniques. Dès lors, le réseau d'hémovigilance a tenté d'évaluer l'incidence de l'œdème lésionnel pulmonaire dans les accidents transfusionnels. Ce n'est que depuis une dizaine d'années que le TRALI est considéré comme une cause majeure de morbidité et de mortalité post-transfusionnelles. En 2009, le système d'hémovigilance britannique SHOT (Serious Hazards of Transfusion) évaluait la survenue du TRALI comme la première cause de mortalité transfusionnelle (16) alors qu'il était considéré comme la première cause de décès entre 2008 et 2012 aux Etats-Unis avec une mortalité de 37% (17) (ce taux atteignait 43% entre 2007 et 2011). En France, le TRALI occupait le troisième rang de mortalité post transfusionnelle jusqu'en 2009 (18). Aujourd'hui, le nombre d'accident a diminué du fait des mesures préventives mises en œuvre. Néanmoins, son incidence réelle demeure mal-évaluée et probablement sous-estimée du fait de sa confusion fréquente avec l'œdème de surcharge et le peu de connaissance actuelle sur son diagnostic clinique et son mécanisme.

2. Diagnostic clinique

Le diagnostic du TRALI est essentiellement clinique. Il représente un œdème pulmonaire qui partage les mêmes caractéristiques des œdèmes pulmonaires lésionnels aigus, appelés Acute Lung Injury (ALI), et des syndromes de détresse respiratoire aigu (SDRA) (19). Le TRALI survient dans la majorité des cas dans les trente minutes et au plus tard dans les six heures suivant la transfusion sanguine (20). Ce lien temporel est un critère diagnostique capital. Il associe, dans sa forme typique, une tachypnée avec cyanose, une élévation thermique supérieure ou égale à 1°C, une toux, une tachycardie inconstamment associée à une hypotension (20, 22). L'auscultation pulmonaire révèle la présence de râles crépitants diffus dans les deux champs pulmonaires. Une radiographie thoracique présente généralement un infiltrat pulmonaire bilatéral formé d'opacités alvéolaires cotonneuses, pouvant aller jusqu'à l'image d'un poumon blanc (Figure 2). L'examen du liquide alvéolaire montre l'existence d'un exsudat riche en protéine avec un rapport des concentrations protéiques liquide alvéolaire/plasma $\geq 0,7$.

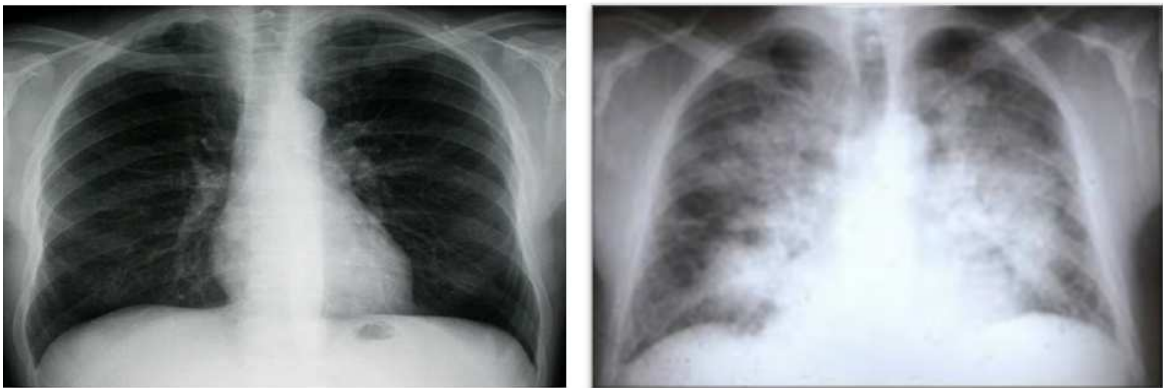


Figure 2. Radiographie thoracique de face. La radiographie de droite représente un infiltrat alvéolo-interstitiel diffus dans les deux poumons qui est absent sur la radiographie thoracique d'un individu sain (à gauche).

L'étude gazométrique confirme un tableau d'hypoxie puisqu'elle montre une désaturation en oxygène du sang artériel, avec une saturation en oxygène (SpO_2) inférieure ou égale à 90% et un rapport PaO_2/FiO_2 abaissé au dessous de 300 mmHg. L'absence de défaillance cardiaque est le critère indispensable au diagnostic, authentifiée par l'échocardiographie ou le dosage du pro-BNP. Le bilan biologique décrit une neutropénie transitoire précoce mais inconstante. Son absence ne permet pas d'éliminer un TRALI.

Les similitudes cliniques avec les SDRA suggèrent que le TRALI représente une entité post-transfusionnelle appartenant au groupe des SDRA. Le tableau clinique est typiquement celui d'un œdème pulmonaire lésionnel aigu répondant aux critères définis à l'occasion de la conférence de consensus réunie en 1994 sous le nom de « American-

European consensus on ARDS » (21) qui fournit la base des définitions cliniques permettant d'aboutir au diagnostic d'ALI (Tableau V).

Tableau VI. Critères de l'ALI selon la conférence de consensus Américano-Européenne de 1994.
D'après Bernard *et al*, Journal of Critical Care (1994)

Critères retenus pour la définition de l'ALI
Apparition sur un mode aigu
Hypoxémie : Dans un contexte de recherche : PaO₂/FiO₂ ≤ 300 Ou SPO₂ < 90% en air ambiant En dehors d'un contexte de recherche : PaO₂/FiO₂ ≤ 300 Ou SPO₂ < 90% en air ambiant Ou autre évidence clinique d'une hypoxémie
Infiltrat bilatéral sur une radiographie thoracique frontale
Absence de signes d'hypertension dans l'oreillette gauche (pas de surcharge circulatoire)

La définition du TRALI inclut celle de l'ALI et engage un lien temporel avec la transfusion et des critères d'exclusion liés à la présence d'autres causes d'ALI. Il repose sur les critères définis lors de la conférence de consensus de Toronto en 2004 (22) (Tableau VII).

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

Critères retenus pour la définition du TRALI
TRALI certain
<ol style="list-style-type: none"> 1. Présence de critères de l'ALI 2. Pas d'ALI préexistant avant la transfusion 3. Survenue dans les 6 heures de la transfusion (pendant ou dans les 6 heures après) 4. Pas de relation temporelle avec un facteur de risque alternatif d'ALI
TRALI possible
<ol style="list-style-type: none"> 1. Présence de critères de l'ALI 2. Pas d'ALI préexistant avant la transfusion 3. Survenue dans les 6 heures de la transfusion (pendant ou dans les 6 heures après) 4. Relation temporelle avec un facteur de risque alternatif d'ALI

3. Les produits sanguins mis en cause

L'incidence réelle du TRALI est difficilement évaluable en raison d'une sous-évaluation de cet incident résultant de la méconnaissance dans sa physiopathologie mais également du fait d'un diagnostic positif difficile et souvent confondu. Néanmoins, la publication de Popovsky et Moore évoquait déjà en 1985 une incidence de 1 pour 5000 PSL transfusés (3). Tous les produits sanguins labiles contenant du plasma ont été mis en cause (Tableau VIII). Or, il existe un volume résiduel de plasma dans pratiquement tous les PSL .

Tableau VIII. Incidence du TRALI selon les produits sanguins transfusés

Auteurs, année	Produits Sanguins Labiles					
	PFC	CPA	MCP	CGR	Cryoprécipité	Total
Popovsky, 1985 (2); Silliman, 1999 (23)						1/5000
Boshkov <i>et al.</i> , 2003 (78)	1/19411	1/1224		1/4410		1/1220
SHOT (Serious Hazards of Transfusion)(16)	1/74000	1/88000	1/88000	1/557000	1/500000	
Kleinman <i>et al.</i> , 2004 (22)	1/61006		1/9306	1/58279	1/25073	
Wallis <i>et al.</i> , 2003 (15)						1/5000 à 1/10000
Kopko <i>et al.</i> , 2002 (29)						1/25000
Silliman <i>et al.</i> ; 2005 (130)						1/5000 à 1/1323
Muller <i>et al.</i> , 2004 (73)		1/14602				1/5000
Renaudier <i>et al.</i> , 2009 pour 2003-2006 (163)	1/80110	1/20040	1/128550	1/156110		
Système d'hémovigilance britannique (Chapman, <i>et al</i> 2009) (164)	1/81000	1/68000		1/556000		
Keller-Stanislawski <i>et al.</i> , 2009 (165)	1/66 000			1/2 860 000		
Système d'hémovigilance française (2009-2012) (5)						1/100 000

4. Physiopathologie du TRALI

Le TRALI est un œdème pulmonaire inflammatoire aigu avec atteinte de la membrane basale alvéolaire que l'on ne peut distinguer de celle observée dans les œdèmes pulmonaires lésionnels tels que les œdèmes pulmonaires de surcharge (TACO).

Ce syndrome résulte de l'agression de la membrane alvéolo-capillaire pulmonaire par les polynucléaires neutrophiles (PMN, pour leucocyte polymorphonuclear) accumulés puis activés au contact des cellules endothéliales (Figure 3). L'activation des PMN conduit à la libération de radicaux oxygénés et du contenu des granules, avec l'hypothèse de la lésion des cellules endothéliales et une augmentation de la perméabilité de la paroi alvéolo-capillaire (23). Cela provoque un œdème alvéolaire avec une fuite de liquide séreux riche en protéines vers les alvéoles pulmonaires. Localement les cellules endothéliales des capillaires sont activées et s'associe à l'attraction et l'activation de monocytes, de polynucléaires neutrophiles et de plaquettes. Cela souligne le rôle fondamental joué par l'interaction entre les PMN et les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires qui constitue le point central de ce conflit (24, 25).

L'étiologie et les mécanismes physiopathologiques responsables de cette lésion sont encore mal connus mais l'analyse attentive de la plupart des cas rapportés et des modèles expérimentaux conduit à l'hypothèse que le TRALI nécessiterait la coïncidence temporelle de deux événements : une leucostase pulmonaire puis une activation des PMN séquestrés (26-29). En effet, le fait qu'un même facteur activateur ne déclenche pas systématiquement ce syndrome suggère l'existence de situations favorisantes liées à la séquestration préalable des PMN dans le poumon (30,31). Le facteur favorisant principal semble être la leucostase pulmonaire préalable. Le TRALI est attribué à l'activation, déclenchée par la transfusion, des PMN séquestrés et préalablement stimulés puis à la lésion des cellules endothéliales. Ce mécanisme en deux étapes n'est pas la seule hypothèse émise mais elle serait la plus probable.

L'analyse des cas de TRALI et la relation temporelle avec la transfusion sanguine ont conduit à rechercher chez les donneurs et dans les produits transfusés le facteur déclenchant responsable de l'activation des PMN. Deux grandes catégories de facteurs activateurs d'origine transfusionnelle ont été retenues. D'une part les causes immunologiques impliquant l'activation des PMN par une réaction antigène-anticorps spécifique (24), d'autre part les causes impliquant la transfusion d'activateurs des PMN sans spécificité immunologique. Cette partie sera explicitée plus longuement dans le chapitre 2.

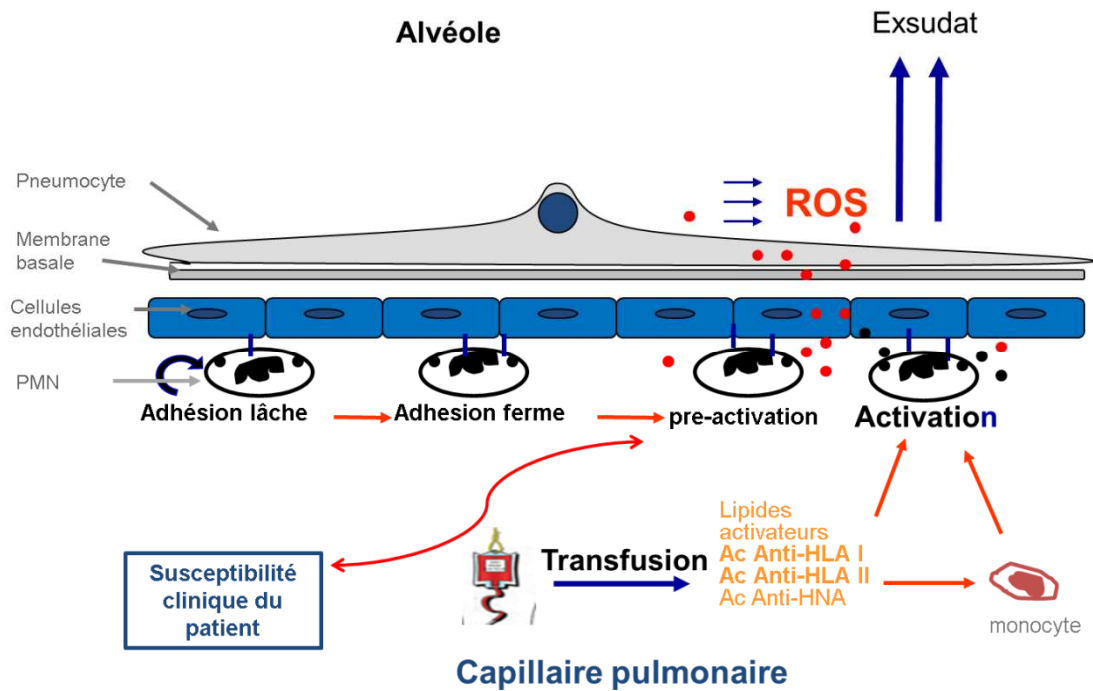


Figure 3. Hypothèse du mécanisme en deux étapes expliquant la survenue du TRALI. Dans cette hypothèse, la physiopathologie du TRALI suppose la coïncidence d'au moins deux facteurs : le premier, inhérent à une situation pathologique ou thérapeutique du patient, responsable d'une pré-activation des PMN. La deuxième étape, dépendante de la transfusion elle-même, conduirait à l'activation des PMN.

5. Le protagoniste cellulaire dans le TRALI : le polynucléaire neutrophile

5.1. Généralités

Le neutrophile constitue une des cellules effectrices de l'immunité innée. Il a été décrit pour la première fois par Paul Ehrlich au début du XX^e siècle (32). Il se caractérise sur le plan morphologique par un noyau polylobé ainsi que par de nombreux granules cytoplasmiques. D'un diamètre de 10 à 14 μm , c'est le leucocyte le plus abondant de la circulation sanguine, représentant entre 50% et 70% de l'ensemble des cellules nucléées. Dans la lignée granuleuse, les neutrophiles constituent plus de 95% de cette population cellulaire (33). Il intervient dans l'immunité innée et la réaction inflammatoire. C'est une cellule très mobilisable pouvant migrer vers le site inflammatoire. En outre, il produit des facteurs chimiotactiques pour le recrutement d'effecteurs de l'immunité tels que les lymphocytes T, les cellules NK, les monocytes ou les cellules dendritiques immatures.

5.2. La formation du polynucléaire neutrophile

Les neutrophiles sont produits dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente (34). Sous l'influence de facteurs de croissance et de différenciation du microenvironnement, la cellule souche hématopoïétique se différencie en cellule progénitrice lymphoïde pour la lignée lymphoïde ou en cellule progénitrice myéloïde pour la lignée myéloïde avec les monocytes, les macrophages tissulaires et les neutrophiles. Ces différenciations s'opèrent grâce à des facteurs de transcription, pour donner lieu à leur migration dans la circulation sanguine.

5.3. La migration du neutrophile

Sous l'influence de cytokines et de facteurs chimiotactiques, les neutrophiles sont recrutés au niveau des sites inflammatoires. Cette migration vers les tissus procède en quatre étapes (Figure 4) (35). En condition normale, le neutrophile et les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion de faible affinité, les sélectines P, E et L ainsi que des produits « mucine-like ». Dans le flux sanguin, les neutrophiles roulent le long de la paroi du vaisseau, étape appelée le roulement ou «rolling». Dans une deuxième étape sous l'influence d'un facteur pro-inflammatoire, le neutrophile est activé et exprime de nouvelles molécules d'adhésion de forte affinité comme les récepteurs, eg. MAC-1, molécules de la superfamille des immunoglobulines engageant des liens avec les ligands correspondant de la cellule endothéliale. Cette étape est appelée adhésion ferme. Sous l'effet de signaux pro-inflammatoires, le neutrophile réorganise son cytosquelette et développe des activités protéase pour s'insinuer au travers des jonctions serrées des cellules endothéliales. Un gradient de concentration de chimio-attractant oriente le mouvement tissulaire : migration trans-endothéliale ou diapédèse avec l'extravasation des neutrophiles au sein du tissu.

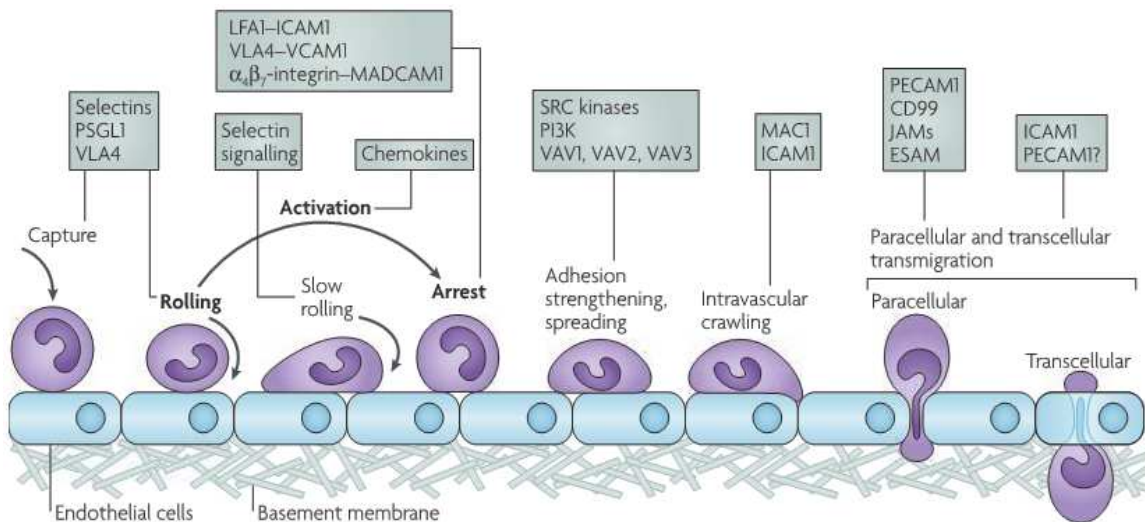


Figure 4. La migration trans-endothéliale du neutrophile vers les tissus. L'endothélium pulmonaire exprime des molécules d'adhérence, sélectines P puis E qui provoquent un ralentissement du transit des PMN par interaction avec leurs ligands leucocytaires PSGL-1, et sialyl-lewis^x. Sous l'influence de facteurs inflammatoires, le neutrophile exprime des molécules, β_2 intégrines (LFA1-CAM1) pour former une adhésion ferme avec les molécules ICAM1 de l'endothélium. L'extravasation du neutrophile vers le tissu résulte de son activation et l'activité protéase des granules qu'il contient. *Ley et al. Nature Reviews Immunology (2007).*

5.4. Les fonctions des neutrophiles

Les neutrophiles ont une durée de vie courte dans la circulation sanguine estimée entre 7 à 12 heures. En contexte inflammatoire, ils peuvent survivre jusqu'à plusieurs jours (36).

Les principales fonctions de défense du neutrophile sont la phagocytose, avec la dégranulation, l'explosion oxydative et la formation des Neutrophils Extracellular Trap (NET), réseau filamentaire capable d'emprisonner des micro-organismes et faciliter leur interaction avec les molécules effectrices (37).

➤ La phagocytose

Au niveau du site inflammatoire, le neutrophile a pour rôle principal d'éliminer les débris et les agents pathogènes : c'est le processus de phagocytose. Par ces récepteurs, le PMN reconnaît directement les débris cellulaires, pour engager autour de ceux-ci le mouvement de la membrane et les emprisonner à l'intérieur d'une vacuole : le phagolysosome. Chez l'homme, les récepteurs « Toll-Like » (TLR) reconnaissent les ligands, selon leur type. Par exemple, TLR4 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif, puis engage des voies de signalisation impliquées dans les fonctions effectrices des PMN. En outre, la fixation du PMN à sa cible est facilitée par les opsonines,

particulièrement les immunoglobulines d'isotype IgG1 et IgG3 et les fragments de C3. Les immunoglobulines se fixent de façon spécifique aux épitopes de l'agent pathogène par leur site anticorps, et aux récepteurs Fc γ des neutrophiles par leur fragment Fc (Figure 5). Les neutrophiles expriment constitutivement deux récepteurs Fc γ de faible affinité, CD32a (Fc γ RIIa) et CD16b (FcR γ IIIb), tandis que l'expression du récepteur de haute affinité CD64 (Fc γ RI) est inductible par l'interféron- γ (IFN γ) (38). Différentes réponses des neutrophiles sont induites par l'engagement des récepteurs Fc γ notamment la mobilisation de calcium intracellulaire, la phosphorylation de protéines, la production d'anions superoxyde, précurseurs de formes réactives de l'oxygène, les ROS.

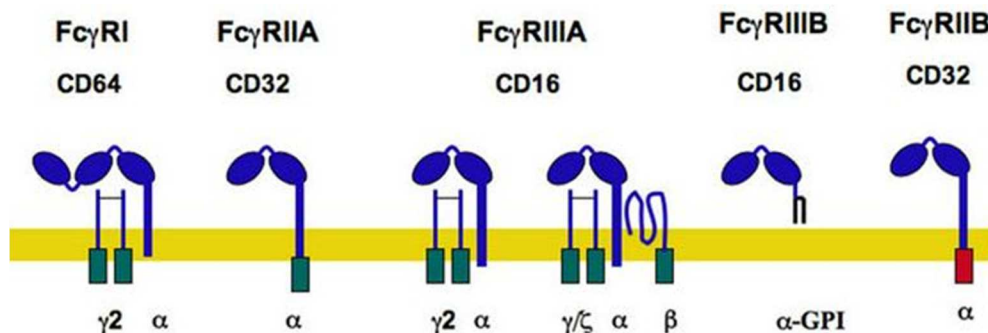


Figure 5. Les différents récepteurs au fragment Fc à la surface des neutrophiles. Ils permettent la fixation des immunoglobulines d'isotype G sur les neutrophiles par l'intermédiaire de leur fragment Fc. D'après Hogg et al, J Immunol (1989) (38).

Une fois les débris à l'intérieur des phagosomes, des granules contenant des enzymes de dégradation fusionnent avec la vacuole d'endocytose et dégradent leur contenu.

➤ La dégranulation

Le neutrophile possède des granules pouvant être classés en quatre types, selon leur contenu (Figure 6). Ces différents granules sont formés de manière séquentielle sous l'influence de facteurs de transcription (39).

Les premiers granules formés sont les granules azurophiles ou granules primaires. Ils sont rarement sécrétés à l'extérieur de la cellule, fusionnant plutôt avec le phagosome pour en détruire le contenu à l'aide de la myéloperoxydase, de l'élastase, des défensines, du lysosyme et de l'azurocidine qu'ils contiennent. Les autres granules formés peu après ceux-ci sont dits spécifiques ou secondaires. Ils sont libérés dans le milieu extracellulaire. Les granules gélatinases ou tertiaires et les vésicules sécrétoires apparaissent plus tard, à la fin du processus de maturation du neutrophile. Les principaux rôles des gélatinases sont de stocker les enzymes servant à la dégradation de la matrice extracellulaire tout en constituant une réserve de récepteurs membranaires utiles à la surface pour la diapédèse

du neutrophile. Ces granules sont donc très importants pour une migration efficace vers le site inflammatoire. Enfin, les vésicules sécrétoires, les premières à être libérées en réponse à des stimuli inflammatoires, possèdent une variété de récepteurs membranaires nécessaires aux étapes précoces d'activation du neutrophile et à l'adhésion ferme sur l'endothélium activé, comme la β 2-intégrine, le récepteur du fMLP, le LPS (CD14) et le récepteur Fc γ III.

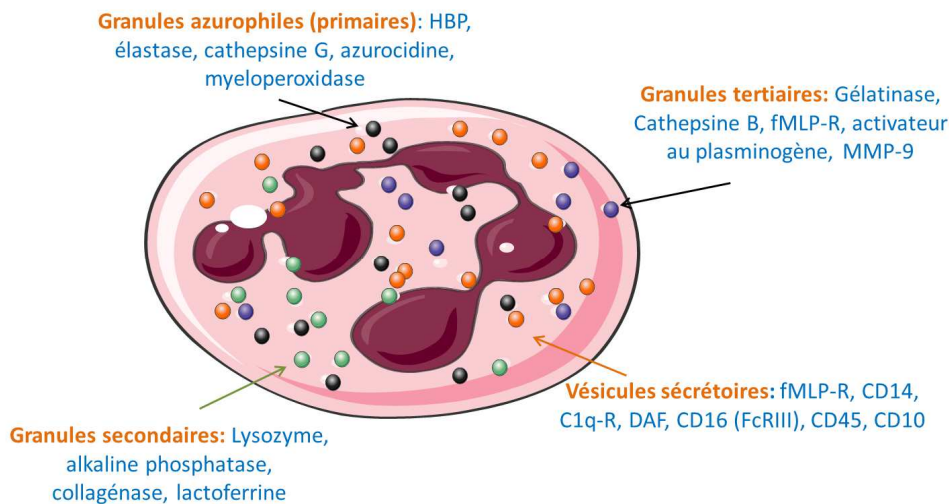


Figure 6. Les différents granules des neutrophiles. Ils sont formés de manière séquentielle tout au long de leur maturation.

➤ L'explosion oxydative

Un des mécanismes utilisés par les phagocytes pour éliminer les pathogènes consiste à produire des formes réactives de l'oxygène à partir des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Ces anions sont formés par le complexe multimérique de la NADPH oxydase, situé à la membrane cytoplasmique, et sont libérés à la face externe de cette membrane. L'anion superoxyde est un précurseur de plusieurs autres formes de l'oxygène fortement réactives et plus toxiques pour le pathogène: le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et l'oxygène singulet (1O_2), appelés collectivement les ROS (Reactive Oxygen Species). Si ces produits sont libérés de manière exagérée dans le milieu extracellulaire, ils peuvent engendrer des dommages tissulaires dus à la peroxydation lipidique, causant une désorganisation membranaire, ou encore une altération de protéines et d'acides nucléiques (40).

5.5. Le complexe NADPH oxydase

5.5.1. Structure de la NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique composé d'une protéine membranaire, le cytochrome b558, formé des deux sous-unités, gp91^{phox} ou Nox2 et p22^{phox} (phox = phagocytic oxydase) (41), de trois facteurs cytosoliques p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} et de deux petites protéines G Rac1/2 et Rap1A. La NADPH oxydase des neutrophiles se nomme communément la NADPH oxydase phagocytaire ou Nox2. Dans les phagocytes au repos, les différents composants de la NADPH oxydase sont dissociés et répartis entre la membrane plasmique et le cytosol (Figure 7).

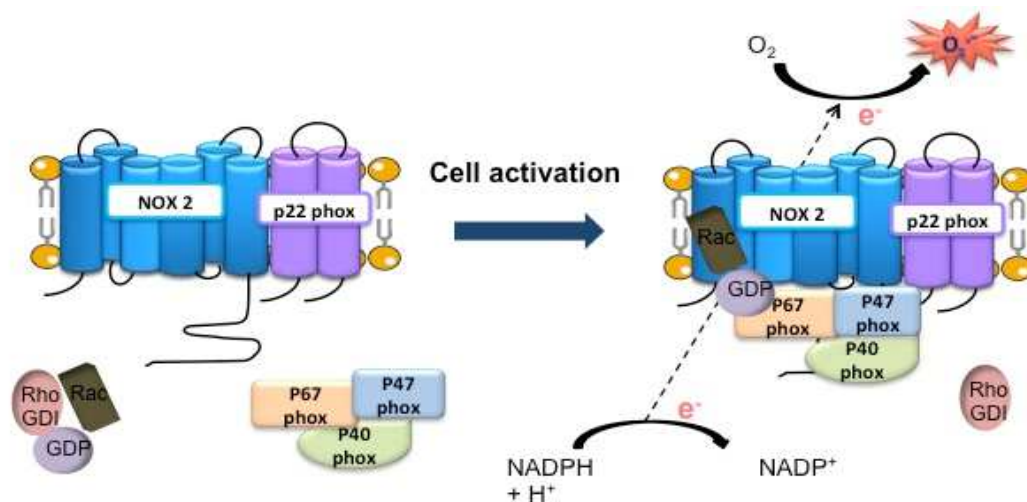


Figure 7. Le complexe NADPH oxydase. Les sous-unités membranaires Nox2 (gp91phox) et p22phox forment le cytochrome b558. Au repos, les composants cytosoliques p40phox, p67phox et p47phox sont dissociés des autres et la protéine Rac est maintenue inactive dans le cytosol, associée à RhoGDI et à une molécule de GDP. Lors de l'activation, la protéine Rac est libérée de RhoGDI, convertie sous forme active avec fixation d'une molécule de GTP. p40phox, p67phox et p47phox subissent des événements de phosphorylation et s'associent au cytochrome b558 à la membrane plasmique. Un transfert d'électrons peut alors avoir lieu du NADPH vers l'oxygène moléculaire pour former des O_2^- . D'après Bedard *et al.* *Physiol Rev* (2007) (41).

