

**Université des Sciences et Technologies de Lille 1
Université « Alexandru Ioan Cuza » de Iași**

THESE en CO-TUTELLE

présentée par

Laura-Maria OPREA-MITROFAN

pour l'obtention du grade de

Docteur des Universités de Lille 1 et de Iași

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**Recherches de nouveaux marqueurs de mort programmée (apoptose)
dans les membranes des hématies humaines sénescents. Impact en
transfusion sanguine.**

Thèse dirigée par les Professeurs Vlad ARTENIE et Jean MONTREUIL

Soutenue le 27 novembre 2006 devant la Commission d'Examen :

Président :

Pr. Ioan MOGLAN (Iași)

Rapporteurs :

Pr. Luminița JERCA (Iași)

Pr. Jérôme ESTAQUIER (Paris)

Examineurs :

Pr. Vlad ARTENIE (Iași)

Pr. Jacques AUBRY (Nantes)

Pr. Dumitru COJOCARU (Iași)

Prof. Nastasia GHEORGHITĂ (Iași)

Pr. Emér. Jean MONTREUIL (Villeneuve d'Ascq)

Dr. Jacques PORTOUKALIAN (Lyon)

Ce travail a été réalisé sous la co-direction du Professeur Vlad Artenie (Laboratoire de Biochimie de l'Université « Al. I. Cuza » de Iași, Roumanie) et du Professeur Emérite Jean Montreuil (Laboratoire des Signaux Membranaires et de l'Apoptose de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1, Unité Mixte de Recherche USTL/CNRS n° 8576, Directeur : Dr. Jean-Claude Michalski).

Il a bénéficié d'une bourse de DEA SOCRATES-ERASMUS de la Communauté Européenne, puis d'une bourse de thèse CIFRE co-financée par l'Agence Nationale de la Recherche Technique (ANRT) et par la Société Pharmaceutique MacoPharma de Tourcoing. A tous ces organismes nous adressons nos vifs remerciements et exprimons notre profonde reconnaissance.

A mes parents et mes grands-parents

A Vicențiu, mon grand amour

A mon frère, Laurențiu

Avec toute ma reconnaissance

Merci pour votre soutien sans faille et vos encouragements. Je vous adore...

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance aux membres du Jury qui ont trouvé le temps d'examiner et de juger ce mémoire malgré leurs lourdes charges.

Je voudrais remercier sincèrement M. Jean-Claude Michalski, le Directeur de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR USTL/CNRS n°8576) pour m'avoir accueillie dans son Institut où j'ai pu découvrir les mystères et les satisfactions de la recherche et pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers Monsieur le Professeur Emérite Jean Montreuil pour m'avoir offert la chance de travailler dans son laboratoire, pour m'avoir aidée à faire mes premiers pas dans la recherche et pour m'avoir guidée avec son extraordinaire pédagogie. Merci beaucoup pour tous vos conseils scientifiques, votre grande disponibilité et surtout pour les nombreuses discussions et vos encouragements constants.

Mes vifs remerciements vont au Professeur Vlad Artenie pour avoir accepté de diriger ce travail, pour les précieux conseils scientifique qu'il m'a constamment prodigués et pour m'avoir accueillie au sein de son groupe.

Mes remerciements sincères vont à mes professeurs de l'Université "Al. I. Cuza" de Iasi de la Faculté de Chimie pour avoir conduit mes premiers pas dans le monde universitaire. Une pensée très spéciale à mon Professeur Harry Ofenberg qui est parti beaucoup trop tôt de ce monde. Vous étiez et vous serez toujours mon exemple.

Les résultats que j'ai obtenus sont le fruit d'un travail d'équipe et ma reconnaissance va vers le Docteur Daniela Bratosin pour tout ce qu'elle m'a appris sur la cytofluorimétrie en flux.

Ce travail a bénéficié d'une bourse CIFRE co-financée par l'Agence Nationale de la Recherche Technique (ANRT) et par la Société Pharmaceutique MacoPharma de Tourcoing. A ces organismes nous adressons nos vifs remerciements et exprimons notre profonde reconnaissance, en particulier à Monsieur Francis Goudaliez.

Un grand merci à Geo pour tous les conseils qu'on s'est donnés, pour qu'on se soit aidées et soutenues tout au long de cette expérience inoubliable.

Un grand merci encore à mes copines roumaines ou à ceux « devenus roumains par adoption », Fadoua, Doina, Vio, Tatiana, Gérard, Manu, pour leur sourire de chaque jour et leurs encouragements. Grâce à vous, ma vie a été beaucoup plus belle. Fadoua tu m'as ensoleillé la vie au labo et je suis très heureuse de t'avoir connue, je me souviens avec plaisir de nos « manip révolutionnaires ». Je vous remercie de tout mon coeur, Doina et Gérard pour votre amitié et « vos leçons de culture générale ».

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur Jean-Jacques Huart, Directeur du Centre Régional de Transfusion Sanguine, et à ses collaborateurs, pour l'amabilité avec laquelle ils m'ont fourni avec une exceptionnelle promptitude le sang nécessaire à nos travaux.

Mes remerciements les plus sincères vont à tous ceux qui m'ont aidée dans mes manipulations : le Professeur Christian Slomiany pour la microscopie en général et pour ses conseils précieux, à Marie-Cristine Slomiany pour sa disponibilité, en particulière pour les analyses MALDI TOF, les astuces dans les analyses de protéomique et en même temps pour les discussions professionnelles et humaines que j'ai beaucoup appréciées – j'aurais aimé travailler d'avantage avec vous, au Pr. Henry Debray pour ses conseils dans l'utilisation des lectines, au Pr. René Cacan qui m'a conseillé dans les problèmes d'enzymologie que je rencontrais, à Marlène et à Jacqueline qui ont été toujours disponibles pour nous sortir d'embarras avec les souris, le Professeur Jérôme Lemoine et le Dr. Olivia Dekeyser qui m'ont initiée aux techniques de la protéomique, solubilisation des protéines membranaires et électrophorèse bidimensionnelle, en particulier.

Sans oublier les outils incontournables de l'analyse microscopique: microscopie électronique de balayage avec Monsieur Jean-Pierre Tissier de la Station Régionale de l'INRA à Villeneuve d'Ascq. Un grand merci.

Un grand merci au Dr. Joël Mazurier et au Dr. Elisabeth Ellass pour leurs conseils scientifiques et techniques et aussi pour m'avoir fourni des cellules THP1, à tout le groupe qui m'a ouvert les portes de leur laboratoire.

Je voudrais enfin remercier l'équipe du 207 de m'avoir permis de venir toutes les jours dans leur labo, pour leurs conseils et encouragements.

Un grand merci à toutes les personnes de la maison qui, avec leur "Bonjour" de chaque matin et avec leur hospitalité, ont été pendant mon séjour en France, ma deuxième famille.

Monsieur le Recteur de l'Université "Al. I. Cuza" de Iasi, le Professeur Dumitru Oprea, à Monsieur le Doyen de la Faculté de Biologie, le Professeur Ioan Bîra, à Monsieur le Doyen de la Faculté de Chimie Alexandru Ceal et aux Professeurs de l'Université des Sciences et Technologies de Lille pour les enseignements précieux qu'ils m'ont dispensés.

ABREVIATIONS

2,3-DPG	2,3- bisphosphoglycérate
4-MU	4-méthylumbelliféron
ACD	Acid Citrate Dextrose
AGE	Advanced Glycation End Products
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AM	Acétoxy méthylester
ANT	adenine nucleotide translocase
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor 1
APLT	aminophospholipid translocase
AQP1	Aquaporin 1
ATM	Télangiectasie
ATP	adénosine triphosphate
BAGPM	bicarbonate-adénine-glucose-phosphate-mannitol
BAGPM	bicarbonate-adénine-glucose-phosphate-mannitol
Bax,	Bcl-2 associated X protein
Bcl ₂	B-cell lymphoma 2
Bcl-X _L	longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development
Bad	Bcl-X _L /bcl-2 associated death promoter homolog
BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5,6 carboxyfluorescéine acétoxyméthyl ester
CAII	l'anhydrase carbonique II
CARD	caspase recruitment domain
CD95/Fas/Apo-1	Fibroblast associated (récepteur)
CK	créatine kinase
CPD	Citrate Phosphate Dextrose
CrmA	cytokine response modifier A
CyD	cyclophiline D
DBA	<i>Dolichol biflorus</i> agglutinin
DCF	2',7'-dichlorofluorescéine
DCFH ₂	2'-7'-dichlorodihydrofluorescéine
DCFH-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescéine
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EAS	Experimental Additive Solution
EAS 61 et 64	Experimental additive solution
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i> agglutinin
ECM	Extra cellular matrice
ECO	Enzymatically converted groupe O
EDTA	Ethylendiaminotetraacetic acide
F ADD	Fas Associated Death Domain