➤ Le flavocytochrome b558 membranaire

Le cytochrome b558 a été identifié pour la première fois en 1978 dans les vacuoles phagocytaires de granulocytes humaines (42). Il est l'élément rédox du complexe NADPH oxydase. La synthèse de ses deux sous-unités est nécessaire pour leur stabilisation mutuelle au niveau de la membrane : l'absence de l'une des deux conduit à l'absence du cytochrome b558 (43).

- La sous-unité gp91^{phox} (Nox2)

Elle constitue une protéine fortement glycosylée de 570 acides aminés de 65,3 kDa composée de 6 hélices transmembranaires situées du côté amino-terminal et comportant 2 sites extracellulaires de glycosylation, 2 boucles intra-cytoplasmiques. La queue cytosolique carboxy-terminale hydrophile contient les sites potentiels de fixation du FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et du NADPH (44). Les deux hèmes, liés à 4 résidus His situés dans le 3^{ème} et le 5^{ème} passage transmembranaire (45), sont essentiels au passage du FAD vers l'O₂ extracellulaire. Il existe 7 isoenzymes Nox/Duox chez l'Homme (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 et Duox2) exprimés dans de nombreux types cellulaires et tissus, et possédant des mécanismes d'activation variés ainsi que des rôles biologiques physiologiques spécifiques.

- La sous-unité p22^{phox}

La sous-unité de p22^{phox} est une protéine de 195 acides aminés pour 21 kDa. Elle est formée d'une région N-terminale avec des régions hydrophobes permettant son ancrage dans la membrane plasmique mais le nombre de passage transmembranaires reste inconnu (46). Son domaine cytoplasmique C-terminal contient une région riche en résidus Pro interagissant avec les sous-unités p47^{phox}.

➤ Les facteurs cytosoliques

La sous-unité p47^{phox} est une protéine très basique de 390 acides aminés pour 44,7 kDa (47) qui possède un domaine C-terminal riche en résidus arginine et sérine avec 11 sites potentiels de phosphorylation. Lors de l'activation oxydase, c'est elle qui permet la migration des trois facteurs cytosoliques jusqu'au cytochrome b558. La sous-unité p67^{phox} est une protéine de 526 acides aminés pour 59,8 kDa (48). Elle contient un domaine interagissant avec Rac au niveau de la partie N-terminale, et également des domaines d'interaction avec les autres facteurs cytosoliques et le cytochrome b558 (49, 50). La sous-unité p40^{phox} est une protéine de 339 acides aminés pour 39 kDa interagissant faiblement avec p47^{phox} et p67^{phox} (51). L'absence de p40^{phox} contrarie l'activation de la NADPH oxydase après phagocytose.

➤ Rac1/2

C'est une protéine G monomérique qui se lie exclusivement à p67^{phox} (52). Elle appartient à la sous-famille Rho de la superfamille Ras qui la lie au GTP sous sa forme active. L'activation du complexe NADPH oxydase nécessite sa dissociation de rhoGDI (GDP Dissociation Inhibitor) au niveau du cytosol et sa liaison au GTP.

5.5.2. Activation de la NADPH oxydase

Dans les PMN au repos, les composants de la NADPH oxydase sont inactifs et répartis entre la membrane plasmique et le cytosol. Dans les PMN activés, la phosphorylation des facteurs cytosoliques et leur migration vers la membrane plasmique ou la membrane de la vacuole de phagocytose résultent de différentes voies de signalisation intracellulaire (53). Les composants cytosoliques s'associent alors au cytochrome b558 membranaire, après un changement conformationnel. L'activation des PMN nécessite également l'implication des petites protéines G, Rac1/2 et Rap1, ainsi que des protéines liant le calcium (MRP8 et MRP14), intervenant dans la régulation de l'activité du complexe oxydase.

Après assemblage du complexe NADPH oxydase permettant son activation, le NADPH cytoplasmique est oxydé en NADP⁺ avec transfert d'électrons vers le FAD puis vers les hèmes. La dernière étape de ce transport d'électrons a lieu dans les vacuoles ou en extracellulaire lorsque l'O₂ accepte l'électron et est converti en anion superoxyde O₂⁻ selon la réaction suivante : $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^- + NADP^+ + H$

La consommation intense d'oxygène associée, appelée explosion oxydative, va conduire à la génération d'une quantité importante d'O₂⁻ (54). Cet anion superoxyde constitue le point de départ de la synthèse des dérivés réactifs de l'oxygène, les ROS hautement toxiques pour le pathogène.

Voie d'activation par le PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

Les esters de phorbols comme le PMA ont d'abord été considérés comme des promoteurs de tumeur. Ils induisent divers remaniements génétiques et phénotypiques, dont la stimulation de la NADPH oxydase (55). Cette stimulation provient de l'activation de la protéine kinase C (PKC) qui est un récepteur des esters de phorbol (56). Le PMA induit une stimulation forte et continue de la Sérine/Thréonine kinase PKC. L'activité oxydase qui en résulte présente une longue phase de latence et une cinétique prolongée et intense. De ce fait, le PMA est devenu le contrôle positif le plus communément utilisé dans les tests fonctionnels du neutrophile.

5.6. Les médiateurs produits par les PMN

En plus de ses fonctions primaires dans la réponse immunitaire innée, le polynucléaire neutrophile a aussi la capacité de sécréter une grande variété de médiateurs que sont les cytokines et chimiokines servant à communiquer avec les

cellules environnantes. Il peut ainsi organiser la suite de la réponse immunitaire en recrutant d'autres effecteurs de la réponse immunitaire. Ces médiateurs peuvent être distingués en 2 grandes familles : les médiateurs peptidiques (57) et les médiateurs lipidiques (58-60).

Les médiateurs peptidiques sont constitués de la famille de l'IL-1 comprenant l'IL-1 β , l'IL-1 α et l'IL-1RA qui interviennent sur presque tous les effecteurs immunitaires effecteurs, en induisant une cascade de cytokines de la famille du TNF, de l'IL-8 et de la famille des MIP. L'induction de la sécrétion de TNF- α permet d'initier une cascade d'événements comme l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium, l'induction d'une réaction oxydative par les neutrophiles, la production de prostaglandines inflammatoires, PGI₂ et PGE₂, de l'IL-1, contribuant au recrutement et à l'activation de cellules inflammatoires. Bien que sécrétée par d'autres types cellulaires, l'IL-8 est l'interleukine que le neutrophile sécrète en plus grande quantité, lui-même étant la seule cible de l'IL-8. Elle induit chez lui des événements importants dont un changement de forme, une migration dirigée, une dégranulation et une libération des diverses protéines ainsi qu'une réaction oxydative.

Les médiateurs lipidiques comme le leucotriène B₄ (LTB₄), la prostaglandine E₂ et le thromboxane A₂ sont des composés formés à partir des phospholipides membranaires issus principalement du métabolisme de l'acide arachidonique.

Le neutrophile représente la cellule-clé, déclencheur du TRALI.

6. Le diagnostic différentiel du TRALI

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

6.1. L'œdème pulmonaire aigu de surcharge

L'œdème pulmonaire aigu de surcharge ou encore appelé TACO (Transfusion-Associated Circulatory Overloaded) avec lequel le TRALI est souvent confondu, répond à un traitement par vasodilatateurs et diurétiques (14, 61, 62). Le TACO peut avoir une présentation clinique proche du TRALI mais se distingue par des signes de défaillance circulatoire avec notamment une augmentation des pressions artérielles systoliques et diastoliques mais également par des signes morphologiques avec un cœur augmenté de volume.

6.2. Le choc anaphylactique post-transfusionnel

Il se distingue du TRALI par son apparition précoce et brutale et par l'association de réactions allergiques notamment cutanéomuqueuses, à type d'urticaire ou d'érythème et la présence d'un bronchospasme jusqu'à l'apparition d'un œdème de Quincke (63). Il n'y a pas en général d'œdème pulmonaire et la radiographie pulmonaire a un profil normal.

6.3. Le choc toxi-infectieux

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

6.4. Le choc hémolytique par incompatibilité ABO

Il est généralement plus précoce, survenant en général dans les premières minutes suivant la transfusion (22). Il s'associe souvent à des douleurs lombaires avec des signes cliniques et biologiques d'hémolyse intravasculaire aiguë. L'erreur transfusionnelle est rapidement constatée par vérification des documents transfusionnels.

Enfin, il existe de nombreuses réactions fébriles non hémolytiques post-transfusionnelles qui pourraient s'apparenter par leur physiopathologie à des formes incomplètes de TRALI, notamment en raison de l'absence totale ou partielle des critères pulmonaires.

7. Evolution et traitement

L'évolution du TRALI peut être grave et sa mortalité est évaluée à 5 à 18 % (64, 65). La mortalité atteint 37% aux Etats-Unis (17) Dans les cas favorables, l'évolution est rapidement résolutive sans séquelle en 72 heures. Ces données sont susceptibles d'évoluer compte tenu de la relative méconnaissance la sous-déclaration actuelle des cas de TRALI.

Le traitement est symptomatique et consiste en une assistance respiratoire par oxygénothérapie au masque, et ventilation mécanique si nécessaire (66). Le recours au remplissage vasculaire et aux médicaments vasopresseurs est parfois indispensable. En l'absence de signes de surcharge vasculaire comme pour le TACO, le traitement

diurétique ou vasodilatateur n'a pas d'intérêt et pourraient être délétères pour le patient transfusé en cas de mauvais diagnostic.

8. Stratégies et prévention

8.1. La déleucocytation

Des activateurs lipidiques, tels que le Lyso-phosphatidylcholine (Lyso-Pc) se développent essentiellement au cours de la conservation des PSL du fait des leucocytes et de plaquettes résiduelles dans le CGR (67, 68). La déleucocytation systématique (depuis 1998 pour les CGR et les plaquettes, depuis 2001 pour le plasma) joue un rôle important dans la prévention du TRALI (69). En effet, elle permet de limiter la libération de ces lipides activateurs mais également de réduire les cibles potentielles d'une agression des leucocytes par les allo-anticorps du receveur, limitant ainsi les risques de TRALI inversé, détaillé plus loin.

8.2. La déplasmatisation

La présence d'un volume résiduel de 50 mL de plasma dans tous les PSL explique l'implication de tous les types de produits sanguins dans le TRALI (69, 70). Le lavage pour préparer les PSL déplasmatisés est susceptible de retirer tous les médiateurs, immunologiques ou non, présents dans le plasma et qui sont en cause dans le TRALI.

8.3. Elimination des donneurs impliqués et/ou à risque dans le déclenchement du TRALI chez le receveur

Tous les produits sanguins susceptibles de présenter des anticorps anti-HLA sont éliminés, diminuant ainsi fortement le nombre de produits sanguins disponibles à la transfusion (71). La présence des anticorps anti-HLA est plus fréquente chez les femmes (72, 73) que chez les hommes et la proportion de femmes parmi les donneurs est 51% contre 49% des donneurs masculins (5). Les donneuses ayant eu des grossesses jouent un rôle considérable dans l'approvisionnement en sang alors que les risques d'allo-immunisation lors de leur grossesse ont fait reconsidérer l'utilisation de leurs dons. Ces mesures préventives semblent assez radicales dans la mesure où le nombre de dons ne suffit pas à combler les besoins en produits sanguins.

Chapitre 2 : Les mécanismes physiopathologiques du TRALI

1. Les hypothèses pathogéniques

Différents mécanismes physiopathologiques peuvent expliquer les circonstances de survenue du TRALI. Ces hypothèses sont basées sur des arguments cliniques et expérimentaux.

1.1. Mécanisme en une étape

La survenue du TRALI sous la seule dépendance de l'injection de PSL contenant un facteur activateur est justifiée par des arguments cliniques et expérimentaux :

- Des essais sur des volontaires sains (74,75) avaient montré que des anticorps granulo-agglutinants apportés lors de la transfusion étaient capables en dehors de tout contexte pathologique de provoquer le TRALI. Dans ces circonstances, les anticorps étaient capables à la fois de stimuler et de provoquer la dégranulation des PMN.
- En 1990, Seeger *et al* (76) avaient démontré que l'anticorps était le seul facteur extrinsèque nécessaire à l'agression pulmonaire.
- L'observation de nombreux cas cliniques évoque très fortement le rôle exclusif des anticorps. Betbèze *et al* (77) avait montré que la transfusion de plasma thérapeutique contenant un anticorps anti-HLA de classe II dans le cadre d'un traitement strictement préventif d'accidents purpuriques thrombotiques avait provoqué chez la patiente transfusée la survenue du TRALI.
- A l'inverse, d'autres études avaient souligné que la majorité des patients transfusés ayant l'antigène cible ne développait pas forcément un TRALI. Ainsi, Kopko *et al* (30) avait montré dans une étude rétrospective que parmi 36 patients transfusés avec une donneuse porteuse d'un anticorps anti-HNA-3a déjà impliqué dans un TRALI, seul 13 receveurs (36%) avait eu une réaction transfusionnelle, alors que cet antigène est présent chez plus de 95% de la population de référence.

Ces observations montrent d'une part l'impact du conflit immunologique dans la survenue du TRALI et d'autre part, qu'un anticorps peut à lui seul provoquer le TRALI. Des études plus récentes présentent que cette observation ne peut pas être le seul argument en faveur de tous les incidents de TRALI et qu'aucun anticorps particulier, en présence de sa cible, n'entraînait systématiquement l'apparition d'un œdème lésionnel pulmonaire.

1.2. Mécanisme en deux étapes

Le fait qu'un même conflit immunologique ne déclenche pas systématiquement le TRALI suggère fortement le rôle primordial de l'existence de situations cliniques favorisantes.

- Cette hypothèse est étayée par des modèles expérimentaux dans lesquels l'apparition de l'œdème dépend d'une stimulation préalable par le LPS dans le modèle sur explant pulmonaire (78), dans le modèle sur cellules HMVEC (79), sur le modèle murin *in vivo* (80) ou encore après stimulation par le fMLP dans le modèle sur poumon isolé (81).
- Dans la plupart des études cliniques, le TRALI ne serait donc pas la conséquence de la transfusion de PSL contenant le facteur activateur. Cet incident nécessiterait deux étapes :
 - Un évènement conduisant à la stimulation des PMN provoquant une leucostase intra-pulmonaire,
 - Un second évènement résultant de la transfusion et responsable de l'activation *in situ* des polynucléaires séquestrés aboutissant à la libération de radicaux oxydants et la libération du contenu de leur granules (82).

Cette théorie est en accord avec les deux étapes décrites dans la physiopathologie du TRALI, elle répond certainement à de nombreux cas cliniques notamment ceux survenant dans des conditions favorisantes.

1.3. Hypothèse d'un seuil de déclenchement du TRALI

Le TRALI résulterait du franchissement d'un seuil de déclenchement symbolisant l'intensité des agressions inflammatoires subies par le receveur du fait de l'addition de différents facteurs (25). Dans cette hypothèse, le facteur transfusionnel pourrait donc n'être qu'un de ces facteurs qui en fonction du niveau de prédisposition du receveur pourrait contribuer à atteindre le seuil de déclenchement du TRALI.

2. Les deux étapes de la survenue du TRALI

La connaissance des particularités anatomophysiologiques éclaire les différentes modalités étiologiques susceptibles de conduire à l'apparition du TRALI ainsi que le déroulement de ce processus pathogène en deux étapes successives :

- La première étape correspond à l'adhérence lâche des PMN stimulés et leur stase intra pulmonaire, phase réversible en 24 heures à 72 heures (83).
- La seconde étape est celle de l'agression des endothéliums capillaires par la libération des radicaux oxydants et des enzymes contenus dans les granules des PMN activés (84). Elle est provoquée par un facteur déclenchant agissant sur les PMN préalablement stimulés.

2.1. La première étape

Le premier facteur est responsable du stade de leucostase intra-pulmonaire dans lequel deux protagonistes sont impliqués, le neutrophile et la cellule endothéliale :

- Sous l'effet d'un stimulus pro-inflammatoire, l'augmentation de l'adhérence des PMN, est liée à un changement conformationnel des $\beta 2$ intégrines du PMN qui passent d'un état lâche à un état adhésif et peuvent donc adhérer à leur ligand ICAM-2 (CD102) exprimé constitutivement sur l'endothélium capillaire (85,86). L'endothélium capillaire pulmonaire lui-même activé accroît l'expression de ses molécules d'adhésion (87). C'est aussi à ce stade de stimulation que les PMN font appel à d'autres fonctions de défense en activant certains mécanismes oxydatifs comme celui de la NADPH oxydase (88-90).
- A ce stade l'expression de sélectines P puis E sur les cellules endothéliales et leurs interactions avec leur ligands leucocytaires PSGL-1 (CD162) ou sialyl- Lewis provoquent une adhérence lâche, un ralentissement du transit et une accumulation de PMN dans les vaisseaux capillaires pulmonaires. L'activation des cellules endothéliales conduit à la sécrétion de cytokines et de chimiokines qui agissent localement sur les PMN et les cellules endothéliales elles-mêmes. Cela induit l'expression des molécules ICAM-1 sur celles-ci et contribue à l'induction du changement conformationnel des intégrines $\beta 2$ LFA-1 et Mac-1 des polynucléaires provoquant une adhérence ferme (Figure 8).

Physiologiquement, les PMN roulent le long de la paroi des vaisseaux capillaires grâce aux interactions lâches de type sélectine avec les cellules endothéliales. Dans les

poumons le diamètre des capillaires est inférieur à la largeur des PMN, ralentit le transit de ceux-ci et facilite l'adhésion ferme entre les PMN et l'endothélium.

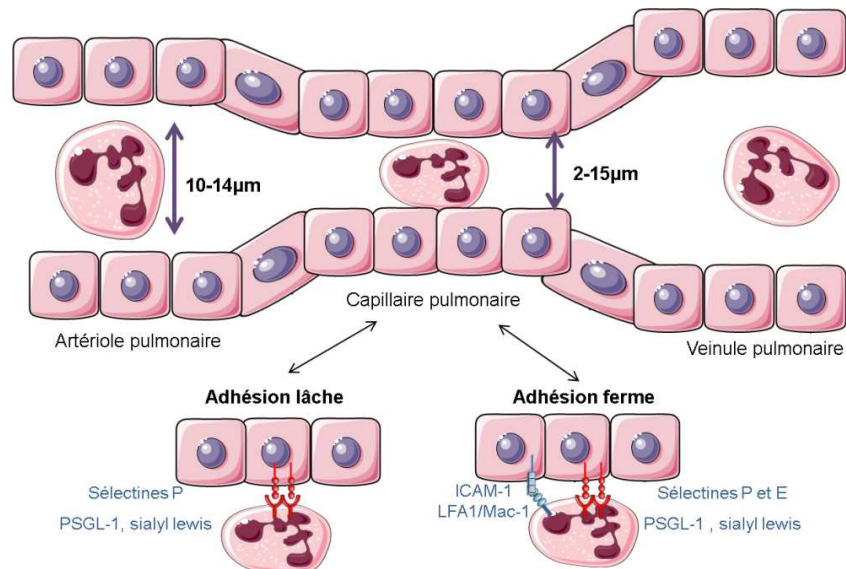


Figure 8. La déformation du neutrophile lors de son passage dans le capillaire pulmonaire. Après différents stimuli inflammatoires, il existe une leucostase dans les capillaires pulmonaires : l'endothélium pulmonaire exprime des molécules d'adhérence (sélectines P puis E) qui provoquent un ralentissement du transit des PMN en formant une adhérence lâche avec leurs ligands leucocytaires (PSGL-1 et sialyl-lewis^x). L'adhérence ferme résulte de l'expression par les PMN de leur β 2 intégrines (LFA1 et Mac-1) qui établissent des liaisons avec les molécules ICAM-1 des cellules endothéliales. D'après Bux *et al.* Br J Haematol 2009 (24).

Mais à ce stade il n'y a pas de lésion de la membrane basale alvéolo-capillaire, le malade est simplement dans une situation à risque de développer le TRALI.

2.2. La deuxième étape

Le second facteur, conduit à l'activation des PMN séquestrés : sous l'action d'un déclencheur qui active les PMN préalablement sensibilisés, survient la libération des radicaux oxydants et des enzymes granulaires des PMN au contact de l'endothélium des capillaires pulmonaires. Cet événement pourrait être directement responsable des lésions à la membrane basale endothéliale capillaire avec une augmentation de la perméabilité endothéliale qui conduit à l'apparition de l'œdème lésionnel pulmonaire.

3. Les facteurs de risque chez le patient transfusé

Selon cette hypothèse les deux étapes de sensibilisation puis d'activation du PMN se succèdent et sont indépendantes; le patient se trouve dans des conditions cliniques favorisantes pouvant sensibiliser les neutrophiles et l'endothélium pulmonaire. Ces situations sont *a priori* incapables à elles seules d'aboutir à un œdème lésionnel pulmonaire puisqu'elles ne fournissent pas le stimulus activant les PMN. Le TRALI survient donc en général chez des malades prédisposés et cette susceptibilité particulière correspond à des situations cliniques où une leucostase intra-pulmonaire est susceptible de se produire (22) (Tableau IX).

Tableau IX. Situations favorisant la survenue du TRALI.

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

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

4. Les facteurs activant les PMN et les cellules endothéliales des capillaires

4.1. Le conflit immunologique

La responsabilité des anticorps reconnaissant des antigènes exprimés sur les neutrophiles dans l'activation de ceux-ci fut suspectée et reconnue depuis longtemps sans clairement le démontrer (91-94). Il peut s'agir d'anticorps anti-HLA de classe I ou d'anticorps ciblés sur les déterminants du neutrophile, les anticorps anti-HNA. Ils se fixent directement sur les neutrophiles qui portent les déterminants antigéniques.

4.1.1. Les anticorps anti-HLA

4.1.1.1. Le système HLA

A partir des années 1930, des observations expérimentales de rejet de greffes cutanées entre des souris génétiquement non apparentées ont mené à la découverte du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (95). Dès le début des années 50 (96), le rejet de greffe entre donneurs et receveurs différents humains fut à l'origine de la découverte de structures analogues chez l'homme par Jean Dausset, lauréat du prix Nobel de médecine en 1980 (97). C'est lors de son activité de transfuseur-réanimateur pendant la seconde guerre mondiale que Jean Dausset établit l'existence de groupes leucocytaires, de même qu'il y en a pour les érythrocytes (groupe A, B, AB et O). Bien qu'il ait été finalement détecté sur la quasi-totalité des cellules nucléées, le CMH humain est alors dénommé HLA (Human Leukocyte Antigen) car la première molécule d'histocompatibilité identifiée avait été repérée comme un antigène leucocytaire (96).

➤ Génétique du système HLA

Les gènes HLA codent pour des protéines membranaires (molécules HLA) qui fixent et présentent les peptides antigéniques au récepteur présent à la surface du lymphocyte T (TCR) pour déclencher une réponse immunitaire adaptée. Ces molécules HLA permettent la reconnaissance par l'organisme des peptides endogènes du soi ou des peptides exogènes « du non-soi » (pathogène) (98). La région HLA est située sur le bras court du chromosome 6 sur la bande 6p.21-3. Elle s'étend sur une distance d'environ 4000kb, ce qui correspond à 1/1000 du génome humain (99).

Caractéristiques des molécules HLA :

Elles représentent un système polymorphe et polygénique (100). Le système HLA est également dit codominant puisque les 2 allèles parentaux pour chaque gène sont exprimés. Ceci explique la diversité des molécules HLA au niveau individuel.

- **Polymorphisme génétique multiallélique** (101): il existe dans l'espèce humaine un très grand nombre d'allèles pour chaque gène HLA. Chaque individu est hétérozygote pour les gènes HLA, et n'exprime qu'un ou deux des allèles de chaque gène présents dans l'espèce humaine. Le nombre important de combinaisons alléliques pour les différents gènes explique la grande diversité du système. Il existe pour les deux chromosomes 6 de chaque individu plus de 10^{10} combinaisons génotypiques possibles. Cette caractéristique rend chaque individu quasiment unique. Ceci explique pourquoi il est

très difficile de trouver deux individus non apparentés HLA identiques dans la population générale.

- **Polymorphisme de la protéine correspondante** : chaque allèle code pour une protéine caractérisée par un ou plusieurs acides aminés variants comparée aux protéines codées par d'autres allèles.

- **Codominance et transmission «en bloc»** : pour chaque gène HLA, l'hétérozygotie se traduit par l'expression des deux allotypes portés chacun par un chromosome 6. L'ensemble des gènes HLA ou haplotype HLA de l'un des chromosomes paternels et de l'un des chromosomes maternels est transmis aux enfants. Chaque enfant reçoit un haplotype venant du père et un haplotype venant de la mère dont les produits protéiques sont exprimés à la surface des cellules.

Le système HLA est subdivisé en 3 régions qui contiennent chacune de nombreux autres gènes (Figure 9). Les molécules HLA de classe I comprend 3 gènes HLA dits "classiques" : HLA-A, HLA-B, HLA-C. Les molécules HLA de classe II comprend 3 paires de gènes HLA dits "classiques", HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1). Située entre les régions de classe I et de classe II, la région III ne renferme pas de gènes intervenant dans la présentation antigénique. Elle contient des gènes codant pour des protéines du système du complément (C2, C4, facteur B), pour le TNF et pour les lymphotoxines (102).

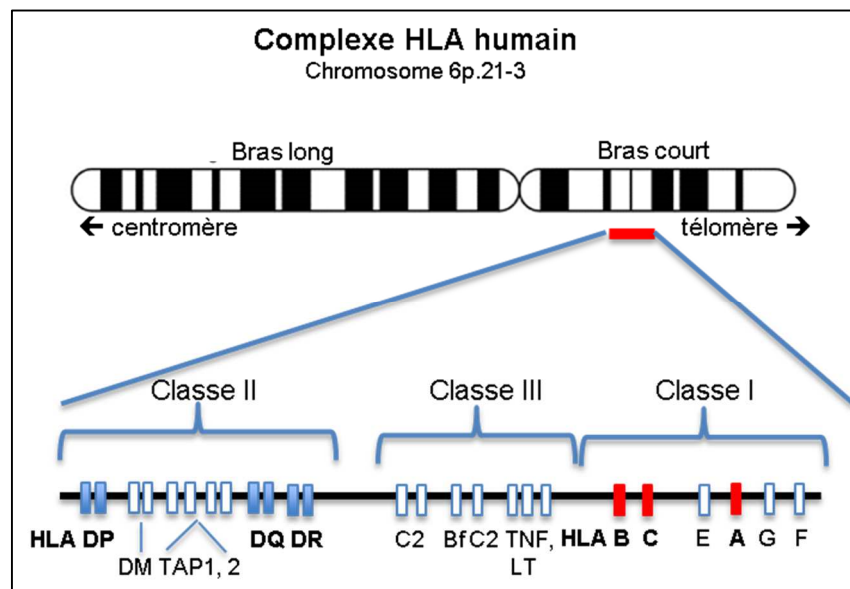


Figure 9. Représentation schématique des gènes HLA. Les représentations schématiques du complexe HLA sont présentées, illustrant les principaux gènes codant pour les molécules. La taille des gènes et les distances qui les séparent ne sont pas représentées à l'échelle. Le locus de classe III concerne des gènes qui codent des molécules autres que des molécules présentatrices de peptides. LT : lymphotoxine ; TAP : transporter associated with antigen processing, TNF : tumor-necrosis factor. D'après Immunité, ed. de boeck, 2009.

➤ Structures des molécules HLA

Les molécules HLA de classe I et II sont des glycoprotéines de membrane. Ce sont des hétérodimères dont les deux chaînes α et β s'apparient de manière non covalente (Figures 10 et 11). La partie extracellulaire de l'hétérodimère expose deux domaines proximaux selon le modèle «domaine immunoglobulinique» et deux domaines distaux comportant chacun une plage de feuillets β plissés surmontée d'une hélice α .

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

▪ Molécules HLA de classe I

Elles sont constituées de l'association d'une chaîne lourde α de 45 kD ancrée dans la membrane qui possède trois domaines extracellulaires et d'une chaîne légère, la β 2-microglobuline de 12kD (103), qui est une protéine invariante codée par un gène qui n'appartient pas au complexe génique HLA. La molécule HLA de classe I est représentée sur la Figure 10, à gauche.

La β 2-microglobuline est constituée par un seul domaine extra-membranaire. Elle possède une fonction de stabilisation de l'hétérodimère et de transport de la chaîne lourde α à la membrane cellulaire.

La chaîne lourde α possède un domaine α 3 qui s'apparie à la β 2-microglobuline. Les domaines α 1 et α 2 délimitent le sillon de présentation antigénique. Les extrémités des hélices α de ces domaines sont rapprochées, fermant ainsi le sillon. Le peptide enchâssé est donc de petite taille, en moyenne 9 acides aminés, car ses deux extrémités sont bloquées dans le sillon (Figure 10, à droite) (104).

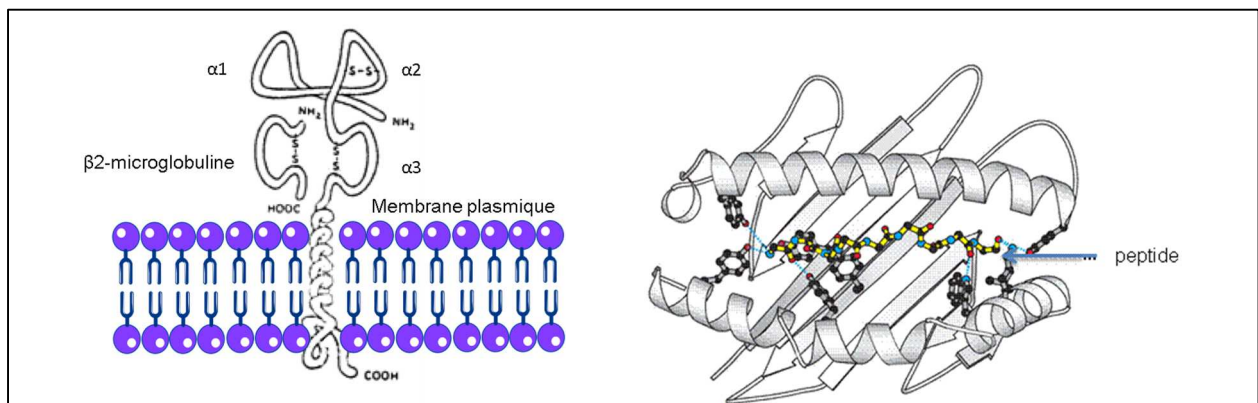


Figure 10. Représentation des molécules HLA de classe I. Ces structures cristallines à droite (vue par le dessus) des molécules HLA montrent comment les peptides (en jaune et points noirs) se fixent sur les planchers des sillons de liaisons aux peptides et peuvent être reconnus par les lymphocytes T. D'après Immunité, ed. de boeck, 2009.

▪ Molécules HLA de classe II

Chaque paire de gènes code pour deux chaînes, une chaîne α et une chaîne β , toutes deux ancrées dans la membrane, comportant chacune deux domaines extracellulaires. L'appariement des domaines distaux $\alpha 1$ et $\beta 1$ délimite le sillon de présentation. Les extrémités de leurs hélices α sont moins rapprochées que dans le cas de la classe I et le sillon de présentation est ouvert. Le peptide peut déborder et donc être plus long, entre 12 et 25 acides aminés. La molécule HLA de classe II est représentée sur la Figure 11, à gauche (105).

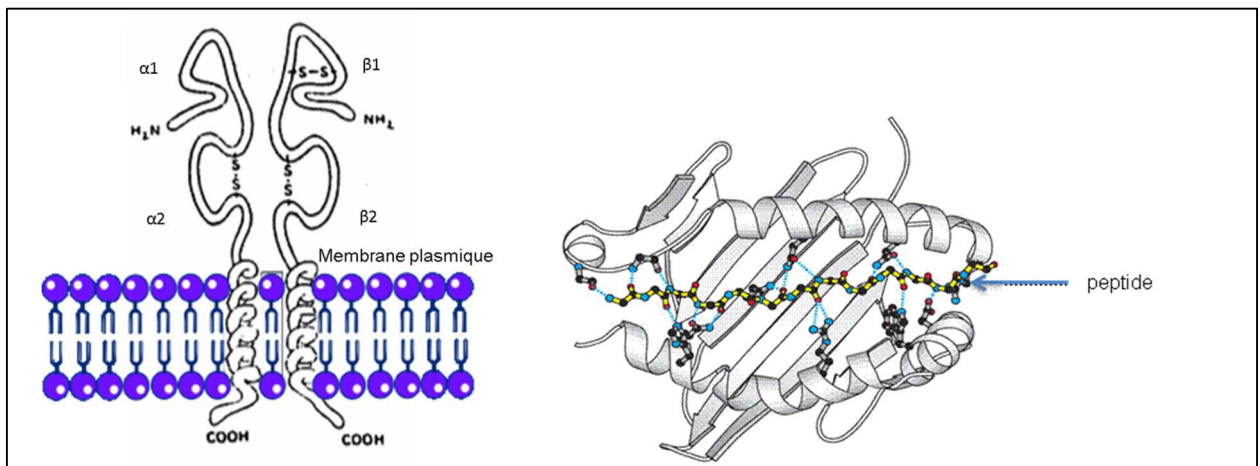


Figure 11. Représentation des molécules HLA de classe II. Ces structures cristallines, à droite (vues par le dessus) des molécules HLA montrent comment les peptides (en jaune et points noirs) se fixent sur les planchers des sillons de liaisons aux peptides et peuvent être reconnus par les lymphocytes T. D'après Immunité, ed. de boeck, 2009.

4.1.1.2. L'allo-immunisation

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

- **Des greffes d'organes allogéniques** (106) : les antigènes HLA portés par le greffon sont susceptibles de provoquer une immunisation chez le receveur lorsqu'il y a une incompatibilité dans le système HLA de classe I ou de classe II.
- **Des transfusions** (107): l'allo-immunisation anti-HLA transfusionnelle est bien connue, le système HLA étant considéré comme le système d'alloantigène le plus immunogène.
- **Des grossesses** : les femmes enceintes multipares développent des anticorps anti-HLA contre les antigènes HLA de classe I ou classe II d'origine paternelle portés par le fœtus. Ces anticorps ne jouent pas de rôle néfaste connu vis-à-vis du fœtus. Ces anticorps disparaissent rapidement dans les semaines qui suivent la grossesse dans la

majorité des cas. Ils peuvent en revanche réapparaître lors d'une grossesse ultérieure ou lors d'une transfusion sanguine. Ils persistent à un titre significatif pendant des années.

L'évaluation de l'incidence de l'allo-immunisation après accouchement a fait l'objet de nombreux travaux. Les premiers travaux de Payne (108) montrent que des anticorps étaient présents chez environ 18% des femmes en fin de grossesse et que le pourcentage augmentait avec le nombre de grossesses (pouvant atteindre 60% pour 5 grossesses). Ce même auteur montre que cette allo-immunisation était encore détectable trois ans après la fin de la grossesse, et dans certains cas, jusqu'à huit ans après la dernière grossesse.

Plus récemment en 2008, les travaux de Powers *et al* (73) montrent une prévalence d'anticorps anti-HLA de 25% chez les donneuses quelques soient leurs antécédents et de 12% chez les donneurs masculins ayant des antécédents transfusionnels.

Une étude LAPS (Leukocyte Antibody Prevalence Study) publiée par l'équipe de Triulzi (109) s'est fondée sur l'analyse de 5 834 femmes qui avaient eu de 0 à plus de quatre grossesses. Dans cette étude, le taux d'immunisation aux anticorps était proportionnel au nombre de grossesses avec des chiffres de 1,7% chez les femmes nullipares, 11,2% pour 1 grossesse, 22,3% pour 2 grossesses, 27,5% pour 3 grossesses et ce taux atteignait 32,2% pour les femmes ayant au moins 4 grossesses (dépistage LabScreen, One Lambda).

Une autre étude récente publiée en 2013 (110) analysait le taux d'allo-immunisation chez 294 femmes ayant eu au moins une grossesse. 54,4% d'entre elles soit 159 femmes étaient immunisées.

4.1.1.3. Les anticorps anti-HLA de classe I

Le rôle étiologique des anticorps anti-HLA a été suggéré dès 1985 à propos de 36 cas de TRALI dont 26 (72%) avaient reçu des produits sanguins contenant des anticorps anti-HLA de classe I correspondant à au moins un des antigènes du receveur (2). La cible des anticorps anti-HLA de classe I est ubiquitaire, représentée sur toutes les cellules nucléées : PMN, monocytes/macrophages, plaquettes, cellules endothéliales et pneumocytes. Ceci suggère que le schéma physio-pathogénique de leur action puisse être plus complexe qu'une simple interaction avec les PMN. Il a en effet été montré que les cellules endothéliales sont susceptibles de s'activer et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires par pontage de leurs molécules de classe I par un anticorps (111). Cette activation met en jeu différents facteurs pro-inflammatoires dont C5a, le TNF α , l'IL-1 et l'IL-8 (112) et crée ainsi une situation favorable à une activation des PMN.

Dans un modèle murin *in vivo* développé à partir de souris congéniques résistantes (isogéniques sauf pour le locus H-2 équivalent murin du CMH humain) (79), il a été montré que l'anticorps monoclonal anti-H-2d (l'équivalent de l'anticorps anti-HLA de classe I chez l'humain) injecté par voie veineuse provoquait un œdème pulmonaire chez les souris BALB/c mâles porteuses de cet antigène. Les souris femelles de cette même lignée ne sont pas permissives à cet œdème sauf si elles ont été préalablement stimulées par voie endotrachéale. Mais dans la souche BALB.K qui ne porte pas cette spécificité H-2 l'œdème ne peut pas être provoqué. Dans un modèle identique la déplétion en neutrophiles de souris permissives de la souche BALB/c H-2d supprime cette sensibilité. Ces mêmes animaux deviennent sensibles à ce stimulus lorsqu'on leur injecte des PMN de souche H-2 différente, c'est-à-dire non H-2d. Enfin dans ce même travail, lorsque les PMN réinjectés proviennent d'animaux ayant leur gène pour les récepteurs Fcγ sur les granulocytes invalidés, ces souris FcRγ^{-/-}, sont réfractaires au déclenchement d'un ALI par ce même anticorps monoclonal (80, 113, 114).

4.1.1.4. Les anticorps anti-HLA de classe II

Le rôle déclenchant des anticorps anti-HLA de classe II dans le TRALI a été mis en évidence en 2001 et confirmé en 2002 puis en 2011 (115-117). Les monocytes, macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés ainsi que les cellules endothéliales activées expriment des molécules de classe II. En revanche les PMN n'expriment pas ces antigènes et ceci a conduit à suspecter le rôle des monocytes. Dans une étude portant sur les monocytes mis en contact *in vitro* avec des anticorps spécifiquement anti-classe II, une augmentation de l'expression de marqueurs de l'inflammation IL-1β, TNFα et facteur tissulaire (TF) a été observée. Celle-ci ne survenait que si la cible antigénique était présente sur les cellules (117).

L'hypothèse émise selon les résultats de cette étude porte la responsabilité des anticorps anti-HLA de classe II pour déclencher un TRALI indirectement par l'activation des monocytes. Ces cellules étant elles mêmes susceptibles d'activer les cellules endothéliales pulmonaires, de provoquer à leur surface l'expression de molécules d'adhésion CD31 (PECAM) et CD34 et de stimuler puis d'activer les PMN par la libération de cytokines pro-inflammatoires.

Néanmoins, ces hypothèses concernant les anticorps anti-HLA de classe II se heurtent à une objection : le délai d'activation des monocytes par les anticorps anti-HLA de classe II et la quantité de cytokines produites localement sont peu compatibles avec le délai souvent très bref d'apparition du TRALI (118-119). Cependant les monocytes activés sont

capables de sécréter du TNF et le LTB4 dans un délai compatible avec celui de l'émergence d'un œdème lésionnel pulmonaire.

L'étude anatomique d'un patient décédé d'un TRALI imputé à des anticorps anti-HLA de classe II n'a permis de démontrer la présence de ces molécules (120). Cependant, ceci ne prouve pas que les hypothèses basées sur le fait que les cellules endothéliales activées et les monocytes sont la cible des anticorps anti-HLA classe II ne soient pas fondées. Les mécanismes qui conduisent donc de l'injection d'un anticorps anti-HLA classe II au TRALI restent également imprécis.

4.1.2. Les anticorps anti-HNA

A la différence des anticorps anti-HLA classe I, ces anticorps reconnaissent les seuls antigènes sur les neutrophiles ou accessoirement sur quelques autres cellules de lignées myéloïdes ou lymphoïdes.

Les principaux systèmes antigéniques portés par les PMN sont présentés dans le Tableau X, chacun avec des propriétés propres, pour ce qui concerne leur immunogénicité ou leur répartition cellulaire et le rôle fonctionnel (121).

Tableau X : Le système HNA (Human Neutrophil Antigen). Bux *et al.* Transfusion, 1999.

Systèmes	Antigènes	Fréquences phénotypiques	Expression cellulaire	Structures fonctionnelles
HNA-1	HNA-1a	0,6	100% des PMN	FcγRIIIB, CD16
	HNA-1b	0,8		
	HNA-1c	0,05		
HNA-2	HNA-2a	0,97	40 à 80% des PMN	PRV-1, CD 177
HNA-3	HNA-3a (5b)	0,97	Granulocytes, lymphocytes, plaquettes	
HNA-4	HNA-4a	0,99	PMN, plaquettes	B2 intégrines, CR3, CD11b
HNA-5	HNA-5a		PMN, monocytes, plaquettes	B2 intégrine, LFA-1, CD11a

Ici sont présentés les systèmes des neutrophiles, avec la distribution cellulaire des phénotypes dits granulocytaires, leur hétérogénéité d'expression et les identifiants moléculaires.

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

lapin *ex vivo* (122). Dans ce modèle, l'injection simultanée d'un anticorps anti-HNA-3a granulo-agglutinant, de neutrophiles humains portant cet antigène et de complément apporté par du plasma de lapin, produisait un œdème lésionnel sévère survenant, dans des délais de 2 à 6 heures comparables à ceux observés en clinique (123).

La capacité à stimuler les PMN *in vitro* sur des modèles de cellules HMVEC cultivées en monocouche a également été montrée pour les anticorps anti-HNA-A3, HNA-4a et HNA-5a (124-126).

4.2. Le conflit non immunologique

4.2.1. Les lipides activateurs

Le rôle de lipides bioactifs activateurs des PMN dans le déclenchement du TRALI et notamment le lysophosphatidylcholine Lyso-PC apporté par le sang transfusé a été invoqué (28). Ces composés lipidiques qui s'accumulent dans les poches de PSL au cours de leur conservation ont une action activatrice sur les PMN. Les lyso-PC sont des composés métaboliques de dégradation des membranes cellulaires et stimulent le métabolisme oxydatif des PMN *via* leur récepteur PAF (127). Leur pouvoir pathogène a été établi cliniquement à partir de l'étude du sérum post-transfusionnel d'une série de patients ayant présenté un TRALI qui contenait une activité stimulante de PMN significativement supérieure à celle des PMN de patients n'ayant pas présenté de TRALI (28).

Expérimentalement *ex vivo* le rôle de ces activateurs a été établi dans un modèle de poumon isolé de rat sensibilisé préalablement par une perfusion de LPS présents dans les plasmas obtenus à partir de concentrés globulaires ou de concentrés de plaquettes conservés pendant un long délai (123, 128). Ces travaux établissaient également une relation entre la présence de ces lipides et la durée de conservation du produit sanguin en comparant la pathogénicité de concentrés globulaires ou plaquettaires conservés à celui de concentrés frais (129,130). Dans ce modèle, l'œdème pulmonaire n'a été observé qu'avec les produits conservés dont l'injection devait en outre être précédée par une perfusion de LPS. Cette étude conduit à l'hypothèse que ces facteurs lipidiques ne peuvent être efficaces dans le déclenchement d'un œdème pulmonaire lésionnel que dans un contexte inflammatoire préalable confirmant l'hypothèse d'un mécanisme du TRALI en deux étapes (82).

4.2.2. Les autres facteurs non spécifiques

Au cours de la conservation des concentrés plaquettaires, d'autres médiateurs activateurs des PMN peuvent être libérés. Le ligand de CD40 sous sa forme soluble (sCD40L ou CD154) s'accumule dans le plasma baignant les plaquettes pendant leur conservation (68). Plus récemment, l'expression de CD40 sur les PMN a été rapportée, faisant de cette cellule une cible potentielle de CD154 (131) et ouvrant la possibilité que cette voie d'activation directe des PMN puisse être en cause dans le TRALI. Des expériences *in vitro* avec des cellules endothéliales humaine en cultures (HMVEC) ont montré le potentiel cytotoxique des PMN activés par CD154 alors que les PMN non activés n'ont pas cet effet.

4.3. Un cas particulier : le TRALI inversé

Wolf et Canal (132) évoquèrent en 1976 l'apparition d'un œdème pulmonaire lésionnel du à la présence d'anticorps chez le receveur. Le TRALI d'évolution mortelle est survenue chez une patiente présentant l'anticorps anti-HLA-A11. L'antigène correspondant était présent sur les leucocytes contenus dans le produit sanguin du donneur. Plus tard en 1985, Popovsky et Moore évaluèrent la survenue d'un TRALI inversé dans 5% des cas.

5. Les modèles expérimentaux

Différents modèles expérimentaux dont certains cités ci-dessus ont contribué à établir les mécanismes mis en jeu dans les œdèmes pulmonaires lésionnels aigus. Chacun de ces modèles a apporté des données précieuses pour l'interprétation des facteurs contribuant à l'émergence du TRALI. Ils ont démontré la multiplicité des voies physiopathologiques qui peuvent conduire au TRALI. Le Tableau XI résume les différents modèles expérimentaux décrits.

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

Matériel	Auteurs	Espèce/souche	Résultats
<i>In Vivo chez l'Homme</i>			
Volontaire sain	Brittingham, 1957 (74)	Humaine	Œdème pulmonaire reproductible avec 50 mL de sang contenant des anti-granulocytes
<i>Ex Vivo sur un poumon isolé</i>			
Explant pulmonaire	Seeger, 1990 (76)	Lapin	Nécessité d'un anticorps, de polynucléaires et de complément
	Silliman, 1998 (26)	Rat	Nécessité de 2 événements : LPS + plasma de sang conservé
	Sachs, 2006 (81)	Rat	Nécessité d'une expression quantitative suffisante de l'Ag (HNA-2A) qui peut être augmenté par le fMLP, ou d'une double frappe
<i>In Vitro sur cellules</i>			
Monocytes isolés	Kopko, 2003	Humaine	Induction de l'expression de l'IL-1 β , TNF α et du facteur tissulaire (TF) sur des monocytes par un anti-classe II
Cellules HMVEC	Wyman, 2002 (90)	Humaine	Induction de molécules d'adhérence par LPS et adhérence des PMN non activés sans dommage cellulaire. Cytolyse après addition de Lyso-PC
	Silliman 2007 (133)	Humaine	Lyse par anti-HNA-3a de cellules préalablement stimulés par du LPS
	Khan, 2006 (131)	Humaine	Lyse des cellules par le CD40L développé dans le surnageant de plaquettes conservées

<i>In vivo</i> chez l'animal			
Anticorps monoclonal anti-H-2^d, classe I : MAB 34-1-2s	Matthay <i>et al</i> , 2006 (114)	Souris BALB/c (H-2 ^d) mâles BALB.K	Létalité 50% Dépendance FcR γ (souris FcR γ ^{-/-}) Dépendance des PMN, Indépendance de C5aR ^{-/-}
	Hicks and Strait, 2011 (163)	Souris BALB/c (H-2 ^d)	Dépendance des macrophages Activation du complément et production de C5a
Anticorps BALB.K anti BALB/c	Logdberg, 2009 review (76), Sheppard 2007 (134)	Souris BALB/c (H-2 ^d)	Dépendance d'un priming par LPS et d'une vitesse d'injection lente
Anticorps monoclonal MAB CMH Classe I : OX-18 et OX-27 MAB CMH Classe II : OX-3 et OX-6	Silliman, 1998 (28), 2006 (annual meeting of the AASB: Australian Accounting Standards Board)	Rat Sprague Dowley	2 évènements nécessaires : 1) LPS 2) MAB Classe. I MAB cl I seul : pas de TRALI Anti-Classe. II et anti-granulocytes : inopérants

OBJECTIF DU TRAVAIL PRESENTE

L'objectif de mon travail est d'analyser l'implication des anticorps anti-HLA de classe I dans l'activation des polynucléaires neutrophiles afin d'évaluer le lien entre l'existence d'un conflit immunologique et la survenue du TRALI. Il s'inscrit dans mon projet de Thèse de Doctorat avec la partie expérimentale en collaboration entre le laboratoire HLA de l'EFS de Grenoble et le laboratoire GREPI (Groupe de Recherche et d'Etudes du Processus Inflammatoire, CNRS FRE 3405).

La première partie de cette étude consiste à mettre en place les outils de travail qui seront ensuite les supports expérimentaux : (1) sélection de sérums pertinents présentant des anticorps anti-HLA (dépistage, purification, déclencheurs des neutrophiles), (2) identification des antigènes HLA exprimés par les neutrophiles (typage HLA à partir d'ADN génomique des cellules cibles), (3) du comportement des neutrophiles, avec l'activation NAPDH oxydase suite à différents stimuli afin d'étudier *ex vivo* le mécanisme physiopathologique du TRALI.

Le TRALI représente un accident transfusionnel grave par transfusion de produits d'aphérèse. Une meilleure compréhension sur le conflit immunitaire est nécessaire pour définir des critères positifs de diagnostic et pour émettre le rationnel pour les mesures ciblées de prévention et de traitement.

MATERIEL ET METHODES

1. Préparations biologiques

1.1. Purification de neutrophiles humains à partir de sang frais

1.1.1. Prélèvement de tube de sang à l'Etablissement Français du Sang

Pour chaque expérience, deux tubes de sang frais (soit environ 15 mL) sont prélevés sur héparinate de lithium au site de collecte de l'Etablissement Français du Sang de Grenoble chez un donneur volontaire sain dont le typage HLA est connu (au laboratoire HLA, Dr D. Masson). Chaque prélèvement est autorisé après vérification du consentement écrit du donneur. Les neutrophiles sont purifiés dans l'heure suivant le prélèvement.

1.1.2. Technique de purification par gradient de Ficoll

Les neutrophiles sont purifiés en milieu stérile. Les réactifs et tampons utilisés sont stérilisés par filtration (0,22 µm, Millipore) et conservés pendant maximum 2 semaines à +4°C.

Les neutrophiles sont isolés sur gradient de densité Ficoll-Hypaque selon la méthodologie adaptée de celle décrite par Böyum en 1968 (135). Le sang total est dilué 1 :1 dans du tampon PBS (« phosphate-buffered saline solution » : KCl 2,7 mM ; NaCl 137 mM ; KH₂PO₄ 1,5 mM ; Na₂HPO₄ 8,1 mM ; pH 7,3) contenant 1% (v/v) de citrate de sodium trisodique stérile. Cette dilution est déposée délicatement sur une couche de Ficoll-Hypaque (d=1,077) à raison d'un volume de Ficoll pour deux volumes de la suspension cellulaire. Une centrifugation de 20 minutes à 800 x g à 20°C (sans accélération et sans freinage) sépare la couche lympho-monocytaire (d<1,077) des polynucléaires et érythrocytes, concentrés dans le culot. Puis le surnageant (plasma, lymphocytes et Ficoll) est aspiré pour ne laisser que les érythrocytes et les granulocytes du culot. Le culot est remis délicatement en suspension dans du tampon de lyse hypotonique (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA pH 7). La lyse des érythrocytes est obtenue après 5 à 15 minutes sur la glace. La lyse des érythrocytes est visible par le changement de coloration en rouge framboisé, dû à la libération du fer de l'hème. Après centrifugation pendant 8 minutes 400 x g à 4°C, le culot est lavé à nouveau dans du tampon de lyse puis finalement remis en suspension dans le tampon PBS à une concentration finale de 4 x 10⁶ cellules/mL.

1.2. Séparation des cellules mononucléées

1.2.1. Séparation des lymphocytes totaux

Les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées sur gradient de densité Ficoll-Hypaque selon la méthodologie adaptée de celle préalablement décrite par Böyum (135). Le sang total est dilué au tiers dans une solution de PBS. Cette dilution est déposée délicatement sur un gradient de Ficoll-Hypaque à raison d'un volume de Ficoll pour trois volumes de la dilution précédente. Une centrifugation de 20 minutes à 800 x g à 20°C permet de recueillir un anneau de cellules mononucléées à l'interface plasma-Ficoll ($d < 1,077$). Cette couche contient environ 80% de lymphocytes T, 10% de lymphocytes B et 10% de monocytes. Les cellules recueillies sont ensuite lavées deux fois en tampon PBS.

1.2.2. Séparation des lymphocytes T

Les cellules T sont séparées par un tri immunomagnétique, qui retient les cellules d'intérêt par couplage à un anticorps monoclonal anti-CD2. Un volume de 100 µL de ces billes immunomagnétiques (FluoroBeads®-T) sont ajoutées à l'échantillon : 2ml de sang total pour l'isolement des lymphocytes T. La fixation des lymphocytes aux billes se réalise par retournements doux pendant 3 minutes. Les billes sont retenues dans l'entrefer d'un aimant puis remises en suspension dans du RPMI 1640 à la concentration finale de 2×10^6 cellules/mL.

2. Typage HLA

2.1. Nomenclature HLA

Selon la technique utilisée, la nomenclature HLA est différente, générique ou allélique (Figure 12) (101). Dans le cas d'une technique sérologique, la nomenclature identifie le locus suivi d'un numéro identifiant l'antigène (par exemple, HLA-A2, HLA-A3, HLA-B8, HLA-B27 : identification générique). La nomenclature allélique utilisée en biologie moléculaire identifie le gène, suivi d'un astérisque et d'un numéro à deux chiffres (qui définit la spécificité de l'allèle) ou quatre à huit chiffres (qui précise le variant allélique d'un allèle donné). Un typage HLA avec deux chiffres (ou deux digits) correspond à une résolution générique (par exemple, HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-B*08, HLA-B*27). Un typage HLA avec quatre chiffres ou huit chiffres (ou digits) correspond à une résolution allélique (par exemple, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-B*07:02, HLA-B*27:05).

➤ Sérologie

Exemple: HLA-A2 ou HLA-A3 ou HLA-B8 ou HLA-B27

➤ Biologie moléculaire

2 niveaux de résolution:

- **Basse résolution = typage HLA générique = typage HLA « 2 digits »**

Exemple: HLA-A*02 ou HLA-A*03 ou HLA-B*08 ou HLA-B*27

- **Haute résolution = typage HLA allélique = typage HLA « 4 digits »**

Exemple:

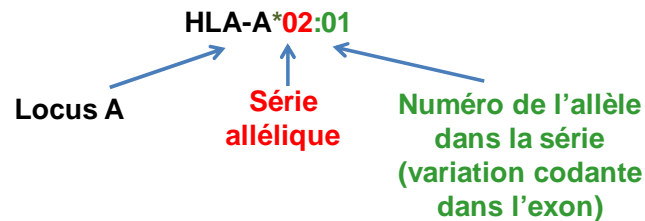


Figure 12. La nomenclature HLA.

Le choix de la technique dépend de l'indication pour laquelle un résultat de typage HLA a été demandé. En général un typage à 2 digits est utilisé dans le cadre de l'urgence pour la greffe d'organes pour le typage d'un donneur ou un receveur d'organes. Un typage HLA à 4 digits est indiqué dans la recherche d'une compatibilité tissulaire entre un donneur et son receveur dans le cadre d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

2.2. Technique de sérologie

2.2.1. Lymphocytotoxicité complément-dépendante (LCT) : principe

La lymphocytotoxicité complément-dépendante, communément appelé LCT a été largement utilisée et considérée comme technique de référence depuis la fin des années 1960 pour les techniques de cross-match et de recherches d'anticorps anti-HLA (136). Les antigènes HLA de classe I sont présents sur les cellules nucléées, plaquettes et surtout les lymphocytes. Les lymphocytes vivants sont incubés avec un mélange d'anticorps anti-HLA monoclonaux et de complément. Si les lymphocytes expriment l'antigène reconnu par l'anticorps spécifique, la partie F'ab de l'anticorps se lie à l'antigène pour former un complexe antigène-anticorps. Après formation de ce complexe, le complexe C1 se lie au fragment Fc de l'anticorps. Cette liaison entraîne l'activation d'une convertase et conduit à la lyse cellulaire. Dans une réaction négative, les lymphocytes restent vivants ; dans une réaction positive, les lymphocytes sont lysés.

Le typage HLA est réalisé à partir de cellules du sang périphérique prélevé sur tube ACD (Acide citrate dextran) par la technique de LCT, décrite par Van Rood et al (1975) (137) et illustrée sur la Figure 13.

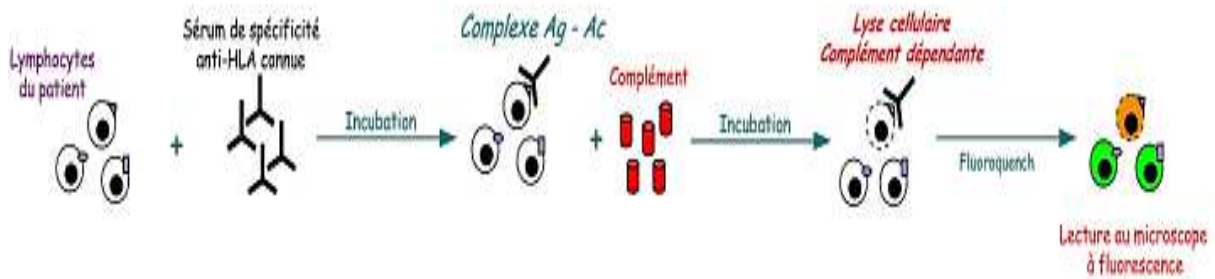


Figure 13. La technique de lymphocytotoxicité complément dépendante (LCT). Elle consiste à mettre en contact des lymphocytes de typage HLA inconnue avec des anticorps anti-HLA de spécificité connue. Une source de complément de rongeur titrée pour son efficacité cytolytique est apportée pour la lecture. Si les lymphocytes expriment l'antigène reconnu par l'anticorps spécifique, l'anticorps se lie à l'antigène pour former un complexe antigène-anticorps. Cette liaison entraîne l'activation du complément en cascade et conduit à la lyse cellulaire, mise en évidence par un colorant, le Fluoroquenck™ par microscopie à fluorescence inversée. Dans une réaction négative, les lymphocytes restent vivants ; dans une réaction positive, les lymphocytes sont lysés.

2.2.2. Protocole

Pour le typage HLA de classe I (loci HLA-A et HLA-B), les cellules utilisées sont, soit les lymphocytes totaux, soit les lymphocytes T dont les méthodes de séparation sont décrites plus haut. Pour les typages HLA de classe II (loci HLA-DR et HLA-DQ), les cellules utilisées sont les lymphocytes B.