Fas-L	Fas ligand
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLICE	Caspase-8
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
G3PD	glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GAPD	glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase
GPA	Glycophorin A
GPB	Glycophorine B
GPI	Glycosylphosphoinositide
Hb	Hémoglobine
HbA1c	Hb glyquée
HK	Hexokinase
HPA	<i>Helix pomatia</i> agglutinin
HPLC	Height Performance Liquid Chromatography
IAP(CD 47)	Integrin-associated membrane protein
ICAD	Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
IL-10	Interleukine 10
IM	inner membrane
IR	Irradiation infrarouge
LDL	low density lipoproteine
LW	Antigène Landsteiner/Wiener
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MMP	perméabilisation de la membrane mitochondriale
MRP	multidrug resistance protein
MUF	4-méthylumbelliféryl β -D-galactoside
NAC	N-acétylcystéine
NK	Natural Killer
OM	outer membrane
PAF	Platelet Activating Factor
PAK2	p21 Activated Kinase-2
PARP	Poly-ADP-ribose polymérase
PBR	peripheral benzodiazepin receptor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCD	mort cellulaire programmée
PE	Phycoérythrine
PEG	poly(éthylène-glycol)
PGE2	prostaglandine 2
PGK	l'acide phosphoglycérique
pHi	pH intracellulaire
PIPLC	phosphoinositide-specific phospholipase C
PML	promyelocytic leukemia protein
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PT	Permeability Transition
PTPC	Permeability Transition Pore Complex
PVC	chlorure polyvinylique

RAGE	Receptor of Advanced Glycation End Products
RCA ₁₂₀	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
Rh	Antigène Rhésus
ROS	Reactive Oxygen Species
SA	antigènes de sénescence
SAGM	solution saline d'adénine–glucose–mannitol
SA-β-Gal	Senescence Associated β-Galactosidase
SCA	antigène cellulaire de sénescence
SFG	senescent factor glycopeptide
SHPS-1	SH2-domain bearing protein tyrosine phosphatase (SHP) substrate-1
SIMPs	protéines solubles inter-membranaires
SIRP	Transmembrane signal regulatory protein
Smac/Diablo	Second Mitochondrial Activator of Caspases /Direct Binding Protein with Low pI
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
TGF-β	Tumor Growth Factor β
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis Factor
TOR	Target of Rapamycin
VDAC	Voltage – Dépendent Anion Channel
WGA	<i>Wheat germ</i> agglutinin
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside
ΔΨ _m	potentiel mitochondrial de la membrane interne

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE PREMIER : GÉNÉRALITÉS	8
I - LA TRANSFUSION, PASSÉ, PRÉSENT ET FUTUR	9
1. Historique	10
1.1. Les milieux de prélèvement et de conservation	10
1.2. Les plastiques	12
1.3. Les pathogènes	12
2. Perspectives nouvelles	12
2.1. Les collecteurs automatique de sang total.	12
2.2. Production d'hématies à partir de cellules souches hématopoïétiques	13
2.3. Modification de la membrane érythrocytaire vers un groupe O universel	14
2.3.1. <i>Le groupe O universel</i>	14
2.3.2. <i>Immunocamouflage</i>	14
2.3.3. <i>Modifications de l'hémoglobine</i>	15
2.3.3.1. <i>Hémoglobine «cross-linked »</i>	15
2.3.3.2. <i>Hémoglobine humaine polymérisée</i>	15
2.3.3.3. <i>Hémoglobine bovine polymérisée</i>	15
2.3.3.4. <i>Hémoglobine modifiée avec des macromolécules</i>	15
II. ULTRASTRUCTURE DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE	16
1. Les lipides	16
1.1. Les phospholipides	17
1.2. Le cholestérol	18
1.3. Les glycolipides	18
2. Protéines	21
2.1. Les protéines intégrées	21
2.1.1. <i>Les glycophorines</i>	22
2.1.2. <i>La bande 3</i>	25
2.1.3. <i>La bande 4.5</i>	28
2.2. Protéines périphériques du cytosquelette	28
2.2.1. <i>La spectrine</i>	29
2.2.2. <i>L'actine</i>	29
2.2.3. <i>L'ankyrine</i>	29
III. LA MORT PROGRAMMEE DES HEMATIES MARQUE LA FIN D'UN PHENOMENE APOPTOTIQUE	30
1. Différents types de mort cellulaire	30
2. Caractéristiques des cellules apoptotiques	34
3. Voies de déroulement de l'apoptose	35
3.1. Voie des récepteurs de mort	35
3.1.1. <i>La voie du Fas/APO-1/CD95</i>	35
3.1.2. <i>La voie du "Tumor Necrosis Factor"(TNF)</i>	36
3.1.3. <i>La voie ATM/p53c</i>	38
3.2. Voie mitochondriale de l'apoptose	39
3.3. La voie lysosomale	42
4. Molécules impliquées dans l'apoptose	43
4.1. Les caspases	43
4.2. Le gène p53	43
4.3. La famille des protéines Bcl-2	44

5. La mort programmée des hématies marque-t-il la fin d'un phénomène apoptotique ?	46
5.1. Diminution progressive de la taille par émission de vésicules/modifications morphologiques de l'hématie	46
5.2. Altération du cytosquelette	47
5.3. Désialylation et capture des hématies par les macrophages	47
5.4. Perte de l'asymétrie de la double couche de lipides et externalisation de la phosphatidylsérine	48
5.5. Activation des caspases -3 et -8	49
5.6. Activation de la calpaïne	49
5.7. Phagocytose par les macrophages	50
5.7.1. <i>Élimination des corps apoptotiques</i>	50
5.7.2. <i>Reconnaissance du globule rouge sénescant par le macrophage</i>	51
5.7.2.1. <i>Récepteurs de la phosphatidylsérine</i>	52
5.7.2.2. <i>Reconnaissance des antigènes de sénescence</i>	53
5.7.2.3. <i>Le complément et la phagocytose des hématies</i>	54
5.7.2.4. <i>CD47 et SHPS-1</i>	54
5.7.2.5. <i>La glycation des protéines</i>	55
5.7.2.6. <i>Reconnaissance de type lectinique entre les hématies apoptotiques et les phagocytes</i>	57
5.7.2.7. <i>Rôle des anticorps dans l'érythrophagocytose</i>	57
5.8. Les hématies humaines meurent-elles d'apoptose ?	59
IV. LES GLYCOSIDASES ERYTHROCYTAIRES	61
1. Répartition des glycosidases dans la membrane érythrocytaire	61
2. Les glycohydrolases et le vieillissement cellulaire	65
CHAPITRE SECOND : TRAVAUX PERSONNELS	69
I - MATERIEL ET METHODES D'APPLICATION GÉNÉRALE	70
1. Préparation du « biomatériel »	70
1.1. Préparation de la population totale des hématies	70
1.2. Préparation des membranes érythrocytaires et du cytosol	70
1.3. Isolement des hématies sénescantes, seules phagocytées par les macrophages	71
1.4. Fixation des hématies	73
2. Méthodes analytiques	74
2.1. Méthodes cytométriques	74
2.1.1. <i>Étude des modifications morphologiques des hématies par dot-plots FSC/SSC bi- et tridimensionnels</i>	74
2.1.2. <i>Mesure par cytofluorimétrie de l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) : test à l'Annexine-V-FITC</i>	74
2.1.3. <i>Analyse par cytofluorimétrie en flux des modifications des structures glycaniques : test des lectines-FITC</i>	75
2.1.4. <i>Dosage cytométrique des radicaux libres (« Reactive Oxygen Species » ou ROS)</i>	76
2.1.5. <i>Test de viabilité cellulaire. Test à la calcéine-AM</i>	78
2.1.5.1. <i>Influence du temps d'incubation sur le marquage par la calcéine-AM</i>	81
2.1.5.2. <i>Le test de la calcéine-AM est spécifique de l'activité estérasiques du cytosol des hématies</i>	81
2.1.5.3. <i>Le test à la calcéine-AM est un marqueur de l'intégrité membranaire</i>	83
2.1.5.4. <i>La calcéine-AM est un marqueur de l'apoptose des hématies</i>	84