Les cellules isolées (lymphocytes totaux, T ou B) à 2×10^6 cellules/mL sont incubées $+20^\circ\text{C}$ avec une batterie d'anticorps monoclonaux de spécificité anti-HLA connue et du complément de lapin, disposés dans les puits d'une plaque de typage (One Lambda). Chaque plaque contient un témoin positif et un témoin négatif. Après 1 heure d'incubation, la réaction est arrêtée par ajout de $2 \mu\text{l}$ d'un colorant vital qui colore les cellules vivantes en vert et celles lysées en rouge. Il s'agit du Fluoroquenck™, mélange d'acridine orange et de bromure d'éthidium. La lyse des cellules de la plaque est lue au microscope inversé à fluorescence (Zeiss, Lambda Scan™). S'il y a reconnaissance, entre l'anticorps fixé au fond du puits et l'antigène HLA situé à la surface des lymphocytes, le complexe antigène-anticorps formé active le complément de lapin, qui lyse ainsi les cellules. Le bromure d'éthidium s'intercale dans l'ADN des cellules mortes pour émettre une fluorescence

rouge ($\lambda = 595 \text{ nm}$). S'il n'existe pas de reconnaissance entre l'antigène des lymphocytes et l'anticorps fixé au fond de la plaque, le complément n'est pas activé, les lymphocytes ne sont pas lysés. Les cellules vivantes sont marquées d'une fluorescence verte par l'acridine orange ($\lambda = 530 \text{ nm}$).

La proportion des cellules vivantes et mortes est évaluée en SCORE (0, 1, 2, 4, 6, 8). La grille ci-dessous permet au lecteur de mieux estimer cette classification par rapport au pourcentage de lymphocytotoxicité observée (standard ASHI, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) (138).


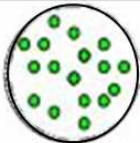
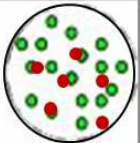
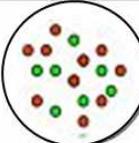
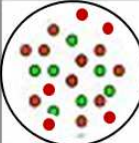
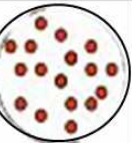
GRILLE D'ÉVALUATION DE LA MICROLYMPHOCYTOTOXICITE						
	illisible	0-10%	11-20%	21-50%	51-80%	81-100%
LYSE CELLULAIRE 						
SCORES	0	1	2	4	6	8
INTERPRÉTATION	Invalidée	Négatif	Douteux	Faiblement positif	Positif	Fortement positif

Figure 14. Grille d'évaluation de la lymphocytotoxicité, selon les recommandations de l'ASHI. La proportion des cellules vivantes (colorées en vert) et mortes (colorées en rouge) est évaluée selon un SCORE (0, 1, 2, 4, 6, 8).

Cette technique est la technique de typage historique, rapide et la moins coûteuse. En revanche, la LCT nécessite au départ une bonne viabilité cellulaire.

2.3. Technique de biologie moléculaire

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

Il existe différentes méthodes permettant la réalisation des typages HLA en biologie moléculaire. Parmi elles, la technique de PCR-Sequence Specific Primer (SSP) utilise une ou deux amorces judicieusement choisies pour n'être capables de s'hybrider qu'avec une

séquence déterminée spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèle (Figure 15A) (139). Une autre technique de PCR, appelée Sequence Specific Oligonucleotide (SSO) utilise des amorces choisies dans des séquences conservées et, encadrant les régions polymorphes. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur une membrane avant d'être hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées par un marqueur radioactif ou une enzyme (Figure 15B) (140). La dernière technique utilisée est le séquençage direct d'un fragment d'ADN amplifié par PCR (Figure 15C).

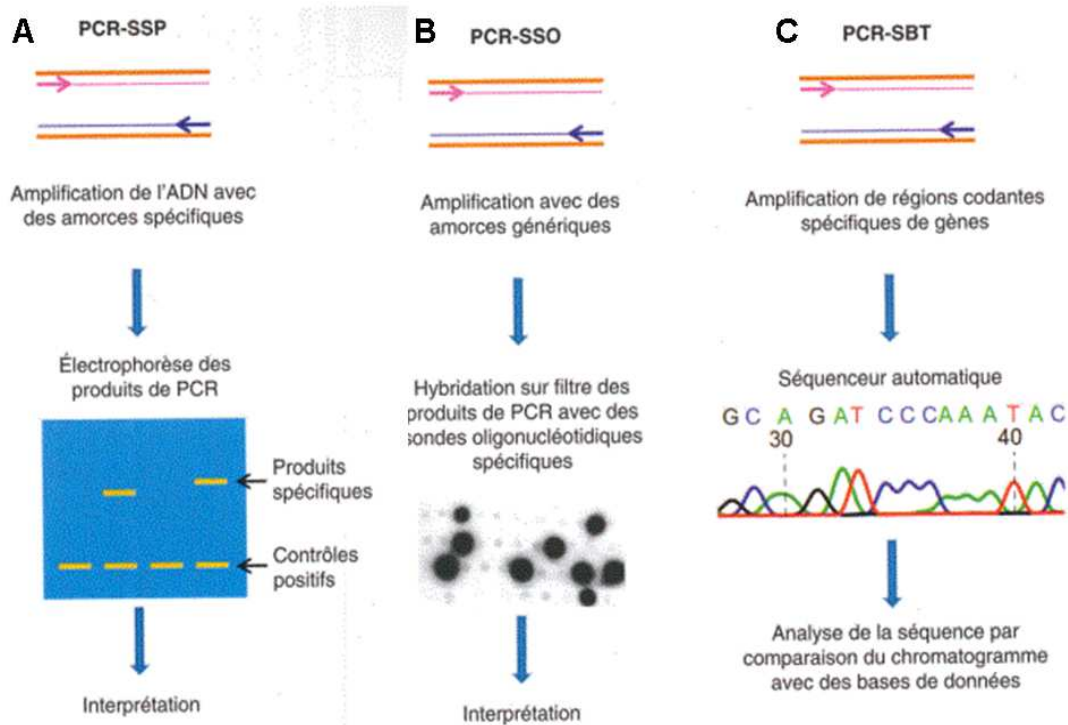


Figure 15. Comparaison des techniques de typage HLA de PCR-SSP (A), PCR-SSO (B) et PCR-SBT (C). Tiré de Méthodes en immunologie. Ed. Elsevier Masson, 2014 (141).

2.3.1. Principe du Sequencing Based Typing (SBT)

Cette technique qui porte le nom de Sequencing based Typing (SBT) nécessite l'utilisation d'un logiciel permettant de comparer la séquence d'ADN du patient aux séquences HLA consensus des banques de données (142). Le principe de cette méthode repose sur deux technologies-clé : 1) l'amplification par PCR de la séquence des deux allèles d'un locus contenant les exons 2, 3, 4 pour les allèles de classe I et 2) le séquençage automatisé direct de l'ADN amplifié par fluorescence, basé sur le principe de la méthode de Sanger.

La réaction de séquence consiste en une synthèse *in vitro* d'ADN avec une incorporation aléatoire de dideoxynucléotides à partir du fragment d'ADN amplifié qui sert de matrice.

Une seule amorce de séquençage est hybridée sur l'ADN dans un milieu réactionnel qui contient un mélange de déoxynucléotides et de didéoxynucléotides. La synthèse d'un brin unique d'ADN va être générée grâce à l'utilisation de l'AmpliTaq FS (AmpliTaq Gold®), enzyme qui possède une activité polymérasique 5'-3' et qui, comparée aux enzymes classiquement utilisées dans la réaction PCR, augmente le taux d'incorporation des dideoxyanucléotides par rapport aux deoxynucléotides. La synthèse des brins monocaténares est interrompue par l'incorporation au hasard d'un ddNTP (2' et 3'dideoxyanucléotide triphosphate) fluorescent empêchant la formation d'une liaison phosphodiester entre le 3'OH du premier nucléotide et le 5'phosphate du second. Un choix judicieux du rapport ddNTP/ dNTP permet statistiquement l'arrêt de l'élongation à chaque position du type de nucléotides (A, T, C, G). On obtient alors une multitude de fragments de tailles différentes, tous terminés par un ddNTP. La synthèse d'ADN étant complémentaire de la matrice initiale : en face d'une base va être incorporé un dNTP ou un ddNTP fluorescent. Ces fragments néosynthétisés sont ensuite précipités et séparés par électrophorèse capillaire, et détectés via un laser qui vient exciter le fluorochrome, ce qui permet d'identifier la base correspondante. Un tracé nommé électrophorégramme est obtenu après lecture des fragments générés. La technique de séquençage pour les gènes HLA de classe I (locus A) est détaillée ci-après.

2.3.2. Extraction d'ADN génomique

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

2.3.3. Amplification des gènes HLA par PCR pour la méthode de SBT

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

Les réactifs à mélanger et leur volume respectif sont détaillés dans le tableau XII.

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

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

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

Chaque PCR s'accompagne de 2 témoins : un témoin négatif (c'est-à-dire une PCR avec tous les réactifs sauf l'ADNg) et un ADN de contrôle inclus dans le kit (ADN dont le typage HLA est connu).

La plaque est ensuite insérée dans le thermocycleur (Veriti®, LifeTechnologies) et le programme d'amplification est lancé selon les indications du tableau XIII.

Tableau XIII. Le programme d'amplification de l'ADN génomique par PCR (thermocycleur Veriti®, LifeTechnologies)

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

Après une première dénaturation à 95°C durant 10 min, le programme PCR est constitué de 36 cycles identiques se décomposant comme tels : 20 sec à 96°C (dénaturation des doubles brins d'ADN), 30 sec à température d'hybridation des amorces de 60°C, 3

minutes à 72°C (température d'activation de la Taq polymérase, polymérisation de l'ADN). La réaction est stoppée par une chute de température à 4°C jusqu'à l'étape de purification des produits de PCR.

La validation de l'ADN contrôle et le témoin négatif ainsi que la taille et la spécificité des produits PCR sont contrôlées par migration électrophorétique de l'amplification sur gel d'agarose.

2.3.4. Contrôle d'amplification par migration sur gel d'agarose 1%

Le gel d'agarose 1 % (p/v) est obtenu par dissolution complète de 0,5 g d'agarose ultrapure (Invitrogen) dans 50 mL de tampon TAE 1X, puis ajout de bromure d'éthidium au 1/1000 sous la hotte. 10 µL du produit de PCR mélangé à du tampon 1X, ou 5 µL dans le cas du marqueur de poids moléculaire (Euromedex®), est déposé dans un puits du gel. La migration électrophorétique dure 30 min sous une tension de 100V. La vérification de la migration et de l'amplification des produits de PCR se fait sous UV à l'aide la caméra Quantum ST4 et à l'aide du logiciel Image Camtup-Capt (Vilber Lourmat).

2.3.5. Purification des produits d'amplifications

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

Tableau XIV. Le programme de purification des produits de PCR (thermocycleur Veriti, LifeTechnologies)

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

2.3.6. Réaction de séquençage

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

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

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

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

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

Tableau XVI. Les amorces de séquences AlleleSEQR® HLA-A pour l'amplification et le séquençage du locus HLA-A

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

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

La plaque est ensuite insérée dans le thermocycleur et le programme de séquençage est lancé selon les indications du tableau XVIII.

Tableau XVII. Le programme d'amplification pour le séquençage (thermocycleur Veriti®, LifeTechnologies)

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

2.3.7. Purification des réactions de séquence obtenues

La purification se fait par précipitation à l'éthanol. Un volume de 2 µL d'acetate de sodium (NaOAc) à 1,5M et d'EDTA à 250 mM est ajouté à chaque puits. Après une brève centrifugation, 25 µl d'éthanol pur est distribué dans chaque puits puis la plaque est vortexée vigoureusement. La plaque de 96 puits est ensuite centrifugée à 2000 x g pendant 30 min puis le surnageant est retiré en retournant la plaque sur du papier absorbant. Finalement, 50 µl d'éthanol à 80% est ajouté et la plaque est à nouveau centrifugée à 2000 x g pendant 5 min.

2.3.8. Séparation des séquences par électrophorèse capillaire

A la fin de l'étape de purification, les réactions de séquences peuvent être conservées en culot sec à - 20°C. Après ajout de 15 µl de formamide HiDi, les produits de séquençage sont séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire et identifiés par lecture laser sur le séquenceur (Applied Biosystem Prism 3730 DNA analyser), détectable via un laser qui vient exciter le fluorochrome, ce qui permet d'identifier la base correspondante. Le résultat est présenté sous forme d'électrophorégramme, avec la fluorescence des pics et interprétée en terme de nucléotides (Figure 16).

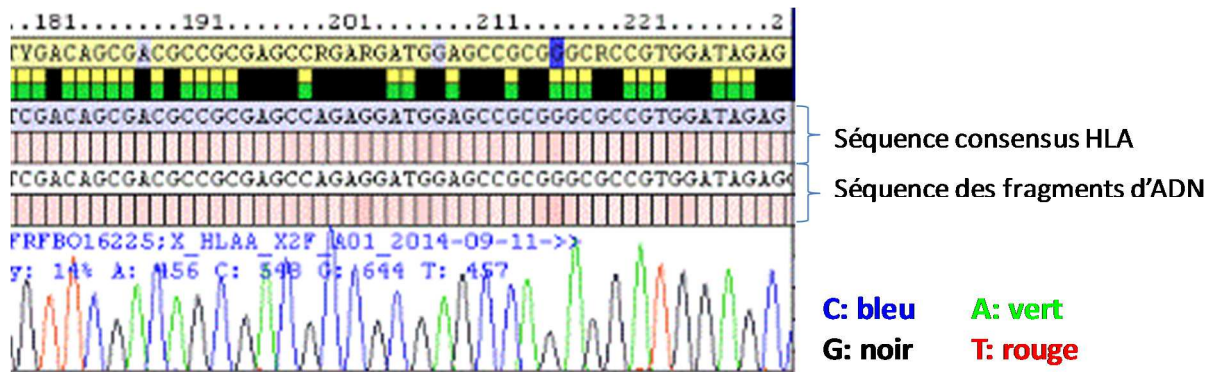


Figure 16. Exemple du résultat de la séquence obtenue par le séquenceur 3730 ABI® Prism (Applied Biosystem). Chaque pic correspond à une espèce moléculaire différant de la précédente par un nucléotide. ; chaque nucléotide est identifié par une couleur par base.

3. Dépistage et Recherche d'anticorps anti-HLA

3.1. Choix des échantillons de sérum pour l'essai

3.1.1. Sélection des sérums ne présentant pas d'anticorps anti-HLA

Il est constitué d'un pool de sérums de donneurs ne présentant pas d'anticorps anti-HLA. Plusieurs volontaires sains sont contactés spécifiquement au site de collecte de l'EFS de Grenoble. Les donneurs sélectionnés sont des hommes de groupe sanguin AB, pour s'assurer de l'absence d'anticorps circulants, sans antécédent transfusionnel. Le prélèvement effectué pour chacun d'entre eux constitue un volume de 80 ml en absence d'anticoagulant, ainsi que deux tubes qui suivent le cursus classique du don de sang (vérification du groupe sanguin, bilan sérologique etc.). Pour chaque don, sont réalisés un test de dépistage d'anticorps anti-HLA par la technique Luminex™ et la recherche d'anticorps anti-HLA est réalisée par la technique de lymphocytotoxicité complément-dépendante (LCT). Ne sont intégrés dans le pool que les sérums négatifs en anticorps anti-HLA dans les deux techniques.

3.1.2. Sélection des sérums présentant des anticorps anti-HLA

L'anticorps anti-HLA-A2 dans le sérum a été choisi pour l'investigation, du fait de la fréquence d'expression de l'haplotype HLA-A2 dans la population caucasienne (143,144) (> 40 %). De ce fait, l'immunisation vis-à-vis des antigènes HLA-A2 est la plus importante. En outre, les sérums sélectionnés présentent exclusivement les anticorps anti-HLA-A2 afin d'étudier la responsabilité spécifique de ces anticorps. Les sérums proviennent de patients du service de néphrologie du CHU de Grenoble ayant subi une ou plusieurs greffes rénales et de donneurs, volontaires sains. Ils sont sélectionnés après

dépistage positif d'anticorps anti-HLA de classe I (et négatif en classe II), puis après identification des anticorps anti-HLA A2 en LCT.

Au préalable, les donneurs volontaires ont tous donné leur accord écrit en signant un consentement de don pour la recherche.

3.2. Lymphocytotoxicité-complément dépendante : technique de référence

De même que pour le typage HLA, la lymphocytotoxicité complément dépendante est une technique permettant la recherche d'anticorps anti-HLA. A l'inverse, cette méthode consiste à mettre en contact des cellules mononucléées de typage HLA connu avec des anticorps anti-HLA de spécificité inconnue que l'on souhaite identifier (136).

Pour la recherche d'anticorps anti-HLA de classe I, les sérums à tester sont incubés avec un panel de lymphocytes T totaux de spécificités HLA connues. Tout comme pour le typage HLA par LCT, le complément de lapin est ajouté et la réaction est arrêtée par l'ajout du fluoroquencher. Si le sérum à tester possède un anticorps spécifique de la cellule, le complément se fixe à la fraction Fc de l'anticorps et par la réaction antigène-anticorps, la cellule est lysée.

Cette technique, peu sensible, met en évidence des immunoglobulines fixant le complément des isotypes : IgG1, IgG3, et IgM. Progressivement, il est devenu nécessaire de sensibiliser la technique face à son incapacité à détecter tous les anticorps cliniquement importants. Les techniques dites sensibles sont apparues dès le début des années 1990: cytométrie en flux, puis enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) et maintenant Luminex™, apportant une sensibilité et une spécificité très largement supérieures à celles de la LCT.

3.3. Technique Luminex

Principe

Le dépistage ou l'identification des anticorps anti-HLA au Luminex™ est la technique la plus sensible (145). Elle est fondée sur le principe de la cytométrie de flux permettant l'étude de multiples réactions dans un seul micro-puits. Il s'agit d'un système multi-analytique constitué d'un ensemble de microsphères ou « billes » recouvertes par des antigènes HLA et d'un cytomètre en flux à deux lasers : l'un pour identifier spécifiquement chaque bille en suspension et l'autre pour quantifier l'anticorps secondaire fixé sur les éventuels anticorps (Figure 17). La méthode de dépistage ou d'identification des anticorps

anti-HLA, ne diffère que par le type de billes utilisées (Lifecodes part of Immucor) : pour le dépistage, chaque type de microsphères est recouvert d'antigènes HLA différents. Pour l'identification, chaque type de microsphère est recouvert que par un seul antigène connu.

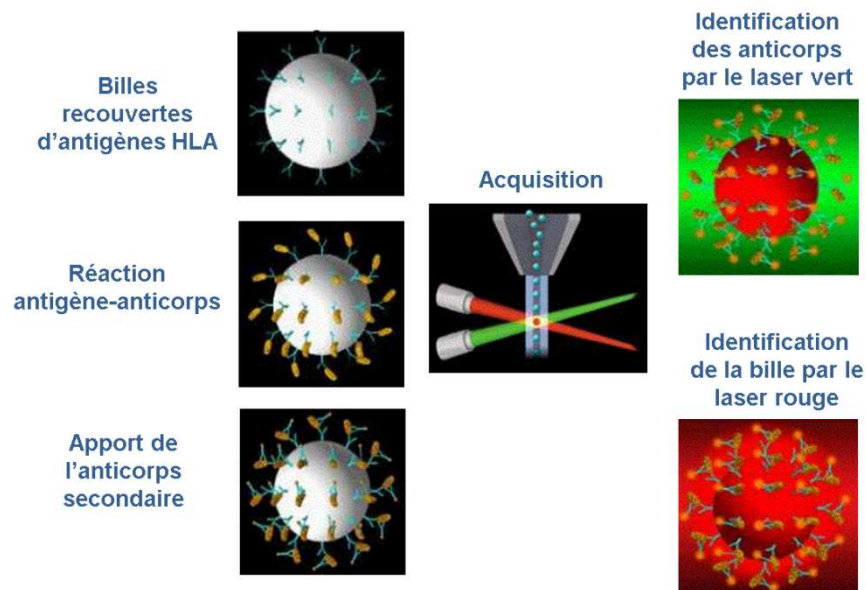


Figure 17. Le dépistage ou la recherche d'anticorps anti-HLA par la technologie Luminex™. C'est un système multi-analytique constitué d'un ensemble de billes et d'un cytomètre en flux qui lit deux fluorescences : l'une pour identifier spécifiquement chaque bille en suspension recouvertes d'antigènes HLA (rouge) et l'autre pour quantifier l'anticorps secondaire fixé sur les anticorps à examiner (vert). D'après la source : <http://www.luminexcorp.com>, consultée le 10/09/2014

Dépistage des anticorps anti-HLA

Le dépistage se développe à l'aide d'une plaque de 96 puits où chaque puits correspond à un sérum à tester. Il est toujours réalisé en présence d'un témoin négatif et deux témoins positifs. Un volume de 12,5 µL du sérum à tester est incubé avec 5µL d'un mélange des billes recouvertes d'antigènes HLA et 40 µL d'un tampon de lavage pendant 30 minutes sous agitation à température ambiante (à l'abri de la lumière). Les puits sont lavés avec du tampon de lavage et une dilution d'anticorps anti-IgG humaine conjugué à la phycoérythrine est ajoutée. Après une incubation (30 minutes) et plusieurs lavages, la plaque est analysée par le cytomètre en flux à deux lasers : le laser rouge (633 nm) excite les fluorochromes incorporés dans les billes induisant l'émission de fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (712 nm) pour identifier la bille. Le laser vert excite la phycoérythrine (532 nm) pour la détection d'anticorps anti-HLA fixés sur la bille spécifique. Les valeurs mesurées sont rapportés en « mean fluorescence intensity » (MFI). L'interprétation des résultats est réalisé avec le logiciel « Match-it® » (Lifecodes part of Immucor).

La Figure 18 illustre les résultats d'un dépistage du témoin négatif (Figure 18A) et du témoin positif (Figure 18B). L'interprétation de ces résultats nécessite d'analyser plusieurs facteurs : d'une part, 7 et 5 types de billes différentes recouvertes respectivement d'antigènes HLA de classe I et de classe II sont détectées par l'émission de fluorescence en cytométrie en flux s'il existe une fixation entre l'antigène et l'anticorps spécifique. Il y a présence d'anticorps si les valeurs de fluorescence estimée en MFI ou Raw sur la Figure sont supérieures à 500. Pour chaque bille donnée, 3 valeurs (Adj val1, Adj val2, Adj val3) sont calculées par le logiciel Match-It avec des résultats chiffrés supérieurs ou inférieurs à 0. Le nombre de valeurs supérieures à 0 pour chaque bille est ensuite compté en score (exemple : 0 si les valeurs Adj Val sont négatives ou 3 s'il les 3 valeurs Adj Val sont positives). Pour qu'un échantillon soit positif, il faut au minimum que l'une des trois Adj Val 1,2 ou 3 soit supérieure à 0.

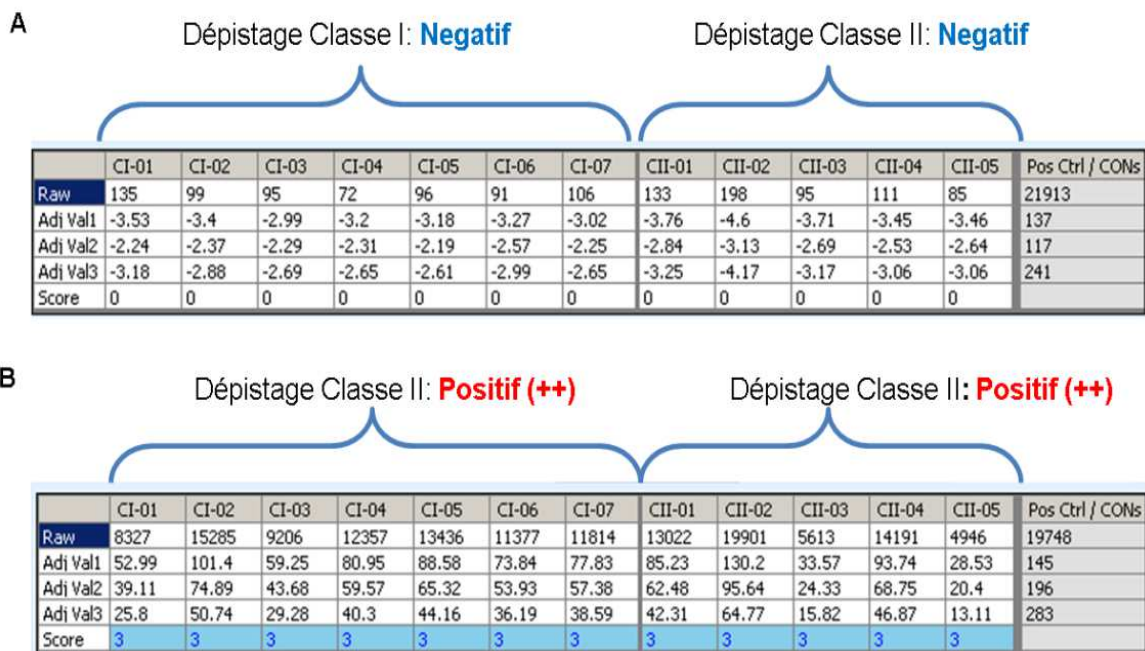


Figure 18. Exemple d'un résultat de dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™. Le sérum est incubé avec des billes recouvertes par des cellules de spécificité HLA connue. Après ajout d'un anticorps anti-IgG marqué, le cytomètre en flux assure la lecture de 2 fluorescences: l'une détecte spécifiquement la bille et l'autre l'anticorps marqué sur l'anticorps anti-HLA à examiner. Un signal au-dessus du seuil de détection (déterminé par les paramètres suivants : Intensité de fluorescence ou Raw > 500, score > 1) indique la présence des anticorps anti-HLA spécifiques de la bille. La Figure 18 reflète le résultat du témoin négatif (A) ou du témoin positif (B) en classe I et II d'une série de dépistage.

4. Analyse des protéines

4.1. Purification des Immunoglobulines G à partir de sérum

4.1.1. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité sur colonne permet de séparer les constituants d'un mélange selon leur capacité à se lier à un ligand spécifique fixé sur une résine.

Les immunoglobulines G du sérum sont purifiées sur une colonne de protéine A Sepharose. Son utilisation comme ligand permet la purification des IgG puisqu'elle se fixe avec grande affinité aux fractions Fc des IgG1 et IgG2. La colonne est équilibrée avec 10 volumes de tampon Tris-HCl (100 mM, pH8) puis 1 volume de sérum, dilué au préalable avec le tampon d'équilibre y est déposé. Les protéines non fixées sur la colonne sont éluées avec du tampon 100mM Tris. Les IgG fixées sont éluées en présence de tampon glycine 100 mM pH3 en fractionnement de 1 ml et le pH des fractions est neutralisé par ajout de 50 µl de 500 mM Tris-HCl pH8. L'éluion des protéines est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm au spectrophotomètre (*Beckman DU® 640*).

4.1.2. Dessalage

L'utilisation de colonne de dessalage permet d'éliminer les sels et les molécules de bas poids moléculaire. Les fractions les plus concentrées en protéines sont rassemblées. Le tampon glycine est alors échangé contre le tampon PBS sur une colonne de dessalage (D-Salt™ Dextran Plastic, Pierce). La colonne est équilibrée par 10 volumes de PBS 1X puis les IgG (3 ml) sont déposées. Les IgG sont ensuite éluées avec le tampon PBS en fractionnement de 1 mL. L'éluion est suivie par la mesure de l'absorbance des protéines à 280 nm dont le procédé est explicité plus loin.

4.1.3. Dialyse sur membrane poreuse

La dialyse est un procédé simple au cours duquel de petits solutés passent d'une solution plus concentrée vers une solution moins concentrée à travers une membrane semi-perméable jusqu'à ce que l'équilibre soit établi. Puisque la membrane poreuse permet aux plus petits solutés de passer de façon sélective en retenant les plus gros éléments, la dialyse est utilisée comme procédé de séparation basé sur la taille des molécules.

La solution concentrée en IgG est dialysée contre 4 x 2L de tampon PBS à +4°C. Le bain de dialyse est soumis à agitation et le tampon PBS est changé toutes les 2 heures puis toutes les 4 heures.

4.2. Dosage des protéines

4.2.1. Mesure de l'absorbance à 280nm

Cette méthode est basée sur l'absorbance à 280 nm des groupements aromatiques des acides aminés tels que la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. Cette méthode de mesure est essentiellement utilisée pour suivre les protéines en sortie de chromatographie, en mesurant la densité optique des fractions à 280nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DU® 640)

4.2.2. Méthode de Bradford

Cette méthode permet le dosage de faibles quantités de protéines de l'ordre du μg , dans des milieux de concentration saline élevée. Elle utilise les propriétés de changement de coloration du bleu de Coomassie (G250), qui en présence de protéines forme un complexe avec les groupements amines libres (146). Il change alors de couleur en passant du rouge (absorption à 465nm) à la couleur bleue absorbant à 595 nm. La concentration en protéine est proportionnelle à l'augmentation de l'absorbance à 595 nm et elle est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations croissantes de BSA (Bovine Serum Albumin).

Les échantillons et la gamme d'étalonnage (0 à 40 μg) sont ajoutés à 2 ml de réactif de Bradford (BioRad protein Assay). Le réactif de Bradford permet un dosage rapide et simple. Chaque dosage est réalisé en triplicat. La coloration est stable entre 5 et 30 min. Dans cet intervalle, l'absorbance à 595 nm est mesurée et comparée à celle de la gamme d'étalonnage.

4.3. Electrophorèse en milieu dénaturant (SDS- PAGE)

La méthode de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (147) sépare les protéines en fonction de leur masse moléculaire au travers d'un gel de polyacrylamide. A un pH donné, les protéines expriment une charge négative ou positive selon leur point isoélectrique. Cette propriété leur permet de migrer au sein d'un champ électrique. Les protéines sont soumises au traitement par β -mercapto-éthanol qui rompt les ponts disulfures et par SDS qui dénature et homogénéise la charge des protéines leur conférant une charge négative. Ainsi, toutes les protéines traitées migrent vers l'anode sous un champ électrique et pourront être séparées seulement en fonction de leur masse moléculaire au travers d'un gel de polyacrylamide. Pour repérer la taille des différentes protéines de l'échantillon sur la mobilité relative, un marqueur de poids moléculaire est soumis à la migration dans les mêmes conditions. Le

pourcentage en acrylamide du gel utilisé est de 10%. Le choix de la concentration de l'acrylamide se fait selon la taille de la protéine d'intérêt. Plus le maillage est serré (haut pourcentage), plus les protéines migrent lentement, assurant la séparation des espèces de petite masse moléculaire.

4.3.1. Préparation du gel

Les quantités indiquées dans le tableau XVIII correspondent à la préparation de 2 mini-gels (9 cm x 6,5 cm, 1,5 mm d'épaisseur)

Tableau XVIII. La préparation du gel en SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Gel de séparation (10%)		Volume (mL)
H2O		5,8
Tris-HCl 1,5M, pH 8,9		3
Acrylamide/bis-acrylamide (p/v)	40%	3
SDS 10% (p/v)		0,120
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)		0,075
TEMED		0,0125
Gel de concentration (4%)		Volume (mL)
H2O		6,36
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8		2,5
Acrylamide/bis-acrylamide (p/v)	40%	0,94
SDS 10% (p/v)		0,1
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)		0,070
TEMED		0,010

4.3.2. Préparation des échantillons

Les protéines sont dénaturées extemporanément par l'addition d'un tampon de dépôt (SDS 2% (p/v), Tris-HCl 630 mM, bleu de bromophénol 0,004%, saccharose 1% (p/v), EDTA 0,1 mM) et 2,5% (p/v) de β -mercapto-ethanol. Les échantillons sont dénaturés à 60°C pendant 30min.

4.3.3. Migration par électrophorèse des échantillons

La migration des protéines se développe dans un tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,8, glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v)) dans un champ électrique de tension 65 V pour le gel de concentration (25 mA) puis de 100 V pour le gel de séparation. L'électrophorèse est arrêtée quand le front de migration, repéré grâce au bleu de bromophénol, se situe près du bas du gel.

4.3.4. Révélation des protéines sur gel de polyacrylamide

Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. Le gel est incubé dans une solution de bleu de Coomassie 0,25% (p/v), méthanol 50% (v/v), acide acétique 10% (v/v) pendant au minimum 30 min sous agitation. L'excès de coloration est éliminé avec des lavages successifs dans une solution de décoloration (éthanol 26% (v/v), acide acétique 7% (v/v)). Les bandes bleues présentes sur le gel correspondent aux protéines contenues dans l'échantillon.

5. Mesure de l'activité NADPH oxydase

5.1. Principe

La technique de chimiluminescence permet la mesure de la production totale de dérivés réactifs de l'oxygène grâce à la lumière émise par une réaction de chimiluminescence. Elle est particulièrement sensible et permet de mesurer l'activité NADPH oxydase des cellules entières (148). Cette technique repose sur le principe de dissipation de l'énergie par émission de lumière par un composé allant d'un état excité vers son état initial. La réaction de chimiluminescence appliquée repose sur une réaction d'oxydation du luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) dépendante de la peroxydase HRPO (horseradish peroxidase) et du peroxyde d'hydrogène (Figure 19). Le retour du luminol excité vers son état fondamental s'accompagne d'une émission de lumière quantifiée par un luminomètre (Luminoscan Labssystem). L'émission de lumière est directement proportionnelle à l'activité NADPH oxydase des cellules ; elle mesure l'ensemble des espèces réactives de l'oxygène comprenant l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène (149).

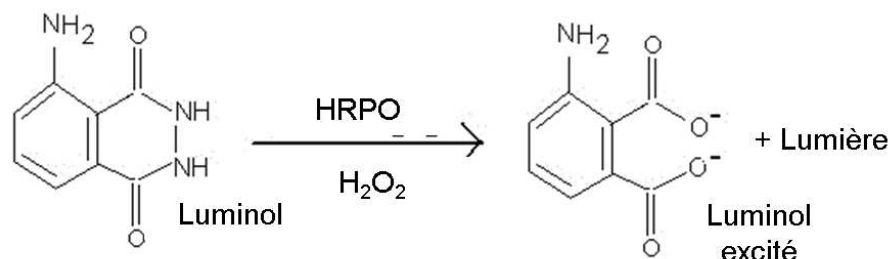


Figure 19. Le principe de réaction par chimiluminescence

5.2 . Protocole

Priming des neutrophiles : dans certaines conditions, les neutrophiles sont soumis à l'incubation à 37°C en présence d'agents « primants » tels que l'endotoxine bactérienne, ou lipopolysaccharide (LPS) aux concentrations de 100ng/ml ou de 15ng/ml pendant 60 min ou un tripeptide chimique, le formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) à 50nM ou 10nM pendant 15 min.

L'activité oxydase des cellules est mesurée en plaque 96 puits à raison de 2×10^5 cellules par puits, reprises dans 50 μ l de PBS. Le milieu réactionnel est composé de PBS contenant 0,9 mM de CaCl₂, 0,5 mM de MgCl₂, 20 mM de glucose, 20 μ M de luminol et 10 U/ml de HRPO (150). Les cellules sont incubées dans le luminomètre pendant une minute à 37°C avec 200 μ l de milieu réactionnel, puis l'activité oxydase est stimulée par l'ajout de divers agonistes : PMA 80 ng/ml, fMLP 1 μ M, Immunoglobulines G purifiés à partir de sérum humain (0 à 200 μ g/ml).

La spécificité de production de dérivés oxygénés par la NADPH oxydase peut être vérifiée en ajoutant 5 μ M de diphenyl iodonium (DPI) lors cette incubation. L'émission relative de lumière est enregistrée à 37°C pendant 60 min ou 90 min avec une mesure toutes les 30 secondes. Les mesures sont exprimées en unités relatives de luminescence (RLU= Relative Luminescence Unit).

6. Cytométrie en flux

6.1. Principe

La technique de cytométrie en flux permet le dénombrement d'événements et l'analyse multiparamétrique de déterminants de surface d'une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites, billes...) (151). L'analyse des cellules fournit des résultats sur la distribution d'une population cellulaire sur des paramètres étudiés e.g. la taille, la granularité, la fluorescence produite par des anticorps conjugués à un fluorochrome ou celle directement produite par des composés fluorescents. La fluorescence émise est mesurée grâce à des détecteurs spécifiques d'une gamme de longueur d'onde (FACSCanto II, BD Sciences).

6.2. Protocole

Stimulation préalable des neutrophiles : dans certaines conditions, les neutrophiles fraîchement isolés sont soumis à l'incubation à 37°C de fMLP à 50 nM (concentration pré-activatrice) pendant 15 min ou à 1 µM (concentration activatrice) pendant 3 minutes.

Les neutrophiles purifiés sont ajustés à 5x10⁶cellules/ml dans du tampon PBS supplémenté avec 0,2 % (p/v) de BSA. Le marquage est réalisé pour une prise d'essai de 100 µl, soit 5x10⁵ cellules.

Marquage primaire.

Evaluation de l'expression de l'antigène HLA A2. 5x10⁵ cellules sont incubées 30 min dans la glace avec 0,5 µg de l'anticorps primaire monoclonal HLA-A2 (clone BB7.2) spécifique d'un épitope du domaine α2 de la molécule HLA classe I.

Evaluation de l'expression des récepteurs Fc (CD16, CD32, CD64) à la surface des neutrophiles. Les 5x10⁵ cellules sont incubées 30 min dans la glace avec 0,5 µg d'anticorps primaire monoclonal CD16 (clone 3G8, Santa Cruz), CD32 (clone AT10, Santa Cruz) ou CD64 (clone 10.1, Santa Cruz).

Un tube témoin sert de contrôle isotypique pour évaluer les interactions non spécifiques de l'anticorps primaire et ainsi d'établir un seuil de marquage. Après une centrifugation rapide de 10 sec à 10 000 x g, les cellules sont lavées à 2 reprises dans le tampon PBS / BSA 0,2 %.

Marquage secondaire.

L'anticorps primaire est révélé grâce à un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa fluor 488 (Alexa Fluor® 488, Invitrogen). Pour cela, le culot de cellules est remis en suspension dans 150 µl d'une dilution au 1/1000e de l'anticorps secondaire en PBS / BSA 0,2 % et incubé 30 min dans la glace à l'obscurité. Les cellules sont lavées deux fois au PBS / BSA 0,2% et remises en suspension dans 500 µl de PBS / BSA 0,2 %.

Après marquage, les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes dédiés au cytomètre. L'analyse est réalisée au cytomètre en flux avec acquisition de 10000 évènements pour chaque marquage. Les logiciels Diva® et FlowJo® ont été utilisés pour le traitement des données.

7. Méthodes statistiques

Les résultats exprimés sous forme de moyenne sont indiqués avec la déviation standard (SD). Les différences statistiquement significatives ont été identifiées en utilisant le test de Student, p < 0,05 étant considéré comme significatif.

RESULTATS

PARTIE 1 : LES OUTILS DE TRAVAIL

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

1.1. Dépistage et recherche d'anticorps anti-HLA

Par la technique Luminex, les sérums ne possédant pas d'anticorps anti-HLA et ceux possédant des anticorps ont été sélectionnés..

La Figure 20 illustre les résultats de dépistages négatif (Figure 20A) et positif (Figure 20B) en classe I. L'interprétation de ces résultats nécessite d'analyser plusieurs facteurs qui sont détaillés dans la partie Matériel et Méthodes.

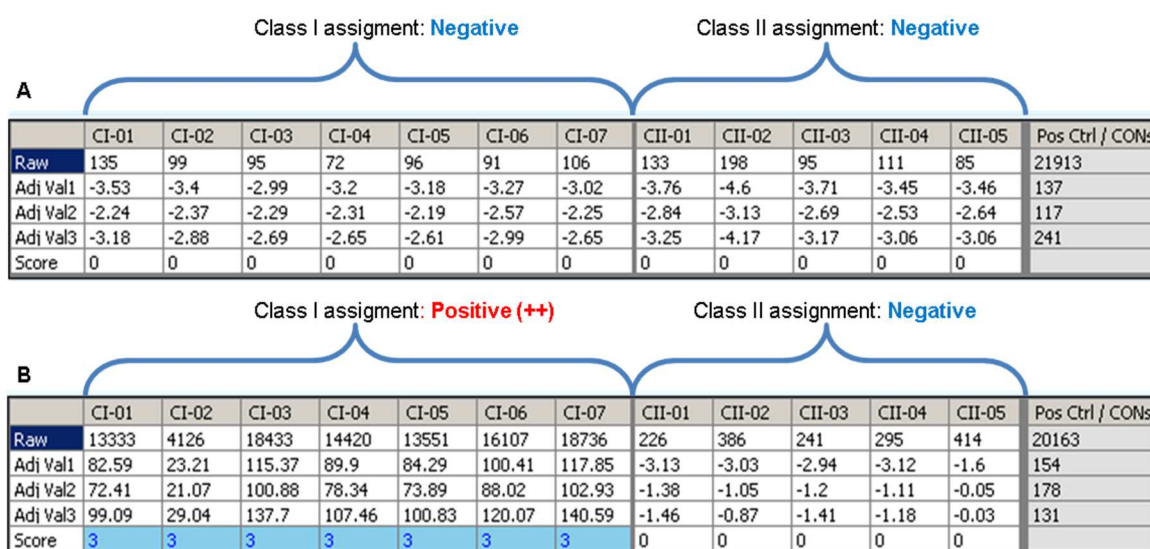


Figure 20. Le dépistage des anticorps anti-HLA par la technique Luminex™. Le sérum est incubé avec des billes recouvertes par des cellules de spécificité HLA connue. Après ajout d'un anticorps anti-IgG marqué, le cytomètre en flux permet la lecture de 2 fluorescences: l'une détecte spécifiquement la bille et l'autre permet de quantifier la fixation de l'anticorps marqué sur l'anticorps anti-HLA susceptible d'être présent. Un signal au-dessus du seuil de détection (déterminé par les paramètres suivants : Intensité de fluorescence ou Raw > 500, score > 1) indique la présence des anticorps anti-HLA spécifique de la bille. La Figure 20 reflète le résultat d'un dépistage négatif en classe I et II (**A**) ou positif en classe I (**B**).

La Figure 20A montre une fluorescence MFI pour chaque bille inférieure à 500 ainsi qu'un SCORE égal à 0 ce qui valide un dépistage négatif en classe I et classe II: le sérum ne présente donc pas d'anticorps anti-HLA. Sur la Figure 20B, les fluorescences MFI de toutes les billes de classe I sont supérieures à 500 et le SCORE pour chaque bille est égal à 3 ; en revanche les fluorescences des billes de classe II sont inférieures à 500 avec un score égal à 0 ; le dépistage est positif en classe I et négatif en classe II; le sérum étudié présente exclusivement des anticorps anti-HLA de classe I.

Dans un second temps, l'absence ou la présence d'anticorps anti-HLA est confirmée par une recherche d'anticorps par LCT. Les sérums retenus sont les suivants :

- **Les sérums ne lysant aucune cellule** et pour lesquels le dépistage en technique Luminex® était négatif. Après incubation avec le complément, la réaction entre le sérum et chacune des cellules de spécificité HLA connue est évaluée par un SCORE de 1 (Tableau XIX). Il n'y a pas de lyse cellulaire car le sérum ne contient pas d'anticorps anti-HLA cytotoxiques.

Tableau XIX. La recherche d'anticorps anti-HLA par Lymphocytotoxicité.

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

36 cellules de spécificité HLA connue sont mises en présence du sérum à tester. Après ajout du complément de lapin ainsi que d'un colorant, le Fluoroquenck®, la proportion des cellules mortes (lysées) et vivantes (non lysées) est évaluée en SCORE (0 à 8) par microscopie à fluorescence inversée.

L'obtention d'un « pool » de sérums ne possédant pas d'anticorps anti-HLA est effectuée et est appelé, par souci de simplicité, les **sérums non HLA A2**.

➤ **Les sérums capables de lyser toutes les cellules ayant un antigène HLA-A2 mais pas les autres cellules** pour lesquels le dépistage était positif en classe I. La réaction entre le sérum et toutes les cellules du panel de spécificité HLA-A2 est interprétée avec un SCORE de 8 ce qui permet d'affirmer l'existence d'une lyse cellulaire sur toutes les cellules possédant l'haplotype HLA-A2 (Tableau XX). En revanche, il n'y a pas de lyse cellulaire entre le sérum étudié et les autres cellules du panel (SCORE égal à 1) car il n'y a pas de fixation spécifique antigène-anticorps.

Tableau XX. La recherche d'anticorps anti-HLA par Lymphocytotoxicité.

Dénomination des cellules du panel	Evaluation de la réaction (SCORE)	Spécificité antigénique du panel		
		HLA-A	HLA-B	HLA-C
PA0007	8	A2	B39 B51 B16 B5	
PA0008	8	A2 A31 A19	B39 B47 B16	
PA0024	8	A2 A11	B49 B35 B21	
PA0033	8	A2 A23 A9	B37 B72 B15	CW*0602
PA0042	8	A1 A2	B52 B58 B17 B5	
PA0063	8	A1 A2	B44 B63 B15 B12	CW*0501 CW*0701
PA0064	8	A2 A33 A19	B18 B44 B12	CW*0501 CW*0701
PA0067	8	A2	B39 B42 B16	CW*1203 CW*1701
PA0069	8	A2	B7 B58 B17	CW7 CW7
TA0081	8	A2 A68 A28	B49 B53 B21 B5	CW4 CW7
TA0165	8	A2 A34 A10	B8 B18	CW*1203
PA0001	1	A1 A68 A28	B13 B41	CW6 CW*1701
PA0002	1	A1 A30	B18 B51	
PA0003	1	A24 A11 A9	B35 B38 B16	
PA0011	1	A1 A11	B57 B55 B17 B22	CW3
PA0015	1	A32 A34 A19 A10	B7 B62 B15	CW*0303
PA0017	1	A1 A31 A19	B8 B67	
PA0019	1	A1 A3	B13 B37	CW*0602
PA0028	1	A24 A31 A9 A19	B60 B62 B15 B40	CW3
PA0029	1	A23 A32 A9 A19	B27 B49 B21	CW2 CW7
PA0030	1	A1 A24 A9	B65 B27 B14	CW2 CW8
PA0035	1	A3 A26 A10	B35 B45 B12	
PA0039	1	A3 A24 A9	B56 B27 B22	CW*0102 CW*0202
PA0043	1	A24 A25 A10 A9	B39 B56 B16 B22	
PA0045	1	A23 A31	B50 B51	
PA0048	1	A68 A32 A19 A28	B55 B61 B40 B22	CW*0202
PA0050	1	A32 A66 A10 A19	B38 B41 B16	
PA0051	1	A30 A32 A19	B7 B13	
PA0054	1	A25 A68 A28 A10	B18 B37	
PA0055	1	A26 A31 A10 A19	B7 B64 B14	CW7 CW8
PA0060	1	A3 A80	B35 B58 B17	
PA0062	1	A24 A29 A9	B57 B63 B17 B15	CW7 CW6
PA0066	1	A23 A68 A9	B44 B60 B40 B12	CW3 CW4
PA0068	1	A11 A26 A10	B27	CW*0102
PA0070	1	A1 A33 A19	B35 B58 B17	CW3 CW4
PA0071	1	A25 A10	B18 B57 B17	CW6 CW*1203
PA0072	1	A29 A33 A19	B44 B37 B12	CW6 CW*1601
PA0073	1	A68 A68 A28	B53 B58 B17 B5	CW4 CW7
PA0074	1	A3 A24	B64 B35	CW4 CW8
PA0075	1	A3 A32	B8 B44	CW7 CW*1601
TA0114	1	A1 A29	B13 B35	CW4 CW6
TA0204	1	A24 A68 A9 A28	D7 D8	
TA0211	1	A3 A3	B44 B70 B15 B12	
TA0219	1	A1 A11	B35 B73	CW4

44 cellules de spécificité HLA connue sont mises en présence du sérum à tester. Après ajout du complément de lapin ainsi que d'un colorant, Fluoroquenck®, la proportion des cellules mortes (lysées) et vivantes (non lysées) est évaluée en SCORE (allant de 0 à 8) par microscope à fluorescence inversée.

Le sérum contient donc exclusivement les anticorps anti-HLA-A2 cytotoxiques et sera appelé **sérum HLA A2** (par principe d'éthique, ce sérum provient d'un donneur volontaire sain).

1.2. Préparation des immunoglobulines G

Une fois les sérums sélectionnés, les IgG sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de protéine A Sepharose. Le pic d'absorption représenté sur la Figure 21A montre la présence des IgG. L'éluion à pH acide de ces protéines est suivie par l'absorbance à 280 nm.

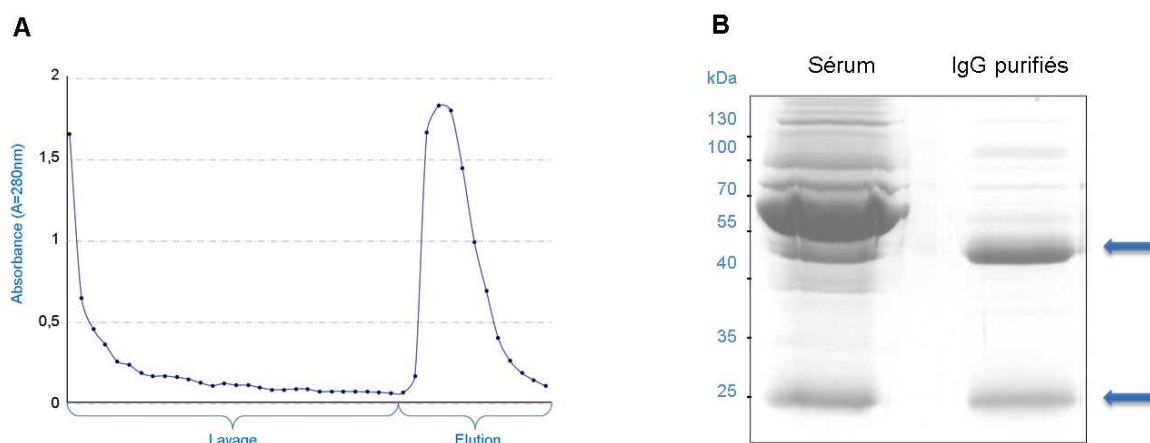


Figure 21. L'étape de purification des Immunoglobulines G. (A) Les IgG sont purifiées sur colonne d'affinité par protéine A. Le sérum y est déposé sur la colonne puis la protéine A fixe avec grande affinité les Immunoglobulines G du sérum humain. Les protéines non fixées sont éliminées par un tampon d'équilibre. Les IgG fixées sont éluées à pH acide (pH=3) en fraction de 1 ml. **(B)** Les protéines (15 µg / dépôt) du sérum et de la fraction d'IgG purifiées (IgG) sont séparées par SDS-PAGE et colorées au Bleu de Coomassie. Les flèches indiquent la présence de bandes à 55kDa et 25 kDa.

Après dépôt des IgG purifiées sur une colonne de dessalage afin d'éliminer les sels et les molécules de bas poids moléculaire, leur purification est évaluée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en conditions réductrices après coloration au Bleu de Coomassie (Figure 21B). Les fractions purifiées montrent la présence majoritaire de bandes à 55kDa et 25 kDa, respectivement pour la chaîne lourde et à la chaîne légère des IgG.

Le purification finale des IgG est suivie en mesurant la quantité de protéines totales par la méthode de Bradford.

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

Tableau XXI. Récapitulatif des étapes de sélection des sérums

Sérum	Dépistage	Recherche d'anticorps anti-HLA	Dénomination des sérums	Dénomination après purification des IgG
Volontaires sains sans évènement immunisant	Négatif	Absence d'anticorps anti-HLA	Pool de sérums non anti-HLA-A2	IgG non anti-HLA-A2= IgG non HLA A2
Volontaires sains avec évènement immunisant	Positif	Présence d'anticorps anti-HLA-A2	Sérum anti-HLA-A2	IgG anti-HLA-A2= IgG HLA A2

2. Identification des antigènes HLA : phénotypage HLA

Le typage HLA est réalisé, entre autres, chez des donateurs volontaires sains à l'occasion de leur inscription dans le registre du don de moelle osseuse. Il a été effectué au laboratoire HLA par séquençage à partir d'ADN génomique.

L'ADN génomique est extrait pour chacun des individus à typer et les exons 2, 3 et 4 des gènes HLA sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. La taille des fragments amplifiés a été contrôlée par migration sur gel d'agarose 1 % (Figure 22). Un fragment à 2000 pb est détecté. A noter que les amorces utilisées proviennent d'un kit commercial (ALLESEQR®), aussi les séquences des amorces utilisées pour chaque exon ne sont pas indiquées et la taille exacte du fragment amplifié n'est donc pas connue précisément. Le contrôle positif (ADN de contrôle) révèle la présence d'un fragment de même taille.

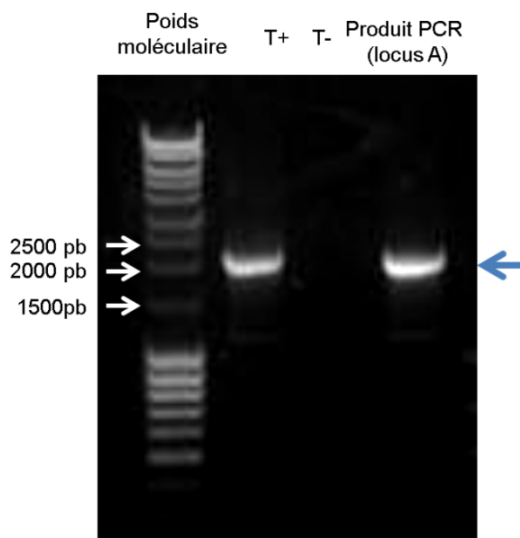


Figure 22. Contrôle de l'amplification des exons 2, 3 et 4 du gène HLA du locus A sur gel d'agarose 1%. Un témoin négatif (T-, eau) et un témoin positif (T+, ADN contrôle fourni dans le kit) sont amplifiés en parallèle comme contrôle de la méthode.

Le résultat du séquençage se matérialise sous la forme d'un électrophorégramme qui correspond à une succession de bases A, T, C, G (Figure 23). Le logiciel utilisé (Assign™) a la capacité de comparer puis d'identifier les séquences du même locus avec les séquences HLA consensus appartenant à une banque d'allèles. Ce logiciel aligne de façon automatique les exons sur une séquence consensus et propose une liste de résultats possibles de 0 MM (=mismatch) à n MM correspondant au nombre de positions discordantes avec la séquence consensus.

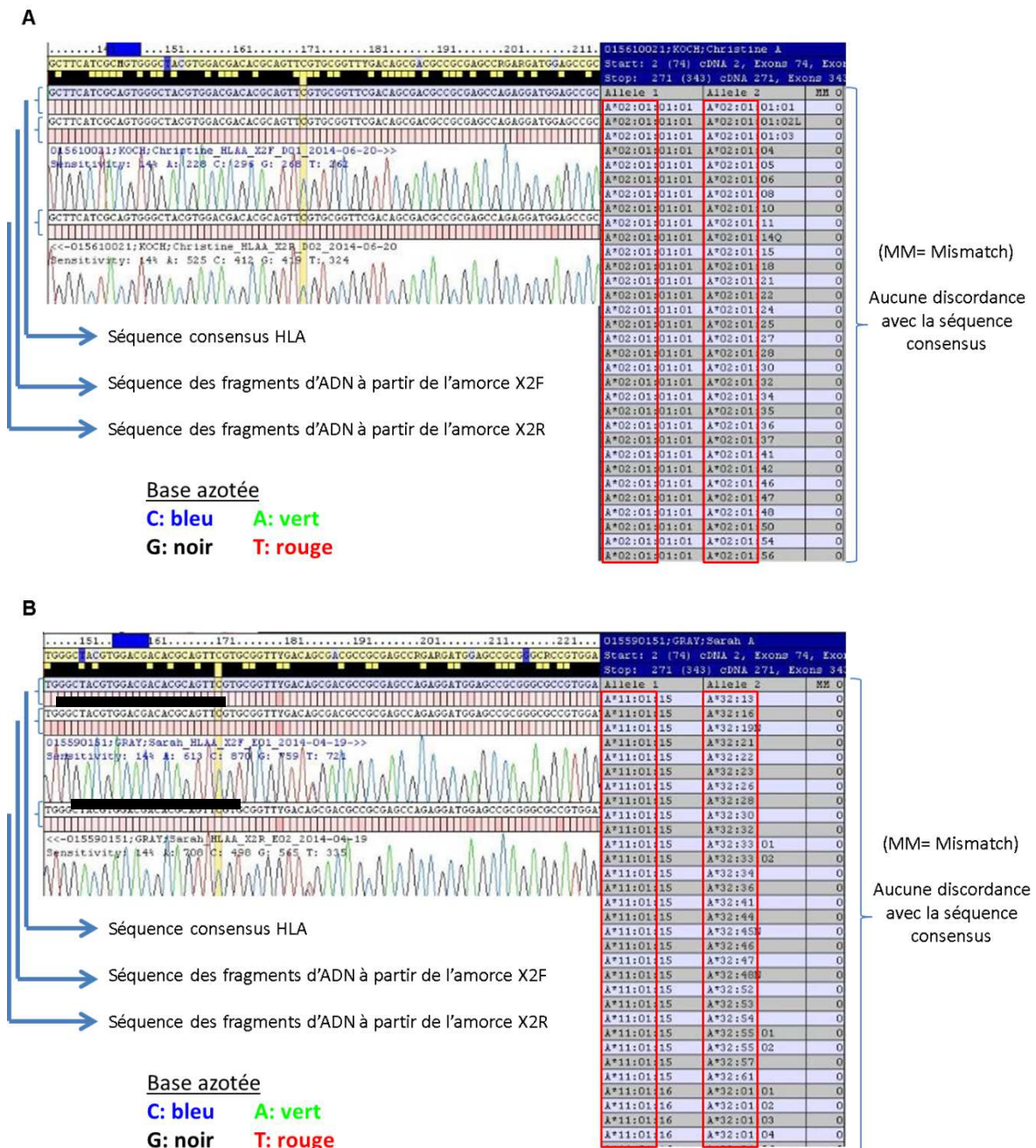


Figure 23. Résultat du séquençage de l'exon 2 sous forme d'électrophorégramme. A droite, sont représentées les différentes combinaisons alléliques possibles et le nombre de discordance (ou MM= MisMatch) avec la séquence consensus de l'allèle.

La Figure 23A montre les résultats du séquençage de l'un des 3 exons (exon 2) des allèles HLA de classe I à partir de 2 amorces (X2F et X2R). Il n'existe aucune discordance entre la séquence à typer et la séquence consensus de l'allèle de typage HLA-A*02:01 puisqu'il y a 0 Mismatch. Cette parfaite corrélation suggère que le phénotypage de cet individu correspond au typage HLA-A*02:01 ou HLA-A*02 (résolution générique) et qu'il est homozygote pour le locus A. De la même manière, les résultats présentés sur la Figure 23B montrent que l'individu possède un typage HLA-A*11, 32.