<i>humaines induite par les ions Ca²⁺</i>	
2.1.5.5. <i>Le test à la calcéine-AM est un marqueur du vieillissement des hématies</i>	86
2.1.6. Mesure de l'érythrophagocytose	88
2.1.6.1. <i>Principe</i>	88
2.1.6.2. <i>Mode opératoire</i>	88
2.1.7. Détermination du pH intracellulaire	90
2.1.8. Recherche de signaux d'antiphagocytose. "Test CD 47"	92
2.2. Méthodes biochimiques	92
2.2.1. Dosage de l'ATP	93
2.2.2. Dosage de l'hémoglobine	93
II- TRAVAUX DE RECHERCHE FONDAMENTALE	95
L'ACTIVITE DE LA β-D-GALACTOSIDASE EST-ELLE UN MARQUEUR UNIVERSEL DE SENESCENCE ?	
Introduction	95
Matériel et méthodes	98
1. Préparation du matériel biologique	98
1.1. Induction de la sénescence accélérée des hématies	98
1.1.1. <i>Incubation en milieu HEPES dépourvu de Ca²⁺</i>	98
1.1.2. <i>Incubation en milieu HEPES calcique</i>	98
1.1.3. <i>En présence de l'ionophore calcique A 23187</i>	99
1.1.4. <i>Incubation en présence de céramides.</i>	99
1.1.5. <i>Incubation en présence de peroxyde d'hydrogène</i>	99
1.1.6. <i>Vieillessement induit par incubation des hématies dans le plasma</i>	100
1.2. Désialylation "in vitro" des hématies	100
2. Méthodologies biochimiques	100
2.1. Dosage des protéines membranaires	100
2.2. Mesure de l'activité β-galactosidasique	101
2.2.1. <i>Méthode fluorimétrique de dosage de l'activité β-galactosidasique</i>	101
2.2.2. <i>Méthode cytochimique</i>	102
3. Résultats	103
3.1. Mise au point de la méthode fluorimétrique de mesure	103
3.2. Détermination du pH optimal de l'enzyme	104
3.3. Effet de la concentration en protéines membranaires des milieux d'incubation	105
3.4. Sénescence érythrocytaire et activité β-galactosidasique	106
3.4.1. <i>Variations au cours du vieillissement physiologique</i>	106
3.4.2. <i>Variation de l'activité de la β-galactosidase au cours du vieillissement induit par les ions Ca²⁺</i>	109
3.4.2.1. <i>Effet du calcium et du calcium associé à un ionophore</i>	109
3.4.2.2. <i>Céramides et β-galactosidase</i>	112
3.4.2.3. <i>Peroxyde d'hydrogène et β-galactosidase</i>	113
3.4.2.4. <i>Vieillessement induit par incubation des hématies dans le plasma et β-galactosidase</i>	114
4. Conclusions	
III- TRAVAUX DE RECHERCHES APPLIQUES. RECHERCHES DANS LE DOMAINE DE LA TRANSFUSION SANGUINE	117
I – RECHERCHE DES « STORAGE LESIONS » DES HEMATIES DESTINEES A LA TRANSFUSION	117
I.A. Préparation des poches de conservation des hématies	117
I.B. Etude de la viabilité des hématies	118