Pour en simplifier sa compréhension, les PMN purifiés à partir de sang frais provenant d'un individu sain de typage HLA-A*02 seront appelés « PMN HLA A2 » et les PMN purifiés à partir de sang provenant d'individu de typage HLA différent seront appelés « PMN HLA non A2 » (Tableau XXII).

Tableau XXII. Acronymes utilisés pour les PMN de cette étude

Typage HLA pour le locus A	
Nomenclature BM « 2 digits »	Dénomination des PMN
HLA-A*02	PMN HLA A2
Pas de typage HLA-A*02	PMN HLA non A2

PARTIE 2 : IMPACT DES ANTICORPS ANTI-HLA SUR LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

1. Activation des polynucléaires neutrophiles par les immunoglobulines G

Pour étudier l'effet des IgG sur les PMN, l'activité NADPH oxydase des cellules fraîchement isolées est mesurée par chimiluminescence en présence de concentration croissante en IgG. L'activité oxydase est évaluée par la libération de ROS produits est exprimée en RLU (Relative Luminescence Unit)

1.1. Activation des neutrophiles de typage HLA non A2

La production de ROS est d'abord évaluée sur des PMN qui ne possèdent pas la structure antigénique reconnue par l'anticorps anti-HLA A2 ; ces neutrophiles sont donc nommés « **PMN HLA non A2** ».

L'incubation de ces PMN avec les immunoglobulines G induit une augmentation de la production de ROS que ce soit en présence d'IgG non HLA A2 (Figure 24A) ou d'IgG HLA A2 (Figure 24B). En outre l'augmentation de ROS produits est corrélée avec une augmentation de la concentration en IgG puisqu'il existe une différence significative à partir de 100 µg/mL d'IgG ($p < 0,05$). Cependant, l'écart entre la production de ROS des PMN demeure faible en présence de la plus grande concentration en IgG (non HLA A2 ou HLA A2) comparée à celle obtenue en absence d'IgG (elle ne représente même pas le double).

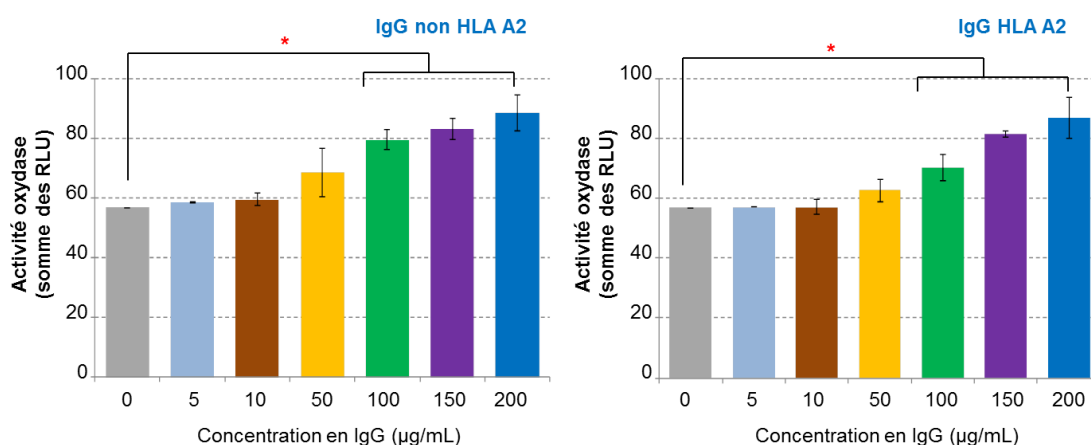


Figure 24. Activité oxydase des PMN de typage HLA non A2 après stimulation par les immunoglobulines G. Les PMN proviennent de sang frais après purification par gradient de Ficoll. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol après stimulation par le PMA (80ng/mL, témoin positif non représenté ici), par différentes concentrations en IgG non HLA A2 (A) ou en IgG HLA A2 (B). L'activité oxydase est exprimée en somme de RLU sur 90 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$: activité oxydase des PMN comparée avec et sans stimulation par les IgG.

Cette production de ROS reste très modeste si on la compare à celle obtenue en présence de PMA, un activateur non physiologique de la NADPH oxydase (Figure 25A et 25B).

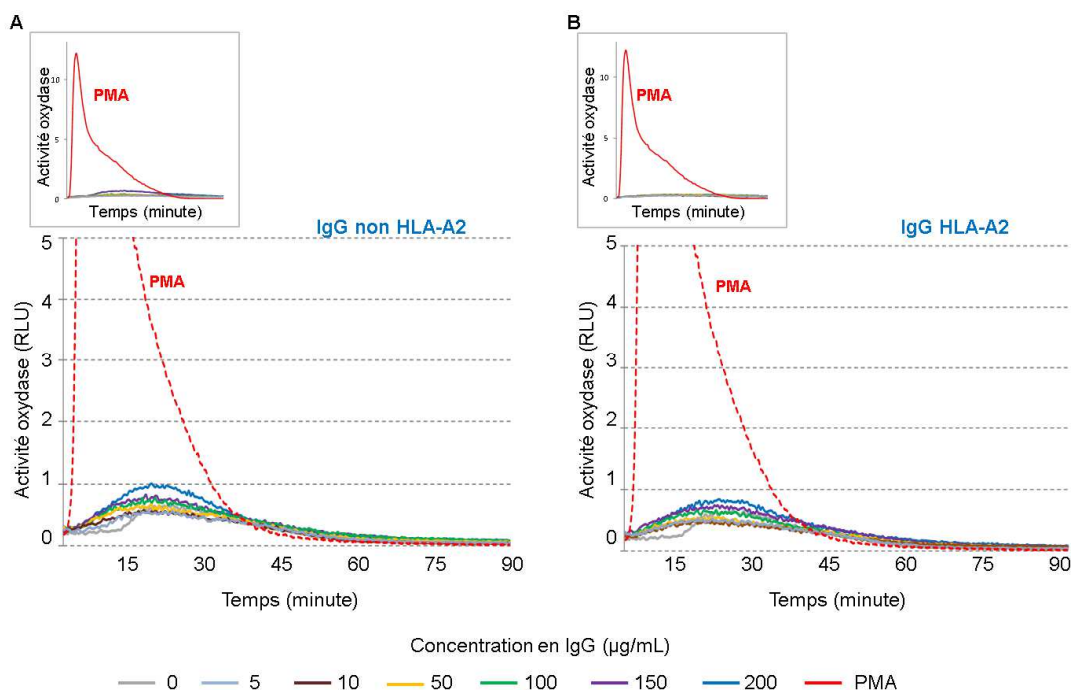


Figure 25. Activité oxydase des PMN de typage HLA non A2 après stimulation par les immunoglobulines G. Les PMN proviennent de sang frais après purification par gradient de Ficoll. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol après stimulation par le PMA (80ng/mL, témoin positif), différentes concentrations en IgG non HLA A2 (A) ou en IgG HLA A2 (B). L'activité oxydase a été mesurée en RLU (Relative Luminescence Unit) pendant 90 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

En outre, il n'y a pas de différence entre l'effet des IgG HLA A2 et celui des IgG non HLA A2 sur l'activité oxydase des PMN puisque leur activité présente une même cinétique. En effet, lors de la stimulation par le PMA, le pic de production des ROS est d'environ 14 RLU alors qu'il atteint difficilement 1 et 0,8 RLU respectivement lors de la stimulation par les IgG non HLA A2 et les IgG HLA A2 (à la concentration de 200 µg/mL).

1.2. Activation des neutrophiles de typage HLA A2 par les immunoglobulines G

La production des ROS est ensuite évaluée sur des PMN possédant à la structure antigénique reconnue par l'anticorps anti-HLA A2. Ces neutrophiles sont donc nommés « **PMN HLA A2** ».

Comme pour les PMN HLA non A2, l'incubation des neutrophiles avec des concentrations croissantes d'IgG non HLA A2 ou IgG HLA A2 conduit à une augmentation de la production de ROS (Figures 26A et 26B).

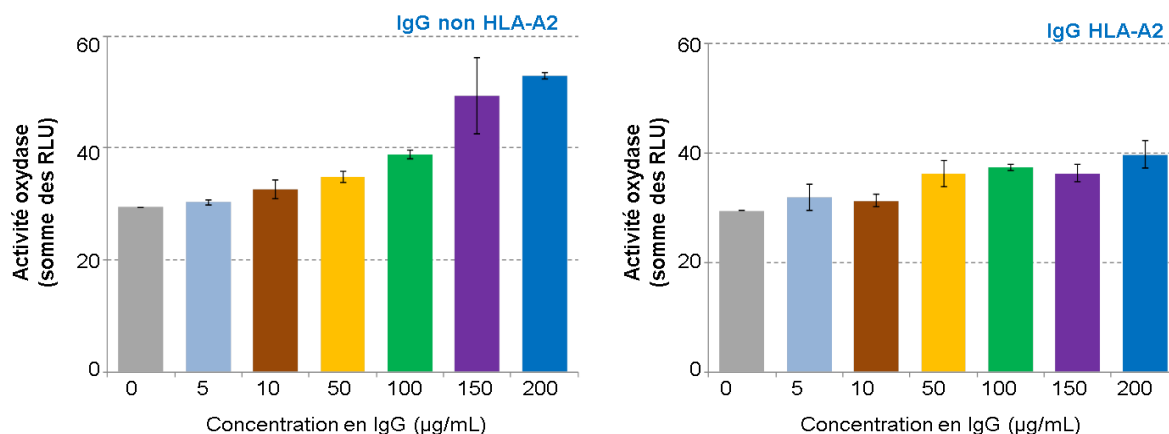


Figure 26. Activité oxydase des PMN de typage HLA-A2 après stimulation par des immunoglobulines G. Les PMN proviennent de sang frais après leur purification par gradient de Ficoll. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol après stimulation par le PMA (80ng/mL, témoin positif non représenté ici), par différentes concentrations en IgG non HLA A2 (A) ou en IgG HLA-A2 (B). L'activité oxydase est exprimée en somme de RLU sur 90 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

La production de ROS par les PMN soumis à l'IgG reste très modeste comparativement à l'activité obtenue en présence de PMA (Figure 27A et 27B). En effet, lors de la stimulation par le PMA, le pic de production de ROS est d'environ 14 RLU alors qu'il n'atteint même pas 1 RLU lors de la stimulation des PMN par les IgG non HLA A2. De plus, la cinétique de l'activité oxydase des PMN en présence d'IgG HLA A2 est comparable à celle des PMN en absence d'IgG.

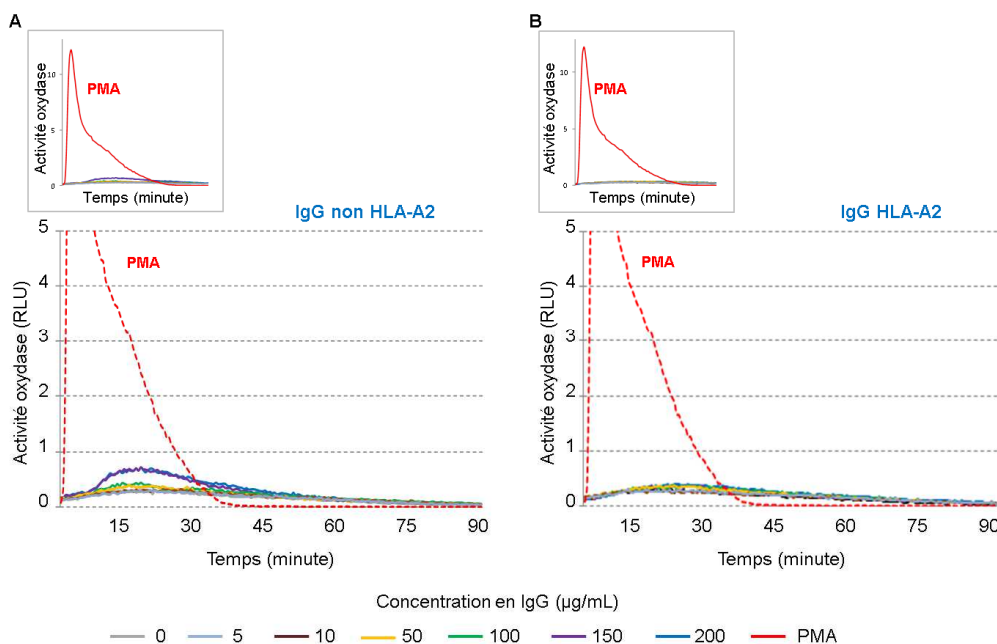


Figure 27. Activité oxydase des PMN de typage HLA A2 après stimulation par les immunoglobulines G. Les PMN proviennent de sang frais après leur purification par gradient de Ficoll. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol après stimulation par le PMA (80ng/mL, témoin positif), différentes concentrations en IgG non HLA A2 (A) ou en IgG HLA A2 (B). L'activité oxydase a été mesurée en RLU (Relative Luminescence Unit) pendant 90 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

La première partie de cette étude consistait à évaluer l'activation des PMN par les IgG. Cette activation a été évaluée par la production de ROS générés par la NADPH oxydase des neutrophiles. Au vu des résultats, bien qu'il ait été décrit plus haut une augmentation (cependant faible) de la production de ROS dans certaines conditions, il n'existe pas d'activation des neutrophiles (ou celle-ci est très faible) quand ceux-ci sont soumis à la seule présence des IgG.

2. Effet des immunoglobulines G sur l'activation des polynucléaires neutrophiles sensibilisés : le « priming » des neutrophiles

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la production de ROS libérés par les PMN quand ceux-ci sont pré-activés (« primés »). Le « priming » des PMN est un état dans lequel les PMN n'ont pas (ou très peu) d'activité NADPH oxydase, mais ils deviennent plus sensibles à un deuxième stimulus qui lui va déclencher l'activité oxydase. Deux agents sensibilisants (primants) ont été testés : le LPS et le fMLP.

2.1. Mesure de l'activité oxydase des neutrophiles sensibilisés

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

2.1.1. Sensibilisation des neutrophiles par le LPS

Les PMN sont mis en contact pendant 60 minutes avec deux concentrations de LPS décrites dans la littérature comme étant des concentrations de priming (152) (Figure 28).

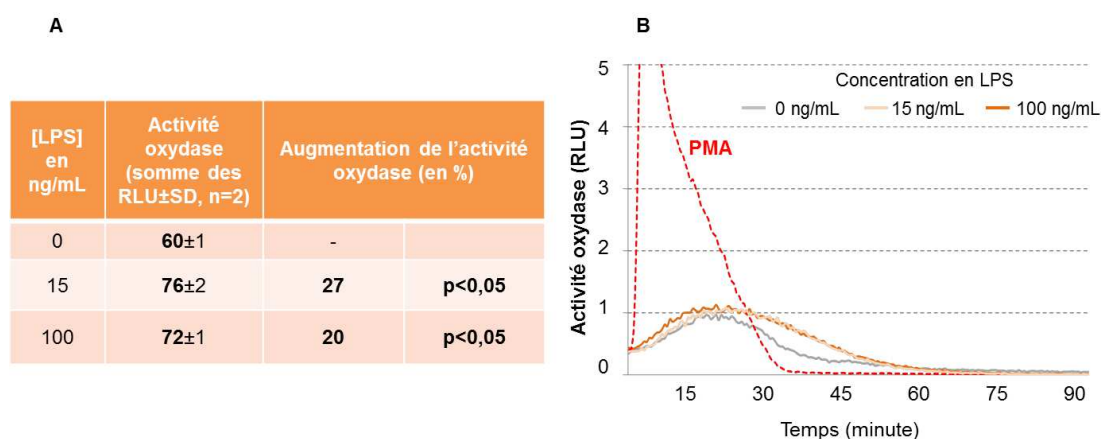


Figure 28. Activité oxydase des PMN stimulés par le LPS. Les PMN proviennent de sang frais après leur purification par gradient de Ficoll. Les cellules ont été stimulées par le LPS à 37°C pendant 60 minutes à deux concentrations différentes : 15 ng/mL et 100 ng/mL. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol. L'activité oxydase est exprimée en somme de RLU sur 90 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes (A). Le tableau représente le pourcentage d'augmentation de l'activité oxydase des PMN après stimulation avec les deux concentrations de LPS par rapport à leur activité sans stimulation. A droite (B), l'activité oxydase est représentée en fonction du temps. La stimulation des PMN par le PMA (80 ng/mL) est utilisée comme témoin positif. p<0,05 : activité oxydase des PMN sans priming comparée à celle en présence de priming. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

Les résultats présentés sur la Figure 28A montrent que la sensibilisation des PMN par le LPS aux concentrations de 15 ng/mL et à 100 ng/mL induit respectivement une augmentation de l'activité oxydase de 27% et 20%. Cette activité est de faible intensité si on compare la cinétique des PMN stimulés par le PMA (Figure 28B) puisque le niveau du pic d'activité des PMN préalablement sensibilisés atteint à peine 1 RLU.

2.1.2. Sensibilisation des neutrophiles par le fMLP

Les PMN sont mis en contact pendant 15 minutes avec deux concentrations de fMLP décrites dans la littérature comme étant des concentrations de priming (153) (Figure 29A et 29B).

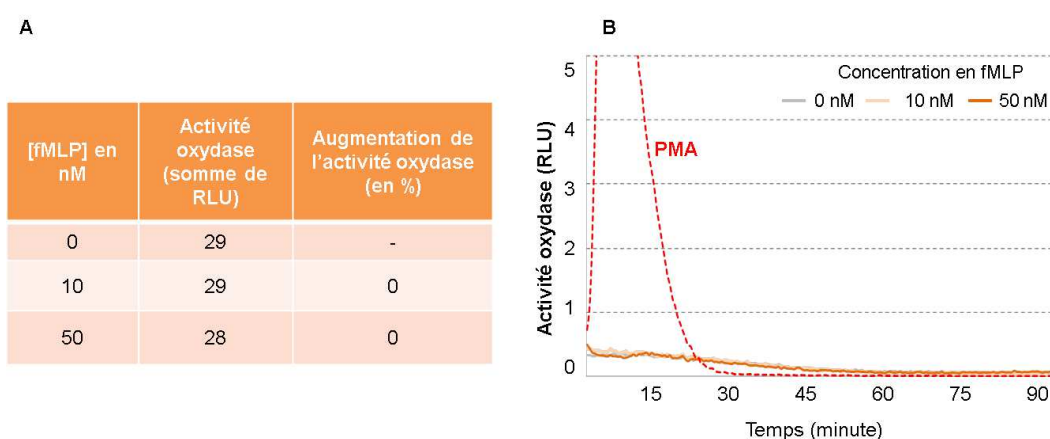


Figure 29. Activité oxydase des PMN stimulés par le fMLP. Les PMN proviennent de sang frais après leur purification par gradient de Ficoll. Les cellules ont été stimulées par le fMLP à 37°C pendant 15 minutes à deux concentrations différentes : 10 nM et 50 nM. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol. L'activité oxydase est exprimée en somme de RLU sur 90 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes (**A**). Le tableau représente le pourcentage d'augmentation de l'activité oxydase des PMN après stimulation avec les deux concentrations de fMLP par rapport à leur activité sans stimulation. A droite (**B**), l'activité oxydase est représentée en fonction du temps. La stimulation des PMN par le PMA (80ng/mL) est utilisée comme témoin positif. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative d'au moins trois expériences indépendantes.

La somme de RLU des PMN stimulés par le fMLP (Figure 29A) ainsi que leur cinétique analysée lors de l'activité mesurée pendant 90 minutes (Figure 29B) sont strictement identiques qu'avec les PMN sans stimulation. La sensibilisation des PMN aux deux concentrations de fMLP n'induit pas d'activité NADPH oxydase.

Ainsi, nous pouvons en conclure que le priming des PMN par le fMLP ou par le LPS n'induit pas à lui seul (résultat plus marqué avec le fMLP), une activation des neutrophiles et que les cellules sont simplement dans un état de sensibilisation.

2.2. Mesure de l'activité oxydase des neutrophiles sensibilisés en présence d'immunoglobulines G

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

Les expériences sont réalisées à partir des deux phénotypes (PMN HLA A2 et PMN HLA non A2), avec les deux agents sensibilisants (LPS et fMLP), en présence des IgG HLA A2 ou des IgG non HLA A2.

2.2.1. Effet des IgG sur les neutrophiles sensibilisés par le fMLP

La Figure 30A représente l'activité oxydase des PMN de typage HLA A2 préalablement sensibilisés par le fMLP, puis soumis à l'incubation en présence d'IgG. Dans ces conditions, le priming des PMN induit une augmentation de la production de ROS mais cette augmentation reste très modeste. Aux mêmes concentrations d'IgG, il n'y a pas de différence significative entre l'activité oxydase des PMN stimulés par les IgG non HLA A2 et celle des PMN stimulés par les IgG HLA A2. De plus, l'activité oxydase est comparable entre elle, quelque soit la concentration d'IgG présente.

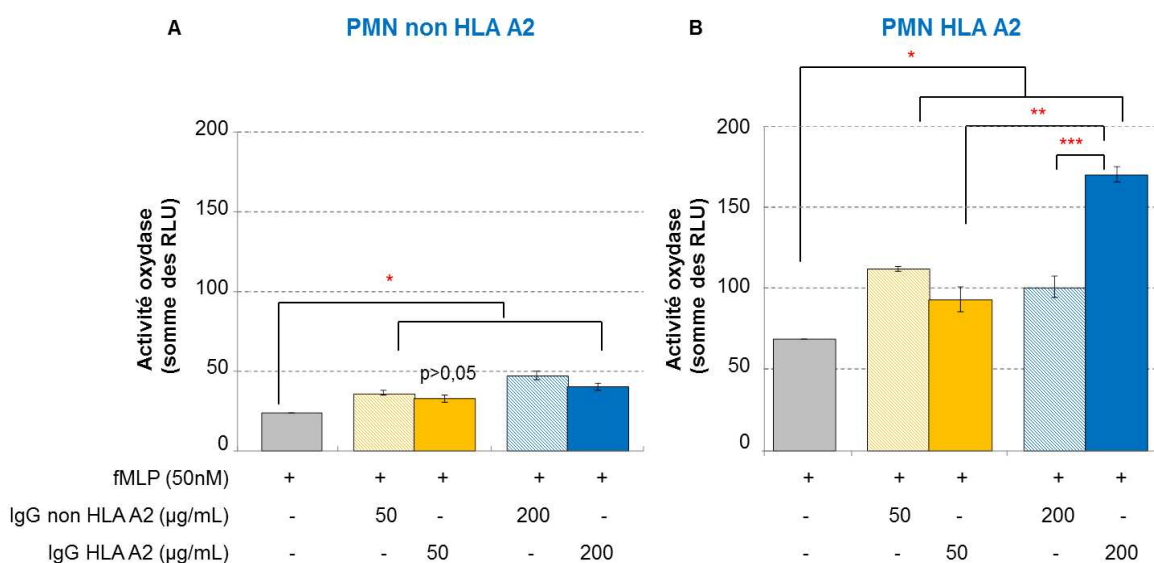


Figure 30. Activité oxydase des PMN préalablement stimulés par le fMLP. Les PMN proviennent de sang frais après purification par gradient de Ficoll Les PMN HLA non A2 (A) et les PMN HLA A2 (B) ont été stimulés par le fMLP (50 nM) à 37°C pendant 15 minutes. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol après stimulation par des IgG non HLA A2 et des IgG HLA A2. Elle est exprimée en somme de RLU sur 60 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes. La stimulation des PMN par le PMA (80 ng/mL) est utilisée comme témoin positif (non représenté ici). *p<0,05 : activité oxydase des PMN en absence et en présence d'IgG ; **p<0,05 : activité oxydase des PMN en présence de 200 µg/mL d'IgG non HLA A2 comparée à celle en présence de la même concentration en IgG HLA A2 ; ***p<0,05 : activité oxydase des PMN en présence de 50 µg/mL d'IgG HLA A2 comparée à celle en présence de 200 µg/mL d'IgG HLA A2. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

En revanche, les mêmes expériences réalisées sur des PMN de typage HLA A2 ne donnent pas les mêmes résultats. La Figure 30B montre une différence significative (* $p < 0,05$) entre l'activité oxydase de ces PMN en présence d'IgG par rapport à celle obtenue en absence d'IgG (Figure 30A). Mais si on compare attentivement la production de ROS obtenue par les PMN sensibilisés après stimulation par les IgG HLA A2, on remarque une nette augmentation de la production de ROS avec la plus grande concentration en IgG présente (** $p < 0,05$). En outre, pour une même quantité en IgG, l'activité oxydase est significativement plus importante quand les PMN en présence d'IgG HLA A2 (** $p < 0,05$).

2.2.2. Effet des IgG sur les neutrophiles sensibilisés par le LPS

La Figure 31A représente l'activité oxydase des PMN de typage HLA non A2 préalablement sensibilisés par le LPS à la concentration de 100 ng/mL, en présence d'IgG. Dans ces conditions, le priming des PMN induit une augmentation de la production de ROS mais cette augmentation reste très modeste (voire presque nulle en présence d'une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ d'IgG HLA A2).

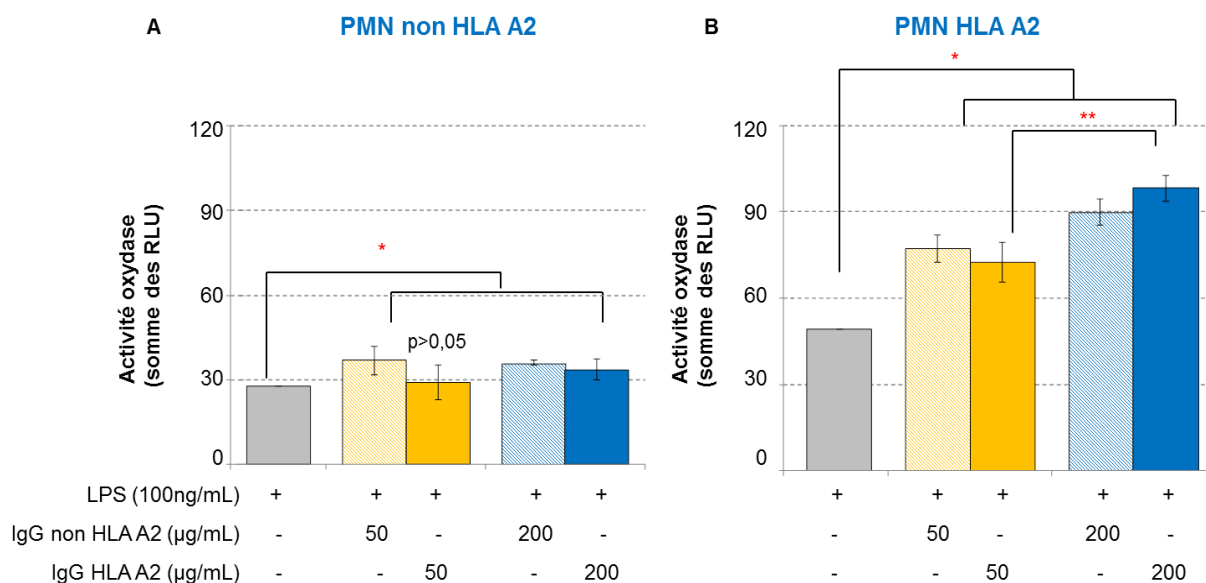


Figure 31. Activité oxydase des PMN préalablement stimulés par le LPS. Les PMN proviennent de sang frais après purification par gradient de Ficoll. Les PMN HLA non A2 (A) et les PMN HLA A2 (B) ont été stimulés par le LPS (100 ng /mL) à 37°C pendant 60 minutes. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol après stimulation par des IgG non HLA A2 et des IgG HLA A2. Elle est exprimée en somme de RLU sur 60 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes. La stimulation des PMN par le PMA (80 ng/mL) est utilisée comme témoin positif (non représenté ici). * $p < 0,05$: activité oxydase des PMN en absence et en présence d'IgG ; ** $p < 0,05$: activité oxydase des PMN en présence de 200 $\mu\text{g/mL}$ d'IgG non HLA A2 comparée à celle en présence de la même concentration en IgG HLA A2. Ces résultats proviennent d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

Aux mêmes concentrations d'IgG, l'activité oxydase des PMN HLA non A2 stimulés par les IgG non HLA A2 ne diffère pas de celle des PMN stimulés par les IgG HLA A2. De plus, l'activité oxydase est comparable entre elle, quelque soit la concentration d'IgG présente.

De même que dans les conditions de priming par le fLMP, les résultats obtenus à partir de PMN de typage HLA A2 sont différents. La Figure 31B montre une différence significative ($*p < 0,05$) entre l'activité oxydase de ces PMN en présence d'IgG par rapport à celle de ces PMN sans IgG (Figure 31A). Si on compare la production de ROS obtenue par les PMN sensibilisés par le LPS après stimulation par les IgG HLA A2, on remarque une augmentation de la production de ROS avec la plus grande concentration en IgG présente ($**p < 0,05$). En outre, pour une même quantité en IgG, l'activité oxydase est augmentée quand les PMN en présence d'IgG HLA A2 mais ces résultats sont plus avérés dans les conditions de priming des PMN par le fMLP.