I.B.1. Préparation du biomatériau	118
I.B.2. Application de critères de viabilité classiques	118
<i>I.B.2.1. Test ATP</i>	118
<i>I.B.2.2. Mesure de l'hémolyse</i>	121
I.B.3. Application des nouveaux critères de viabilité	122
<i>I.B.3.1. Test de viabilité à la calcéine-AM</i>	122
<i>I.B.3.2. Recherche des radicaux superoxydes ROS</i>	122
<i>I.B.3.3. Détermination du récepteur CD 47 d'antiphagocytose</i>	123
<i>I.B.3.4. Test à l'annexine-V-FITC d'externalisation de la phosphatidyl sérine</i>	123
<i>I.B.3.5. Test « lectines » de désialylation</i>	124
<i>I.B.3.6. « Test PKH 26 » de capture et de phagocytose des hématies</i>	125
<i>I.B.3.7. Critères morphologiques. La solution de l'énigme.</i>	127
I.C. Conclusions	128
II – RECHERCHES SUR L'AMELIORATION DES MILIEUX DE PRELEVEMENT ET DE CONSERVATION DES HEMATIES	130
II.A. Tentatives d'amélioration des milieux de conservation	130
II.B. Amélioration des conditions de prélèvement des hématies : le prélèvement assisté par l'Automate MacoPharma ABC®	131
II.B.1. Simulation à l'échelle du laboratoire du « prélèvement assisté »	132
II.B.1.1. Variations de la morphologie des hématies	135
<i>II. B.1.1.1. Méthode cytométrique du dot-plot FSC/SSC</i>	135
<i>II. B.1.1.2. Microscopie de balayage</i>	135
II.B.1.2. Externalisation de la phosphatidylsérine (Test à l'annexine-V-FITC)	137
II.B.1.3. Test CD 47 d'antiphagocytose	137
II.B.2. Etude comparée de la viabilité d'hématies prélevées en milieu CPD par le "procédé classique" et par "ponction assistée" à l'aide de l'automate ABC, puis conservées en milieu SAGM	138
II.B.2.1. Techniques de prélèvement	139
II.B.2.2. Résultats	139
<i>II.B.2.2.1. Variation du pH du milieu de conservation SAGM.</i>	139
<i>II.B.2.2.2. Variation du pH du cytosol des hématies</i>	139
II.B.2.3. Etude de l'hémolyse	140
II.B.2.4. Etude de la viabilité des hématies par le test de la calcéine-AM	140
II.B.2.5. Mesure de l'externalisation de la phosphatidylsérine	142
II.B.2.6. Mesure de la désialylation des hématies	142
II.B.2.7. Etude de la capture et de la phagocytose in vitro des hématies	143
II.B.2.8. Modifications morphologiques des hématies	145
<i>II.B.2.8.1. Analyse par cytométrie en flux dans le système dot-plot FSC (variation de la taille des cellules) / SSC (variation de la densité des cellules).</i>	145
<i>II.B.2.8.2. Observation en microscopie électronique de balayage</i>	145
II.B.3. L'addition du glucose dans des milieux de conservation est-elle nécessaire ?	148
II.B.3.1. Introduction	148
II.B.3.2. Mode opératoire	148
II.B.3.3. Résultats	149
<i>II.B.3.3.1. «Test « lectines » de désialylation</i>	149
<i>II.B.3.3.2. Test « annexine-V » d'externalisation de la</i>	150

<i>phosphatidylsérine</i>	
<i>II.B.3.3.3. Test « calcéine-AM » de viabilité</i>	150
<i>II.B.3.3.4. Détermination de l'hémolyse</i>	152
<i>II.B.3.3.5. Dosage de l'ATP</i>	152
<i>II.B.3.3.6. Variations morphologiques des hématies</i>	153
II.B.3.4. Conclusions	155
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	159

INTRODUCTION

« Nous sommes chacun une nébuleuse vivante, un peuple hétérogène de milliards de cellules dont les interactions engendrent notre corps et notre esprit. Aujourd'hui, nous savons que toutes ces cellules ont le pouvoir de s'autodétruire en quelques heures. Et leur survie dépend, jour après jour, de leur capacité à percevoir les signaux qui empêchent leur suicide. Cette fragilité même et l'interdépendance qu'elle fait naître sont sources d'une formidable puissance, permettant à notre corps de se reconstruire en permanence. A l'image ancienne de la mort comme une faucheuse brutale se surimpose une image radicalement nouvelle, celle d'un sculpteur au cœur du vivant, faisant émerger sa forme et sa complexité. Cette nouvelle vision bouleverse l'idée que nous nous faisons de la vie. Elle permet une réinterprétation des causes de la plupart de nos maladies et fait naître de nouveaux espoirs pour leur traitement. Elle transforme notre compréhension du vieillissement. »

(Extrait de « La Sculpture du Vivant », Jean-Claude Ameisen, 2000).