L'effet des IgG sur l'activation des PMN sensibilisés par le fMLP ou le LPS n'entraîne pas d'effet majeur quand ceux-ci ne possèdent pas à leur surface la structure antigénique correspondant à l'anticorps spécifique. A l'inverse, la production de ROS, qui permet d'évaluer l'état d'activation des PMN, est largement augmentée quand les PMN préalablement sensibilisés rencontrent l'anticorps spécifique pour ensuite être capable de former un complexe antigène-anticorps HLA. Il est à noter que cette observation est d'autant plus pertinente quand les PMN sont soumis à la présence d'une certaine quantité en IgG HLA A2 comme s'il existait « un titre seuil ». Cette hypothèse sera développée plus en détails dans la partie discussion.

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

3. Implication de la NADPH oxydase phagocytaire

Dans toutes les expériences décrites précédemment, l'activation des neutrophiles est étudiée *via* la mesure de la production de ROS. Pour vérifier que cette production est bien due à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire, des expériences ont été réalisées en présence d'un inhibiteur des flavoprotéines, le DPI (diphényleneiodonium) (154). Ici, les PMN de typage HLA A2 fraîchement isolés sont traités dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment (sensibilisation par le LPS ou le fMLP puis ajout d'IgG HLA A2). Dans certaines conditions, les PMN sont pré-traités par du DPI. L'activité oxydase avec et sans DPI des PMN HLA A2 est illustrée dans le Tableau XXIII :

Tableau XXIII. Effet du DPI sur l'activité oxydase des PMN HLA A2.

	Activité oxydase (somme des RLU)		Augmentation de l'activité oxydase (%)	
	Sans DPI	Avec DPI	Sans DPI	Avec DPI
PBS	22	x	x	x
LPS	83	0,2	270	0
fMLP	69	0,2	190	0

Les PMN de typage HLA-A2 proviennent de sang frais après purification par gradient de Ficoll. Les PMN ont été stimulés par le LPS (100 ng/mL) à 37°C pendant 60 min ou par le fMLP (50 nM) pendant 15 minutes. La production totale de ROS a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol après stimulation par les IgG HLA A2. Dans certaines conditions, les PMN sont pré-traités par du DPI à 5µM. L'activité oxydase est exprimée en somme de RLU sur 60 minutes à raison d'une mesure tous les 30 secondes. La stimulation des PMN par le PMA (80 ng/mL) est utilisée comme témoin positif (non représenté ici).

Le pré-traitement des cellules par le DPI, inhibiteur de la NADPH oxydase, montre une inhibition complète de la production des ROS ce qui montre que la NADPH oxydase phagocytaire est bien l'enzyme qui induit la production des ROS en réponse aux IgG HLA A2.

4. Expression de l'antigène HLA A2 à la surface des PMN : effet du priming des neutrophiles

Nous avons vu précédemment que l'activation des neutrophiles résulte de la formation du complexe antigène HLA-anticorps HLA spécifique quand ceux-ci sont sensibilisés au préalable par le LPS ou le fMLP. Sans effet de ce priming, il n'y a pas d'activation (ou très faible) des neutrophiles par les anticorps anti-HLA.

Face à ce constat, nous nous sommes demandés si la sensibilisation des PMN pouvait entraîner une augmentation de l'expression des sites antigéniques HLA à la surface des PMN et ainsi potentialiser l'effet des anticorps dans l'activation des neutrophiles.

Pour répondre à cette interrogation, un marquage spécifique des molécules HLA A2 à la surface des PMN (typage HLA A2 et HLA non A2) a été réalisé et analysé par cytométrie en flux (Figure 32).

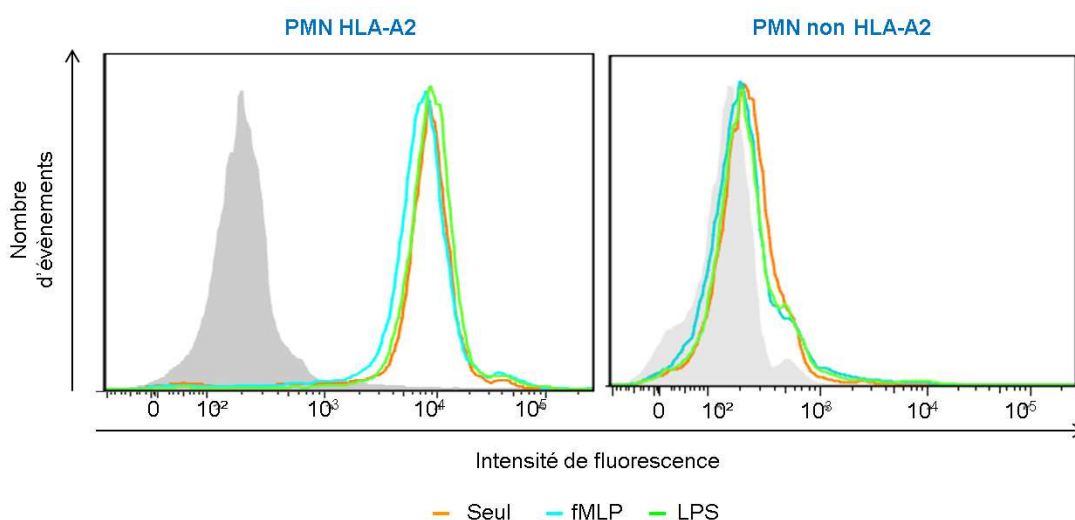


Figure 32. Analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'antigène HLA A2 sur des PMN au repos et après stimulation au fMLP ou au LPS (priming). L'expression de l'antigène a été révélée grâce à un anticorps monoclonal HLA-A2 (BB7.2) combiné à un anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa Fluor 488. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle.

Les résultats obtenus à partir du marquage des molécules HLA A2 sur les PMN de typage HLA non A2 (à droite), montrent une absence de l'expression de l'antigène HLA A2 que cela soit sur les cellules au repos (seul) que sur les cellules sensibilisés au fMLP ou par le LPS.

Dans les PMN HLA A2 au repos (à gauche), les antigènes HLA A2 sont bien exprimés mais il n'existe pas d'augmentation de leur expression quand ceux-ci sont sensibilisés par le fMLP ou le LPS.

5. Etude des récepteurs aux immunoglobulines G des polynucléaires neutrophiles : les récepteurs au Fc γ

Les immunoglobulines d'isotype G se fixent de façon spécifique sur les récepteurs Fc γ des polynucléaires neutrophiles par leur fragment Fc. Pour rappel, les neutrophiles expriment constitutivement deux récepteurs Fc γ de faible affinité, CD32a (Fc γ RIIa) et CD16b (FcR γ IIb), tandis que l'expression du récepteur de haute affinité CD64 (Fc γ RI) est inducible par l'interféron- γ (IFN γ) (38). Les données de la littérature ont été vérifiées par analyse en cytométrie en flux.

La Figure 33 montre l'absence ou la présence de l'expression de ces trois récepteurs à la surface des neutrophiles au repos, et des neutrophiles sensibilisés ou activés par le fMLP.

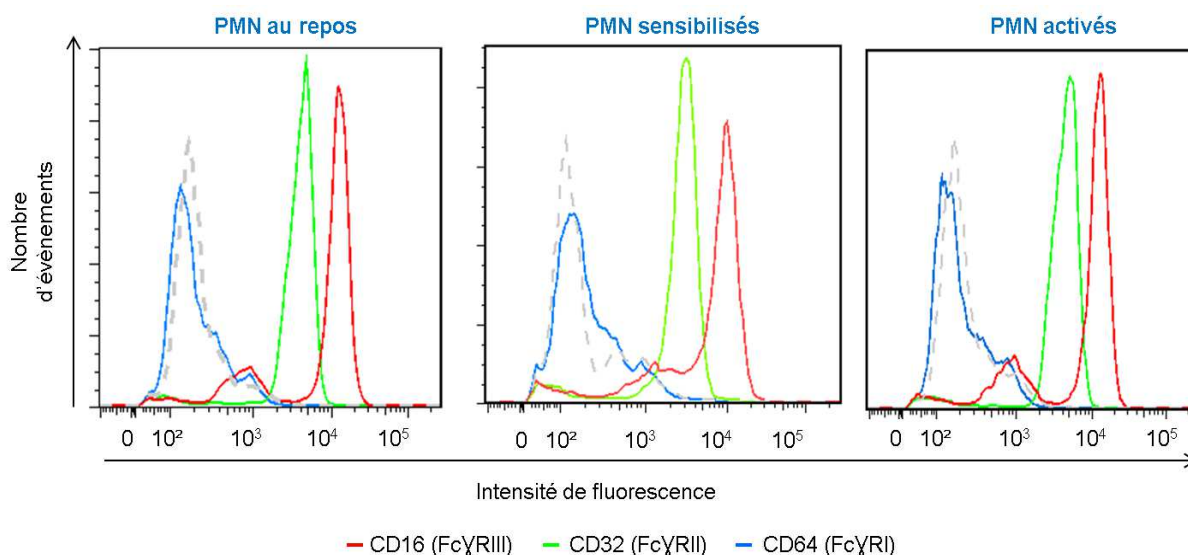


Figure 33. Analyse par cytométrie en flux de l'expression des récepteurs Fc γ (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) à la surface des PMN. Les PMN proviennent de sang frais après purification par gradient de Ficoll. Ils ont été sensibilisés (50 nM) ou activés au fMLP (1 μ M) pendant 15 minutes à 37°C. L'expression des récepteurs Fc γ a été révélée grâce aux anticorps monoclonaux CD16 (3G8), CD32 (AT10) et CD64 (10.1) combiné à un anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa Fluor 488. La courbe grise en pointillé correspond à l'isotype contrôle.

Les récepteurs Fc γ II et Fc γ III sont exprimés sur les trois types de PMN contrairement au récepteur RI. Les PMN expriment constitutivement les récepteurs Fc γ II et Fc γ III. L'expression de Fc γ RI n'est donc pas constitutive et n'est pas être induite par le fMLP.

Afin de savoir si l'expression de ce récepteur pouvait être induite par les PMN après activation par les anticorps anti-HLA, l'expression de FcγRI sur des PMN de typage HLA A2 a été évaluée après leur stimulation par le fMLP puis leur activation par les IgG HLA A2. (Figure 34).

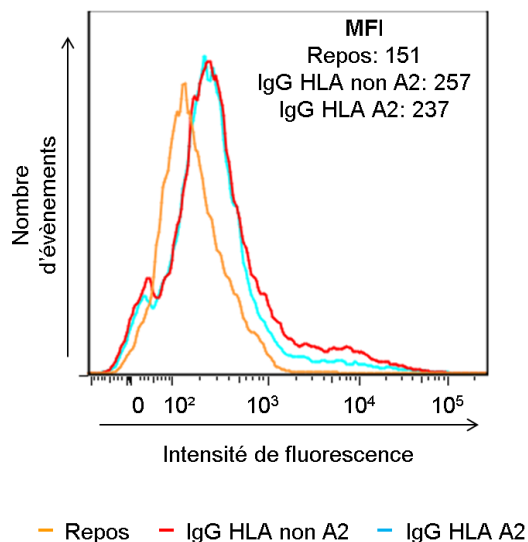


Figure 34. Analyse par cytométrie en flux de l'expression du récepteur FcγRI (CD64) sur des PMN au repos et activés par les immunoglobulines G. Les PMN proviennent de sang frais après purification par gradient de Ficoll. Ils ont été sensibilisés au préalable par le fMLP (50 nM) pendant 15 minutes à 37°C. L'expression de FcγRI a été révélée grâce à un anticorps monoclonal CD64 (10.1) combiné à un anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa Fluor 488.

Il existe un léger décalage du pic représentant l'expression du récepteur FcγI pour les PMN activés par les IgG HLA A2 et les IgG non HLA A2 par rapport aux cellules à l'état de repos. Ce décalage est plus représentatif si on compare les valeurs de la moyenne de fluorescence (MFI). En effet, la MFI rapportée pour les PMN à l'état de repos est de 151 et elle est respectivement de 257 et 237 pour le marquage de FcγRI aux PMN stimulés par les IgG non HLA A2 et IgG HLA A2. L'expression du récepteur FcγI est inductible par les anticorps mais cette expression n'est pas spécifique aux anticorps anti-HLA A2. Une autre question pour laquelle nous pouvons nous interroger et qui sera développée dans la discussion, est de savoir s'il existerait d'autres voies de fixation ou d'autres mécanismes spécifiques aux anticorps anti-HLA conduisant à l'activation des PMN.

DISCUSSION

La transfusion de produits sanguins labiles représente un traitement substitutif essentiel pour de nombreux patients transfusés. En France, la première expérience de transfusion sanguine remonte à 1667 mais c'est lors de la première guerre mondiale qu'ont eu lieu les premières transfusions en masse sur les soldats blessés (155). A cette époque, la connaissance des groupes érythrocytaires ABO n'était pas encore tout à fait établie : les champs de bataille deviennent alors des champs d'expérimentation pour les médecins. C'est pendant les périodes de l'entre-deux guerres que les méthodes se professionnalisent et commencent à être appliquées, dans les hôpitaux. La sécurité transfusionnelle mise en place dans les années 90 est assurée par une maîtrise de toutes les étapes de la chaîne transfusionnelle, du donneur au receveur et les effets indésirables survenus chez le receveur de PSL, sont signalés auprès de l'ANSM.

L'œdème lésionnel pulmonaire post-transfusionnel TRALI est un des effets indésirables, souvent sous-évalué en nombre mais qui demeure un accident transfusionnel grave du fait du pronostic vital engagé. Dans la survenue du TRALI, les données de la littérature suggèrent un mécanisme en deux étapes : la première, inhérente à une situation pathologique ou thérapeutique du patient transfusé est responsable d'une pré-stimulation intra-pulmonaire des PMN. La deuxième étape, dépendante de la transfusion elle-même, conduit à l'activation des PMN. De nombreux travaux ont cherché à définir le facteur déclenchant l'activation des PMN chez les patients à risque notamment en évoquant le rôle des anticorps anti-HLA, sans jamais clairement le démontrer. La responsabilité directe des anticorps anti-HLA dans ces processus est suggérée mais reste donc à étayer dans l'objectif d'optimiser les critères de diagnostic et de développer des stratégies préventives adaptées.

Dans ce travail, les études réalisées *ex vivo* ont pour objectif d'évaluer l'implication des anticorps anti-HLA dans l'activation des PMN. Les anticorps anti-HLA A2 ont été choisis du fait de la fréquence d'expression HLA A2 dans la population caucasienne (>46 %). De ce fait, la fréquence d'immunisation contre l'antigène HLA A2 en est plus élevée. Les résultats expérimentaux montrent d'une part que les PMN mis en contact avec des concentrations croissantes en immunoglobulines G peuvent produire des ROS et cela, quelque soit leur typage (Figures 24-27). Cette production est largement augmentée si les PMN sont préalablement sensibilisés (« *primés* ») par des molécules d'origine bactérienne, tels que le LPS ou le fMLP. En outre, la libération d'ions superoxyde est significativement plus élevée en présence d'anticorps anti-HLA reconnaissant la molécule antigénique HLA des PMN (Figures 30 et 31).

Représentative de l'activité de la NADPH oxydase, la mesure de la production de dérivés réactifs de l'oxygène, les ROS, est un bon moyen pour évaluer l'état d'activation des neutrophiles. En effet, la NADPH oxydase est un complexe enzymatique au repos dont les espèces moléculaires sont dissociées dans les PMN non stimulés. Au moment du « *priming* », certaines protéines du complexe oxydase, notamment p47^{phox}, sont phosphorylées ce qui conduit à un changement de conformation mais sans production significative d'ions superoxyde. Après stimulation par des molécules pro-inflammatoires, la NADPH oxydase s'assemble au niveau de la membrane et devient active, libérant des ions superoxydes dans le phagosome (s'il y a phagocytose) ou dans le milieu extracellulaire. La mesure de l'activité NADPH oxydase *ex vivo* permet de vérifier si les cellules sont uniquement sensibilisées ou si elles sont vraiment activées.

Les données montrent que l'activité oxydase des PMN est corrélée à la quantité d'IgG présentes dans le milieu, avec une activation nettement plus importante dans les conditions de la plus grande concentration en IgG (200 µg/mL d'IgG HLA A2 pour 2×10^5 PMN de typage HLA A2). Ces données s'accordent avec l'hypothèse de l'implication des anticorps anti-HLA dans le déterminisme du TRALI. On doit alors s'interroger sur un lien de cause à effet entre le niveau d'activation des PMN et la survenue du TRALI. En effet, un « titre seuil » d'IgG HLA A2 est repéré à partir duquel la production de ROS des PMN HLA A2 est significativement plus élevée.

En 2010, les travaux d'Okazaki *et al.* (156) montrent le lien entre la quantité d'anticorps anti-HLA et la survenue du TRALI. En effet, parmi les 1038 accidents transfusionnels non hémolytiques déclarés au Japon entre 1997 et 2009, 200 accidents soit 19% des cas étaient dus au TRALI (imputabilité 3) et 80 (7%) étaient possiblement dus au TRALI (imputabilité 1). 16,6% des patients ayant eu une réaction adverse autre que l'œdème lésionnel ont reçu au moins une unité de PSL avec des anticorps anti-HLA dont l'homologie HLA correspondait à celui du patient transfusé. Enfin, parmi ces trois groupes, la positivité de ces anticorps était significativement plus élevée dans les cas de TRALI certain (imputabilité 3). Ceci conduit à émettre que l'existence d'un conflit immunologique ne s'ensuit pas de la survenue du TRALI. Sur les résultats obtenus, cela confirme que le patient transfusé doit être dans un état clinique ou thérapeutique à risque et qu'une « concentration seuil » d'IgG HLA est importante dans le déclenchement du phénomène.

Actuellement, la prévention repose sur l'éviction de tous les donneurs présentant des anticorps anti-HLA, diminuant ainsi fortement le nombre de produits sanguins disponibles à la transfusion alors que les besoins ne cessent d'augmenter. L'augmentation de ces besoins se justifie par l'allongement de l'espérance de vie donc

une augmentation du nombre de maladies nécessitant l'utilisation d'un traitement transfusionnel. En effet, aujourd'hui plus de 2/3 des personnes transfusées ont plus de 60 ans (5). D'autre part, les progrès de la médecine et le développement de nouveaux médicaments permettent de traiter les patients avec l'utilisation de molécules induites par chimiothérapie. Ces traitements nécessitent une grande disponibilité des produits sanguins. La problématique actuelle s'inscrit dans la difficulté à maintenir une réserve en PSL pour satisfaire les besoins de tous les patients. Les mesures d'éviction des donneurs à risque permettent ainsi d'apprécier le bien-fondé et les contreparties de ces stratégies. Par exemple, les donneuses ayant eu des grossesses jouent un rôle considérable dans l'approvisionnement en PSL, alors que les risques d'immunisation amènent à reconsidérer l'utilisation de leur don au moins pour la distribution de plaquettes et de plasma.

Riche de ces connaissances appuyées sur les données de la littérature, l'éviction de tous les PSL présentant des anticorps anti-HLA n'est donc pas la meilleure attitude à adopter si l'on prend en compte de l'existence d'un seuil de déclenchement à partir duquel, les PMN passent de l'état de sensibilisation à « l'état agressif » d'activation. Il est donc nécessaire de définir un seuil en dessous duquel les anticorps contenus dans le produit sanguin n'entraîne pas l'exclusion systématique du don et donc du donneur en vue de bénéficier d'une réserve optimale en PSL.

L'activation des neutrophiles résulte de la formation du complexe antigène-anticorps HLA spécifique quand ceux-ci sont sensibilisés au préalable par le LPS ou le fMLP. Sans effet de priming, cette activation est faible. Nous nous sommes demandés si ce phénomène de priming modifiait l'expression des sites antigéniques HLA à la surface des PMN et ainsi potentialiser l'effet des anticorps dans l'activation des neutrophiles. Ce travail s'est par la suite orienté sur l'étude de la densité antigénique HLA des neutrophiles. L'analyse par cytométrie en flux de l'expression de l'antigène HLA A2 sur les PMN HLA A2 (Figure 32) permet de conclure qu'il n'existe pas d'augmentation de l'expression du produit HLA chez les cellules sensibilisées (fMLP, LPS) par rapport aux cellules au repos. Les travaux de Siliman *et al* (157), ont analysé l'effet du priming par les anticorps anti-HLA A2 des PMN purifiés à partir d'individus hétérozygotes ou homozygotes pour les 2 allèles du locus A (HLA A2). Les auteurs ont comparé la production de ROS produits par ces différents groupes de PMN. L'activation par le fMLP des PMN provenant de donneurs homozygotes était plus élevée après leur incubation avec des anticorps monoclonaux anti-HLA A2. Ils en ont conclu que le priming par les anticorps était plus efficace pour les PMN provenant de donneurs homozygotes et que ce résultat était dû à une augmentation de l'expression antigénique à la surface des cellules (158).

Dans notre travail, les expériences ont fait appel à l'utilisation de PMN purifiés à partir d'individus sains de typage HLA A2, hétérozygotes ou homozygotes pour les deux allèles du locus A. Ces conditions n'ont pas été prises en compte dans notre appréciation car elles n'ont pas fait l'objet de différences de résultats entre chaque expérience.

L'expression des récepteurs Fcγ a été ensuite étudiée sur des neutrophiles à l'état de repos, sensibilisés ou à l'état d'activation (Figure 33). Dans nos expériences, FcγRII et FcγRIII sont exprimés constitutivement sur les trois types de PMN contrairement au récepteur FcγI qui est inductible par les anticorps (Figure 34). Cette induction n'est pas spécifique aux anticorps anti-HLA A2 mais cette partie reste encore à développer. Les fonctions de ces récepteurs sont multiples et essentielles dans la défense de l'hôte contre les microorganismes. Les FcγR activateurs jouent un rôle clé dans la phagocytose et la sécrétion de facteurs solubles comme détaillé dans l'introduction. L'activation de ces récepteurs induit des voies de signalisation qui modulent la réponse immunitaire telle que l'activation de la NADPH oxydase. L'équipe de Matthay et al. a développé un modèle murin FcγR^{-/-} et a montré que ces souris étaient résistantes au développement du TRALI mais que le transfert adoptif de neutrophiles de souris sauvages vers ce modèle murin rétablit l'apparition de l'œdème lésionnel (114). Dans ce modèle animal, le mécanisme du TRALI est dépendant de la présence de neutrophiles et de leurs récepteurs aux immunoglobulines G. En outre, en plus des récepteurs Fc à leur surface, les PMN expriment un grand nombre de récepteur qui reconnaît directement l'invasion du pathogène et l'environnement inflammatoire. Parmi ces récepteurs, on distingue les récepteurs spécifiques des molécules chemoattractantes ou de chimiokines couplées à une protéine G, les récepteurs impliqués dans l'adhésion tels que les sélectines ou les intégrines, les « Toll-like » récepteurs etc. Ces récepteurs jouent un rôle important dans le déclenchement des différentes voies de transduction du signal impliquées dans l'activation du PMN (159). De ce fait, le blocage des récepteurs Fc est un bon moyen de déterminer s'il existe d'autres voies intracellulaires de transduction du signal aboutissant à l'activation du neutrophile par les anticorps anti-HLA.

Chez le patient transfusé, les situations favorisant la survenue du TRALI sont par définition des situations dans lesquelles le malade présente des facteurs de stimulation de ses neutrophiles qui sont a priori incapables à elles seules d'aboutir à un œdème lésionnel pulmonaire puisqu'elles ne fournissent pas le stimulus activant les neutrophiles. Les facteurs de risque cités dans la revue générale de la littérature (au chapitre 2 de la partie II) nous donnent une idée des situations pathologiques et thérapeutiques des patients à risque mais cette liste n'est pas exhaustive. Au vu des résultats déjà acquis,

l'identification de marqueurs de susceptibilité en faveur de la survenue du TRALI suggère l'existence de paramètres stratégiques pour le dépistage d'une population dite « à risque ». Un test fonctionnel mis en œuvre à partir d'un prélèvement de sang total permettra d'évaluer, au préalable, l'activité oxydase chez les patients transfusés. Ce test envisage l'utilisation de sondes spécifiques (160), telle que la dihydrorhodamine 123 (DHR123), composé non fluorescent qui, en présence de dérivés réactifs de l'oxygène, est oxydé en rhodamine 123, composé hautement fluorescent et mesurée par cytométrie en flux. Cette analyse serait réalisable en amont d'une transfusion, tout en répondant aux exigences des urgences souvent vitales des services hospitaliers, puisqu'elle semble fiable, simple et rapide. Une des perspectives de ce projet devra conduire à un projet de recherche clinique pour valider à plus grande échelle le test proposé afin d'identifier au mieux la population de patients transfusés à risque avec pour objectif l'application d'un traitement prophylactique ciblé sur ces patients.

La proposition d'un traitement prophylactique approprié aux patients à risque cible les intervenants de l'immunité innée reconnus comme critiques. L'activité de la NADPH oxydase phagocytaire ou Nox2 présente dans les PMN semble être un outil sensible pour évaluer le degré d'activation des PMN et améliorer la connaissance des mécanismes moléculaires du TRALI. Elle pourrait en particulier jouer un rôle déterminant dans l'interaction des neutrophiles avec les autres cibles cellulaires que sont les cellules endothéliales. Dans ce contexte, l'évaluation d'agents bloquants spécifiques de Nox2 pourrait être envisagée pour prévenir la cascade de réactions aboutissant au TRALI. En particulier, avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de Nox2 (clones 7A2, 13B6, 15B12 ou 8G11, reconnaissant le domaine extracellulaire de la sous-unité gp91phox) qui sont produits par l'équipe du GREPI (161).

Par ailleurs, en cernant au mieux la population de patients à risque de développer le TRALI, une autre option thérapeutique envisagée cible l'adhérence du neutrophile à la cellule endothéliale. Les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhérence : les sélectines. Il s'agit d'une famille de glycoprotéines qui assure l'adhérence des leucocytes à l'endothélium : stimulées par une inflammation locale (TNF α , LPS), les cellules endothéliales exposent leur sélectine-P puis leur sélectine-E à leurs ligands leucocytaires, Sialyl-Lewis^x. Il a été décrit que C1 Inhibiteur, glycoprotéine circulante à activité serpine, pouvait se lier aux sélectines des cellules endothéliales et contrarier l'adhésion de l'endothélium aux leucocytes (162). Si elle est validée expérimentalement, cette option thérapeutique pourrait constituer un traitement ayant pour objet la réduction de l'adhérence cellulaire et du déclenchement du processus

pathologique avec l'application de concentré de C1 Inhibiteur thérapeutique (Berinert®, Cynrise®).

Ces propositions ne peuvent être complètement établies que si on prend en compte l'ensemble des acteurs cellulaires. Dans ce contexte, il faudrait analyser l'interaction entre le neutrophile et la cellule endothéliale. L'étude du dialogue entre ces deux acteurs cellulaires peut être évaluée par l'analyse de la perméabilité des cellules endothéliales quand celles-ci se trouvent au contact des PMN activés par les anticorps anti-HLA. La perméabilité de la monocouche endothéliale peut être évaluée par la coupure de la Ve-cadhérine, protéine de liaison caractéristique des jonctions serrées endothéliales (166). En outre, au regard des données de la littérature, l'impact direct des anticorps anti-HLA dans l'activation de l'endothélium pulmonaire est suggérée, puisqu'une des cibles des anticorps anti-HLA est représentée sur les cellules endothéliales. Au laboratoire, nous utilisons une lignée de cellules endothéliales, les EA.hy926, issue de la fusion des cellules endothéliales primaires (HUVEC, human umbilical vein endothelial cell) avec des cellules d'adénocarcinome de poumon. L'expression des différents gènes et des protéines de la NADPH oxydase de cette lignée, respectivement par les méthodes de RT-PCR et de Western Blot est en cours d'analyse. L'étude de cette évaluation fait l'objet d'un travail rapporté dans ma Thèse de Sciences.

Ce travail valide l'impact des anticorps anti-HLA dans le développement du TRALI dont la survenue nécessite deux étapes séquentielles et indépendantes entre elles. L'implication des anticorps anti-HLA de classe II n'a pas été étudiée ici car leur cible antigénique n'est pas représentée sur les polynucléaires neutrophiles (115-117). Au cours de ce projet, nous nous sommes heurtés à quelques difficultés. La première a été la reproductibilité. En effet, chaque expérience a été réalisée sur des PMN purifiés à partir de donneurs différents. Le typage HLA est propre à chaque donneur mais d'autres facteurs non négligeables doivent être pris en compte. D'autre part, indépendamment de leur activation par des stimuli extérieurs, le comportement des neutrophiles est propre à chaque individu et ces paramètres inter-individuels ne sont pas maîtrisables. De plus, la manipulation des PMN humains est très délicate puisque ces cellules sont facilement pré-activées voire activées au cours de leur isolement. Ceci est d'ailleurs visible par le taux de production basal d'ions superoxyde qui varie d'une expérience à l'autre (comme sur l'exemple des Figures 24, 26).

La deuxième difficulté a été la détermination de la concentration exacte d'anticorps anti-HLA dans la fraction d'IgG purifiée. Le taux normal des immunoglobulines G totales chez l'homme varie de 7 à 15 g/L. A l'heure actuelle, nous n'avons pas à disposition de

méthode quantitative pour déterminer précisément la proportion de ces anticorps anti-HLA par rapport aux IgG totales. Certes, la méthode Luminex donne une bonne approche de la concentration mais elle reste encore une technique qualitative avec des données quantitatives. En pratique, la purification des IgG par chromatographie d'affinité sur protéine-A Sepharose permet d'extraire toutes les IgG des échantillons : les IgG anti-HLA, si elles sont présentes mais également les autres groupes d'IgG. A la suite de cette étude, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-HLA A2 (BB7.2, Santa Cruz) permettra d'étudier l'effet dose-réponse de ces anticorps sur les PMN pour évaluer le seuil limite de déclenchement du TRALI.