La durée de vie dans la circulation sanguine des érythrocytes des Vertébrés est très exactement programmée et varie dans de larges proportions d'une espèce à l'autre comme le montre le Tableau I. La précision d'une telle horloge physiologique a, de longue date, intrigué les chercheurs et suscité nombre de travaux dans le but d'identifier les marqueurs membranaires de la mort programmée de ces cellules.

Tableau I. Durée de vie des hématies de divers animaux (Clark, 1998)

Espèces	Durée de vie (en jours)
Mammifères	
Cheval	150
Homme	120
Chien et Mouton	115
Cerf et Singe	95
Lapin et Rat	60
Chat et Souris	40
Oiseaux	
Canard	40
Poulet	30
Reptiles	
Tortue	600 – 800
Alligator	180 – 440
Amphibiens	
Grenouille	900

Dans le cas des hématies humaines, la question se pose de savoir quels sont les signaux spécifiques qui apparaissent à la surface des membranes des hématies condamnées à mort et qui permettent aux macrophages de faire la distinction entre les cellules sénescents et les autres, la sénescence étant synonyme de décrépitude, selon Winston Churchill, et de naufrage, selon Charles De Gaulle ? D'autre part, l'expression « mort programmée » évoquant inmanquablement celui d' « apoptose », une deuxième question se pose, depuis deux lustres, de savoir si la mort des érythrocytes relève ou non d'un mécanisme apoptotique. En d'autres termes, les érythrocytes portent-ils les stigmates des cellules nucléées en apoptose parmi lesquels les plus marquants sont les suivants ¹:

- Désialylation des glycoconjugués membranaires
- Externalisation de la phosphatidylsérine
- Bourgeonnement (« blebbing ») de la membrane cytoplasmique dû à des altérations du cytosquelette.
- Diminution de la taille des cellules liée à l'émission de vésicules et de corps apoptotiques.
- Influx de calcium dans le cytoplasme.
- Activation de protéases présentes dans le cytoplasme à l'état de proenzymes. Parmi celles-ci figurent les caspases et les calpaïnes.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre général des recherches engagées à l'Institut de Biochimie de l'Académie Roumaine par le Pr. Cecilia Motaş et le Dr. Daniela Bratosin qui se poursuivent depuis 1993 dans le laboratoire du Professeur Montreuil en collaboration étroite avec le Centre de Transfusion Sanguine de Lille et les Laboratoires MacoProductions de Tourcoing et qui portent sur les mécanismes moléculaires et cellulaires de la mort programmées des cellules sanguines. En effet, sur la base de la connaissance des mécanismes de la sénescence des hématies et des plaquettes, l'objectif est d'améliorer la viabilité des hématies et, par conséquent, de retarder leur clairance après transfusion ce qui aurait un effet bénéfique chez les polytransfusés. L'expérience montre, en effet, que 30% des hématies transfusées disparaissent de la circulation au bout de 24 heures. Au terme de 3 jours, cette proportion passe à 70%.

¹ Revues générales : Ameisen, 1999, 2000, 2004; Boatright, 2003; Brown, 1998; Cotter, 2003; Cu villier, 2002; Desagher *et al.*, 2000; Edinger *et al.*, 2004; Garcia, 2003; Green, 2005 ; Hengartner, 2000 ; Huang, 2002 ; Jaffrézou *et al.*, 2002 ; Kroemer *et al.*, 1997 ; Kroemer, 2002 ; Lelièvre *et al.*, 2003; Morioka *et al.*, 1998; Obeid *et al.*, 1993; Salvesen, 2002; Wang, 2000; Wolf *et al.*, 1999.