Au terme de cette étude, il apparaît que les anticorps anti-HLA de classe I présentent un impact fonctionnel spécifique vis-à-vis des neutrophiles dans l'étiopathogénie du TRALI. Cette étude préliminaire pose des bases stratégiques expérimentales avec un rationnel pour sa prévention et l'amélioration de la connaissance de ce syndrome dont le but est de réduire l'incidence du TRALI. Le neutrophile est une cellule essentielle de l'immunité innée. Elle possède des propriétés fonctionnelles opposées puisqu'elle aide à la fois dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes mais peut également engendrer de graves dommages tissulaires par le relargage non-contrôlé de dérivés réactifs de l'oxygène, les ROS.

Les hypothèses physiopathologiques citées tout au long de ce travail se sont appuyées sur plusieurs modèles expérimentaux, des tests sur volontaires sains à des modèles animaux en passant par des modèles *ex vivo* d'organes isolés ou *in vitro* de cellules vasculaires endothéliales humaines en culture. L'ensemble de ces modèles a apporté des informations précieuses. Cet ensemble de données est complétée par les résultats expérimentaux apportés dans ce travail de thèse et contribue à la compréhension des phénomènes physiopathologiques dans la survenue du TRALI.

THESE SOUTENUE PAR : KATHY KHOY

TITRE : Le produit sanguin labile, son impact immunologique dans l'œdème lésionnel pulmonaire TRALI.

CONCLUSION

Le TRALI, acronyme de «Transfusion-Related Acute Lung Injury» représente un syndrome de détresse respiratoire transfusionnel qui demeure l'une des premières causes de mortalité transfusionnelle. Il est défini par un œdème pulmonaire inflammatoire avec une lésion de la membrane alvéolaire, secondaire à l'activation des polynucléaires neutrophiles (PMN) au contact de l'endothélium pulmonaire. Actuellement, les mécanismes physiopathologiques précis conduisant au TRALI restent mal connus. Les données de la littérature suggèrent un mécanisme en deux étapes : la première, inhérente à une situation pathologique ou thérapeutique du patient transfusé est responsable d'une pré-stimulation intra-pulmonaire des PMN. La deuxième étape, dépendante de la transfusion elle-même, conduit à l'activation des PMN. De nombreux travaux ont cherché à définir le facteur déclenchant l'activation des PMN chez les patients à risque en suggérant le rôle-clé des anticorps anti-HLA, sans jamais clairement le démontrer. Dès lors, des mesures préventives ont été mises en œuvre en éliminant tous les produits sanguins susceptibles de présenter ces anticorps, diminuant fortement le nombre de produits disponibles à la transfusion. Cependant une meilleure compréhension sur le conflit immunitaire déterminant le TRALI est nécessaire pour améliorer la prévention des patients à risque mais aussi pour mieux définir les critères de sélection des produits sanguins labiles.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'implication des anticorps anti-HLA dans l'activation des PMN. Représentative de l'activité de la NADPH oxydase, la production de dérivés réactifs de l'oxygène, les ROS, est un bon moyen pour évaluer l'état d'activation des neutrophiles. Les résultats expérimentaux montrent qu'une pré-stimulation des PMN n'induit pas à elle seule l'activation de la NADPH oxydase mais que des anticorps anti-HLA entraînent une augmentation significative de la production de ROS par les PMN pré-stimulés. Ceci dans des conditions d'homologie des produits HLA des PMN avec l'anticorps. De plus, le niveau d'activité oxydase corrèle avec la quantité d'anticorps anti-HLA présente dans le milieu. En effet, il existe «un titre seuil» à partir duquel la production de ROS est significativement plus importante. On doit alors s'interroger sur un lien de cause à effet entre le niveau d'activation des PMN et la survenue du TRALI. Il est ensuite pertinent de définir le seuil d'anticorps de manière à éliminer les produits sanguins à risque et en même temps, satisfaire les besoins des patients transfusés. Enfin, un test fonctionnel fiable et rapide pour identifier la population de patients transfusés à risque est proposé.

Les anticorps anti-HLA sont impliqués dans le déterminisme du TRALI, permettant de développer des stratégies adaptées dans la prévention du TRALI.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 25/3/2004

LE DOYEN

Professeur Christophe Ribaud



LE PRESIDENT DE LA THESE

Dr Delphine ALDBERT



BIBLIOGRAPHIE

1. Barnard RD. Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *N Y State J Med.* 15 oct 1951;51(20):2399-2402
2. Popovsky MA, Abel MD, Moore SB. Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis.* juil 1985;128(1):185-189
3. Popovsky MA, Moore SB. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion.* nov-dec 1985;25(6):573-577
4. République française. Décision du 6 novembre 2006 définissant les principes de bonnes pratiques prévus à l'article L. 1223-3 du code de la santé publique. *JORF* n°261 du 10 novembre 2006. p.16925.
5. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (ANSM).(page consultée le 02/07/2014). Rapport d'activité hémovigilance 2012.Saint-Denis :ANSM;2014.[en ligne].
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/b893629101bd8fdb10d446fabf34768b.pdf
6. Code de la Santé Publique. Loi n° 93-5 du 4 janvier 1993, relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament. Paris : Dalloz, 1993. p.1412
7. République française. Arrêté du 12 janvier 2009 fixant les critères de sélection des donneurs de sang. *JORF* n°0015 du 18 janvier 2009. p.1067.
8. DISI de l'Université Paris Descartes (Paris-5). (page consultée le 10/09/14). Conseil scientifique des Concours de l'Internat de Pharmacie. [en ligne]. <http://www.cnci.uni-paris5.fr>.
9. Directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 établissant des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain, et des composants sanguins, et modifiant la directive 2001/83/CE. *JOCE*,2003, N°L30 :33-40.
10. Boulat C. Transfusion and sickle cell disease. *Transfus Clin Biol.* Mai 2013;20(2):68-71.
11. Crespin R, Danic B. La sélection médicale des candidats au don : représentations et pratiques du risque et de son traitement. *Transfus Clin Biol.* Juin 2013; 20(3) :261-284.
12. Code de la Santé Publique. Article D.1221-6. Modifié par Décret n°2013-104 du 29 janvier 2013 - art. 1.
13. Rebibo D, Hauser L, Slimani A, Herve P, Andreu G The French Haemovigilance System: organization and results for 2003. *Transfus Apher Sci.* oct 2004;31(2):145-153.
14. Alam A, Lin Y, Lima A, Hansen M, Callum JL. The prevention of transfusion-associated circulatory overload. *Transfus Med Rev.* avr 2013;27(2):105-112.
15. Wallis JP. Transfusion-related acute lung injury (TRALI)--under-diagnosed and under-reported. *Br J Anaesth.* mai 2003;90(5):573-657.
16. Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood.* 9 avr 2009;113(15):3406-3417.
17. US Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation & Research. Fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion: annual summary for fiscal year 2012. (page consultée le 28/09/2014). FDA ;2012. [en ligne]. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/ucm346639.htm#B>

18. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (ANSM). Rapport annuel Hémovigilance 2009. (page consultée le 02/07/2014). Saint-Denis : ANSM ; 2009. [en ligne].
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/0dd2cd67b2710f0ca2a1baff80d5e7ad.pdf.
19. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 12 août 1967;2(7511):319-323.
20. Toy P, Popovsky MA, Abraham E, Ambruso DR, Holness LG, Kopko PM, McFarland JG, Nathens AB, Silliman CC, Stroncek D; National Heart, Lung and Blood Institute Working Group on TRALI. Transfusion-related acute lung injury: definition and review *Crit Care Med*. avr 2005;33(4):721-726.
21. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. Report of the American-european consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus committee. *J Crit Care*. 1994 9(1):72-81.
22. 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.;4(12): 1774-1789.
23. Silliman CC. Transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev*. juil 1999;13(3):177-186.
24. Bux J, Sachs UJ. The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol*. mar 2007;136(6):788-799.
25. Bux J, Sachs UJ. The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol*. mar 2007;136(6):788-799.
26. Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, Elzi DJ, Tuder RM, Johnson JL, Ambruso DR. Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *J Clin Invest*. 1 avr 1998;101(7):1458-1467.
27. Kopko PM. Review: transfusion-related acute lung injury: pathophysiology, laboratory investigation, and donor management. *Immunohematology*. 2004;20(2):103-111.
28. Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO, Stronck DF, Popovsky MA, Caldwell SA, et al. The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion*. 1997;37:719-726.
29. Silliman CC. The two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Med*. mai 2006;34(5 Suppl):S124-S131.
30. Kopko PM, Marshall CS, MacKenzie MR, Holland PV, Popovsky MA. Transfusion-related acute lung injury: report of a clinical look-back investigation. *JAMA*. 17 avr 2002;287(15):1968-1971.
31. Van Buren NL, Stronck DF, Clay ME, McCullough J, Dalmasso AP. Transfusion-related acute lung injury caused by an NB2 granulocyte-specific antibody in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*. jan 1990;30(1):42-45.
32. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 15 mai 1997;89(10):3503-3521.
33. Goldsby, R., TJ, Kindt, BA Osborne, *Immunologie*. 4e ed. Paris: Dunod;2001
34. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 24 nov 2010;33(5):657-670.

35. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 7 sept 2007;7(9):678-689.
36. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. juil 2014;15(7):602-611.
37. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 15 janv 2007;176(2):231-241.
38. Buckle AM, Hogg N. The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol*. 1 oct 1989;143(7):2295-2301.
39. Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*. oct 2000;177:68-78.
40. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 19 mai 2014;24(10):453-462.
41. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. jan 2007;87(1):245-313.
42. Segal AW, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. 1978. *Nature* 276, 515-527
43. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. nov 1990;86(5):1729-1737.
44. Taylor WR, Jones DT, Segal AW. A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. *Protein Sci Publ Protein Soc*. oct 1993;2(10):1675-1685.
45. Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC. Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem*. 17 août 2001;276(33):31105-31112.
46. Meijles DN, Howlin BJ, Li J-M. Consensus in silico computational modelling of the p22phox subunit of the NADPH oxidase. *Comput Biol Chem*. août 2012;39:6-13.
47. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci US A*. sept 1989;86(18):7195-7199.
48. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. mai 2000;79(3):170-200.
49. El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidallo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med*. 30 avr 2009;41(4):217-225.
50. Dang PM-C, Raad H, Derkawi RA, Boussetta T, Paclet M-H, Belambri SA, et al. The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol*. 1 nov 2011;82(9):1145-1152.

51. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J.* 15 déc 1993;296(Pt 3):557-561.
52. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* 17 oct 1991;353(6345):668-670.
53. Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol.* juil 1983;97(1):52-61.
54. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* sep 1980;93(3):480-489.
55. Tauber, A.I., Brettler, D.B., Kennington, E.A., Blumberg, P.M. Relation of human neutrophil phorbol ester receptor occupancy and NADPH-oxidase activity. 1982. *Blood* 60, 333-339.
56. Cox, J.A., Jeng, A.Y., Sharkey, N.A., Blumberg, P.M., Tauber, A.I. Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. *J Clin Invest.* 1985;76:1932-1938.
57. Lapinet JA, Scapini P, Calzetti F, Pérez O, Cassatella MA. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun.* dec 2000;68(12):6917-6923.
58. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature.* 17 juil 1980;286(5770):264-265.
59. Zurier RB. Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res.* 1976;2:815-818.
60. Goldstein IM, Malmsten CL, Kindahl H, Kaplan HB, Rådmark O, Samuelsson B, Weissmann G. Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 1 sep 1978;148(3):787-792.
61. Popovsky MA. Pulmonary consequences of transfusion: TRALI and TACO. *Transfus Apher Sci.* juin 2006;34(3):243-244.
62. Renaudier P, Rebibo D, Waller C, Schlanger S, Vo Mai MP, Ounnoughene N, Breton P, Cheze S, Girard A, Hauser L, Legras JF, Saillol A, Willaert B, Caldani C. Pulmonary complications of transfusion (TACO-TRALI). *Transfus Clin Biol.* mai 2009;16(2):218-232.
63. Silliman CC. Transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev.* juil 1999 ;13(3):177-186.
64. Afssaps, Analyse descriptive des incidents transfusionnels: TRALI. *Bulletin Afssaps,* 2004(8): p. 6.
65. Popovsky MA. Transfusion-related acute lung injury. *Curr Opin Hematol.* Nov 2000 ;7(6):402-407.
66. Looney MR, Gropper MA, Matthay MA. Transfusion-related acute lung injury: a review. *Chest.* juil 2004;126(1):249-258.
67. Zallen G, Offner PJ, Moore EE, Blackwell J, Ciesla DJ, Gabriel J, Denny C, Silliman CC. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Am J Surg.* dec 1999;178(6):570-572.

68. Phipps RP, Kaufman J, Blumberg N. Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet*. 23 juin 2001;357(9273):2023-2024.
69. Transfusion de plasma thérapeutique: Produits, indications – Actualisation 2012 des recommandations. Paris : 2012. Commandité par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) en collaboration avec la Haute Autorité de Santé (HAS).
70. Popovsky MA. Transfusion and lung injury. *Transfus Clin Biol*. 2001 Jun;8(3):272-277.
71. Insunza A, Romon I, Gonzalez-Ponte ML, Hoyos A, Pastor JM, Iriando A, Hermosa V. Implementation of a strategy to prevent TRALI in a regional blood centre. *Transfus Med*. avr 2004;14(2):157-64.
72. Endres RO, Kleinman SH, Carrick DM, Steele WR, Wright DJ, Norris PJ, Triulzi D, Kakaiya R, Busch MP; National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II. Identification of specificities of antibodies against human leukocyte antigens in blood donors. *Transfusion*. août 2010;50(8):1749-1760.
73. Powers A, Stowell CP, Dzik WH, Saidman SL, Lee H, Makar RS. Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion*. déc 2008;48(12):2549-2558.
74. Brittingham TE, Chaplin H Jr. Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets. *J Am Med Assoc*. 19 oct 1957;165(7):819-825.
75. Dooren MC, Ouwehand WH, Verhoeven AJ, von dem Borne AE, Kuijpers RW. Adult respiratory distress syndrome after experimental intravenous gamma-globulin concentrate and monocyte-reactive IgG antibodies. *Lancet*. 14 nov 1998;352(9140):1601-1602.
76. Seeger W, Schneider U, Kreuzler B, von Witzleben E, Walmrath D, Grimminger F, Neppert J. Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood*. 1 oct 1990;76(7):1438-1444.
77. Betbèze V, Cottureau A, Bourreille G, Bignon JD, Masseur A, Muller JY, Hamidou M. Post-transfusion acute lung injury (Trali) after plasma infusion in a patient having a constitutional thrombotic microangiopathy. *Rev Med Interne*. juil 2007;28(7):498-500.
78. Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, Elzi DJ, Tuder RM, Johnson JL, Ambruso DR. Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *Clin Invest*. 1 avr 1998;101(7):1458-1467.
79. Wyman TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, Smith CW, England KM, Kelher M, Silliman CC. A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release. *Am J Physiol Cell Physiol*. dec 2002;283(6):1592-1603.
80. Lögdberg LE, Vikulina T, Zimring JC, Hillyer CD. Animal models of transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev*. jan 2009;23(1):13-24.
81. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, Bux J. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*. 1 fév 2006;107(3):1217-1219.
82. Silliman CC, Boshkov LK, Mehdizadehkashi Z, Elzi DJ, Dickey WO, Podlosky L, Kh G, Ambruso DR. Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood*. 15 jan 2003;101(2):454-462.
83. Ichinose Y, Hara N, Ohta M, Aso H, Chikama H, Kawasaki M, Kubota I, Shimizu T, Yagawa K Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide

- maintain the phenotype of and superoxide anion generation by neutrophils. *Infect Immun.* juin 1990;58(6):1647-1652.
84. Silliman CC, Kelher M. The role of endothelial activation in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion.* août 2005;45(2 Suppl):109S-116S.
 85. Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev.* avr 2003;83(2):309-336.
 86. Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care.* 2004 Dec;8(6):453-461.
 87. Lien DC, Henson PM, Capen RL, Henson JE, Hanson WL, Wagner WW Jr, Worthen GS. Neutrophil kinetics in the pulmonary microcirculation during acute inflammation. *Lab Invest.* août 1991;65(2):145-159.
 88. Daniels RH, Finnen MJ, Hill ME, Lackie JM. Recombinant human monocyte IL-8 primes NADPH-oxidase and phospholipase A2 activation in human neutrophils. *Immunology.* jan 1992;75(1):157-163.
 89. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB Jr. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med.* 1 déc 1984;160(6):1656-1671.
 90. Wyman TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, Smith CW, England KM, Kelher M, Silliman CC. A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release. *Am J Physiol Cell Physiol.* déc 2002;283(6):C1592-1603.
 91. Bux J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang.* juil 2005;89(1):1-10.
 92. Bux J, Becker F, Seeger W, Kilpatrick D, Chapman J, Waters A. Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br J Haematol.* juin 1996;93(3):707-713.
 93. Nordhagen R, Conradi M, Drömtorp SM. Pulmonary reaction associated with transfusion of plasma containing anti-5b. *Vox Sang.* 1986;51(2):102-107.
 94. Leach M, Vora AJ, Jones DA, Lucas G. 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.* déc1998;8(4):333-7.
 95. Brent L. A history of transplantation immunology. San Diego: Academic Press. 1997
 96. Dausset J. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol.* juil-oct 1958;20(1-4):156-166.
 97. Silvestri G. Memories of Jean Dausset. A pioneering scientist in medical ethics. *Blood Transfus.* avr 2010;8(2):130-1.
 98. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 7 sep 2000;343(10):702-9.
 99. Revillard JP. *Immunologie.* 4e ed. Bruxelles : DeBoeck;2001
 100. Kissmeyer-Nielsen F, Svejgaard A, Hauge M. Genetics of the human HLA transplantation system. *Nature.* 14 sep 1968;219(5159):1116-9.
 101. Marsh SG. Nomenclature for factors of the HLA system, update May 2014. *Tissue Antigens.* sep 2014;84(3):335-341.
 102. Carroll MC, Campbell RD, Bentley DR, Porter RR. A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature.* 19-25 jan 1984;307(5948):237-41.

103. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 8-14 oct 1987;329(6139):506-512.
104. Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:587-622.
105. Reinherz EL, Tan K, Tang L, Kern P, Liu J, Xiong Y, Hussey RE, Smolyar A, Hare B, Zhang R, Joachimiak A, Chang HC, Wagner G, Wang J. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science*. 3 déc 1999;286(5446):1913-21.
106. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation*. mar 1992;53(3):550-555.
107. Saw CL, Hannach B, Petrazsko T, Nickerson P. Blood donors implicated in transfusion-related acute lung injury with patient-specific HLA antibodies are more broadly sensitized to HLA antigens compared to other blood donors. *Transfusion*. mar 2013;53(3):518-525.
108. Payne R. The development and persistence of leukoagglutinins in parous women. *Blood*. avr 1962;19:411-424.
109. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, Glynn SA, Hillyer CD, Carey P, Gottschall JL, Murphy EL, Rios JA, Ness PM, Wright DJ, Carrick D, Schreiber GB. 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*. sep 2009;49(9):1825-1835.
110. Masson E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I, Rietmulher D, Pouthier F, Mongaillard G, Chabod J, Ferrand C, Tiberghien P, Rebibou JM. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum Immunol*. août 2013;74(8):946-951.
111. Bian H, Reed EF. Alloantibody-mediated class I signal transduction in endothelial cells and smooth muscle cells: enhancement by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 15 juil 1999;163(2):1010-1018.
112. Ward PA. Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. *Ann N Y Acad Sci*. 31 oct 1996;796:104-112.
113. Looney MR, Matthay MA. Animal models of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Med*. mai 2006;34(5 Suppl):S132-136.
114. Looney MR, Su X, Van Ziffle JA, Lowell CA, Matthay MA. Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*. juin 2006;116(6):1615-1623.
115. Kopko PM, Popovsky MA, MacKenzie MR, Paglieroni TG, Muto KN, Holland PV. HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*. oct 2001;41(10):1244-1248.
116. Varela M, Mas A, Nogués N, Escorsell A, Mazzara R, Lozano M. TRALI associated with HLA class II antibodies. *Transfusion*. août 2002;42(8):1102.
117. Sachs UJ, Wasel W, Bayat B, Bohle RM, Hattar K, Berghöfer H, Reil A, Bux J, Bein G, Santoso S, Weissmann N. Mechanism of transfusion-related acute lung injury induced by HLA class II antibodies. *Blood*. 13 jan 2011;117(2):669-677.
118. Kopko PM, Paglieroni TG, Popovsky MA, Muto KN, MacKenzie MR, Holland PV. TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion*. fév 2003;43(2):177-184.

119. Sakagawa H, Miyazaki T, Fujihara M, Sato S, Yamaguchi M, Fukai K, Morioka M, Kato T, Azuma H, Ikeda H. Generation of inflammatory cytokines and chemokines from peripheral blood mononuclear cells by HLA Class II antibody-containing plasma unit that was associated with severe nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*. jan 2007; 47(1):154-161.
120. Kao GS, Wood IG, Dorfman DM, Milford EL, Benjamin RJ. Investigations into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI. *Transfusion*. fév 2003;43(2):185-191.
121. Chu HT, Lin H, Tsao TT, Chang CF, Hsiao WW, Yeh TJ, Chang CM, Liu YW, Wang TY, Yang KC, Chen TJ, Chen JC, Chen KC, Kao CY. Genotyping of human neutrophil antigens (HNA) from whole genome sequencing data. *BMC Med Genomics*. sep 2013;12(6):31-39.
122. Seeger W, Schneider U, Kreuzler B, von Witzleben E, Walmrath D, Grimminger F, Neppert J. Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood*. 1 oct 1990;76(7):1438-1444.
123. Kelher MR, Masuno T, Moore EE, Damle S, Meng X, Song Y, Liang X, Niedzinski J, Geier SS, Khan SY, Gamboni-Robertson F, Silliman CC. 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*. 26 fév 2009;113(9):2079-2087.
124. Kopko PM. Leukocyte antibodies and biologically active mediators in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury. *Curr Hematol Rep*. nov 2004;3(6):456-461.
125. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, Bux J. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*. 1 fév 2006;107(3):1217-1219.
126. Silliman CC, McLaughlin NJ. Transfusion-related acute lung injury. *Blood Rev*. mai 2006;20(3):139-159.
127. Silliman CC, Clay KL, Thurman GW, Johnson CA, Ambruso DR. Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase. *J Lab Clin Med*. nov 1994;124(5):684-694.
128. Zallen G, Offner PJ, Moore EE, Blackwell J, Ciesla DJ, Gabriel J, Denny C, Silliman CC. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Am J Surg*. déc 1999;178(6):570-572.
129. Silliman CC, Bjornsen AJ, Wyman TH, Kelher M, Allard J, Bieber S, Voelkel NF. Plasma and lipids from stored platelets cause acute lung injury in an animal model. *Transfusion*. mai 2003;43(5):633-640.
130. Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, Elzi DJ, Tuder RM, Johnson JL, Ambruso DR. Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *J Clin Invest*. 1 avr 1998;101(7):1458-1467.
131. Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, Gettings KF, McLaughlin NJ, Silliman CC. 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*. 1 oct 2006;108(7):2455-2462.
132. Wolf CF, Canale VC. Fatal pulmonary hypersensitivity reaction to HL-A incompatible blood transfusion:report of a case and review of the literature. *Transfusion*. mar-avr 1976;16(2):135-140.
133. Silliman CC, Curtis BR, Kopko PM, Khan SY, Kelher MR, Schuller RM, Sannoh B, Ambruso DR. 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*. 15 fév. 2007;109(4):1752-1755.
134. Sheppard CA, Lögdberg LE, Zimring JC, Hillyer CD. Transfusion-related acute lung injury. *Hematol Oncol Clin North Am*. fév. 2007;21(1):163-176.
135. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:97.
136. Terasaki pi, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*. 5 déc 1964;204:998-1000.
137. Van Leeuwen A, Winchester RJ, van Rood JJ. Serotyping for MLC. II. Technical aspects. *Ann N Y Acad Sci*. 30 juin 1975;254:289-295.
138. Hopkins K.A. The basic lymphocyte microcytotoxicity tests: standard and AHG enhancement. 4e ed. Lenexa: ASHI Laboratory Manual; 2001.
139. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. mai 1992;39(5):225-235.
140. Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA. Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum Immunol*. mar 1991;30(3):190-201.
141. ASSIM (Association des collègues des enseignants d'immunologie des universités de langue française). Méthodes en immunologie. Des principes à la bonne application. Issy-les-moulineaux : Elsevier Masson. 2014.
142. Erlich HA, Opelz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity*. Avr 2001;14(4):347-356.
143. The Allele Frequency Net Database. (page consultée le 01/07/14). Allele frequencies in worldwide populations. [en ligne]. www.allelefrequencies.net/
144. Cerny A, McHutchison JG, Pasquinelli C, Brown ME, Brothers MA, Grabscheid B, Fowler P, Houghton M, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA A2.1 binding motif. *J Clin Invest*. fév 1995 ;95(2):521-530.
145. Raess M, Fröhlich G, Roos M, Rüsi B, Wilhelm MJ, Noll G, Ruschitzka F, Fehr T, Enseleit F. Donor-specific anti-HLA antibodies detected by Luminex: predictive for short-term but not long-term survival after heart transplantation. *Transpl Int*. nov 2013;26(11):1097-1107.
146. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7 mai 1976;72, 248-254.
147. Laemmli UK, Favre MJ. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *Mol Biol*. 15 nov 1973;80(4):575-599.
148. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods*. 17 déc 1999;232(1-2):3-14.
149. Rinaldi M, Moroni P, Paape MJ, Bannerman DD. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunol Immunopathol*. 15 jan 2007;115(1-2):107-125.
150. Bionda C, Li XJ, van Bruggen R, Eppink M, Roos D, Morel F, Stasia MJ Functional analysis of two-amino acid substitutions in gp91 phox in a patient with X-linked flavocytochrome b558-positive chronic granulomatous disease by means of transgenic PLB-985 cells. *Hum Genet*. oct 2004;115(5):418-427.

151. Ronot X, Grunwald D, Mayol JF, Boutonnat J. La cytométrie en Flux. Editions : Tec & Doc – Lavoisier. Paris ;2010.
152. Aida Y, Pabst MJ. Priming of neutrophils by lipopolysaccharide for enhanced release of superoxide. Requirement for plasma but not for tumor necrosis factor- α . *J Immunol.* 1 nov 1990;145(9):3017-3025.
153. Bathe M, Shirai A, Doerschuk CM, Kamm RD. Neutrophil transit times through pulmonary capillaries: the effects of capillary geometry and fMLP-stimulation. *Biophys J.* oct 2002;83(4):1917-1933.
154. Pazhanisamy SK, Li H, Wang Y, Batinic-Haberle I, Zhou D. NADPH oxidase inhibition attenuates total body irradiation-induced haematopoietic genomic instability. *Mutagenesis.* mai 2011;26(3):431-435.
155. Boudot O. Transfusion sanguine une grande aventure humaine. Paris : Mémoires d'Hommes, Histoires d'Entreprises, 2009, 175p.
156. Hashimoto S, Nakajima F, Kamada H, Kawamura K, Satake M, Tadokoro K, Okazaki H. Relationship of donor HLA antibody strength to the development of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion.* déc 2010;50(12):2582-2591.
157. Silliman CC, Bercovitz RS, Khan SY, Kelher MR, LaSarre M, Land KJ, Sowemimo-Coker S. Antibodies to the HLA-A2 antigen prime neutrophils and serve as the second event in an in vitro model of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang.* juil 2014;107(1):76-82.
158. Creamer P, Edmonds J, Sullivan J, Matthews S. Measurement of HLA class I expression in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* oct 1992;51(10):1138-1142.
159. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* déc 2013;17(4):1185-1197.
160. Freitas M, Lima JLFC, Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils'oxidative burst. A review. *Analytica Chimica Acta.* 4 juil 2009;649:8-23.
161. Champion Y, Paclet MH, Jesaitis AJ, Marques B, Grichine A, Berthier S, Lenormand JL, Lardy B, Stasia MJ, Morel F. New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody. *Biochimie.* sep 2007;89(9):1145-1158.
162. Cai S, Davis AE 3rd. Complement Regulatory Protein C1 Inhibitor Binds to Selectins and Interferes with Endothelial-Leukocyte Adhesion. *J Immunology.* 1 nov 2003;171(9):4786-4791.
163. Strait RT, Hicks W, Barasa N, Mahler A, Khodoun M, Köhl 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 Nov 21;208(12):2525-2544.
164. Chapman CE, Stainsby D, Jones H, Love E, Massey E, Win N, Navarrete C, Lucas G, Soni N, Morgan C, Choo L, Cohen H, Williamson LM; Serious Hazards of Transfusion Steering Group. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion.* mar 2009;49(3):440-452;
165. Keller-Stanislawski B, Reil A, Günay S, Funk MB. Frequency and severity of transfusion-related acute lung injury-German haemovigilance data (2006-2007). *Vox Sang.* jan 2010;98(1):70-77.

166. Nwariaku FE, Liu Z, Zhu X, Nahari D, Ingle C, Wu RF, Gu F, Sarosi G, Tera LS. NADPH oxidase mediates vascular endothelial cadherin phosphorylation and endothelial dysfunction. *Blood*. 22 juil 2004;104(10):3214-3220.



Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

S'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.