Nous sommes donc continuellement à la recherche de nouveaux marqueurs membranaires de mort cellulaire chez les hématies qui soient plus rapides, plus sensibles et plus spécifiques et dont la caractérisation pourrait conduire à l'amélioration des milieux de prélèvement et de conservation des hématies et des plaquettes destinées à la transfusion. La recherche de nouveaux milieux de conservation des hématies passe par la définition de critères fiables de viabilité. Or, comme l'a récemment souligné Beutler (2000), les critères actuellement utilisés sont contestables car il s'agit essentiellement de la teneur en ATP (Adénosine triphosphate) qui contrôle la morphologie de la cellule et du 2,3-DPG (Acide 2,3-diphosphoglycérique) nécessaire au transport de l'oxygène par l'hémoglobine. Or, ces critères concernent le métabolisme cytoplasmique de l'hématie alors que la phagocytose de cette dernière est le résultat d'interactions de sa membrane avec celle du macrophage. Les critères de viabilité doivent donc être des critères membranaires. Nous les avons appliqués dans une large mesure mais en les associant à deux critères cytoplasmiques qui concernent, l'un la recherche d'ions superoxydes meurtriers pour de nombreuses molécules – les lipides en particulier – et, l'autre, la mesure des activités estérasiques qui diminuent dans les cas de souffrance cellulaire.

Il est bien connu que la première étape du processus de sénescence des hématies et d'une façon universelle de toutes les cellules est marquée par un processus de désialylation qui est considéré comme l'un des marqueurs de l'apoptose cellulaire. L'exposition des résidus de β -galactosyl des structures glycaniques mène à la capture des cellules par les macrophages par une β -galactolectine membranaire présente dans les membranes des phagocytes. Ce mécanisme marque la première étape de la phagocytose des cellules apoptotiques.

L'analyse par cytofluorimétrie du nombre de sites de fixation des lectines marqués par FITC et spécifiques des acides sialiques a montré que les érythrocytes âgés fixaient moins de WGA (*Wheat germ agglutinin*), de LPA (*Limulus polyphemus agglutinin*), de SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) et de MAA (*Maackia amurensis agglutinin*) que les érythrocytes jeunes, démontrant ainsi clairement une désialylation des cellules sénescents (Bratosin *et al.* 1995). En outre, les glycoconjugués des érythrocytes âgés incorporent plus d'acide sialique que les cellules jeunes. Cette observation résulte de la détermination du taux de transfert par une α -2,6-sialyltransférase d'acide N-acétylneuraminique fluorescent ou radioactif. RCA₁₂₀ (*Ricinus communis agglutinin*) aussi bien qu'ECA (*Erythrina cristagalli*) et la lectine d'*Erythrina corallodendron* spécifiques des résidus terminaux de β -galactose ont mené à des résultats

inattendus et non encore expliqués qui ont révélé une diminution de la fixation de ces lectines associée à une augmentation de la désialylation.

L'hypothèse du travail qui nous a été confié fut que, pendant la sénescence érythrocytaire, une β -galactosidase pouvait s'activer. Cette théorie pouvait, en outre, expliquer le nombre réduit de sites de fixation obtenus pour les érythrocytes âgés à l'aide des lectines - FITC spécifiques des résidus β -galactosyles.

Cette découverte remettait en cause le dogme énoncé plus haut du β -galactose démasqué par la désialylation et marqueur de la capture des cellules apoptotiques par la β -galactoelectine macrophagique. En effet, le processus de désialylation des glycoconjugués membranaire dévoile certes le galactose, mais l'action de la β -galactosidase, en provoquant l'élimination du galactose, pourrait dévoiler, la N-acétylglucosamine ou la N-acétylgalactosamine, antépénultièmes monosaccharides dans les chaînes glycaniques et qui seraient alors les véritables marqueurs de la capture des hématies.

Nous tenterons de répondre à la question : la β -D-galactosidase est-elle un marqueur universel de sénescence ?

Dans le mémoire que nous présentons, l'exposé de nos travaux personnels sera précédé de généralités concernant la transfusion sanguine, la membrane de l'hématie et les connaissances récemment acquises dans le domaine de l'apoptose. Puis nous décrirons les méthodes d'application générale que nous avons utilisées et nous exposerons ensuite les résultats que nous avons obtenus, **au plan fondamental**, sur la question de la β -D-galactosidase, marqueur universel de la sénescence. Dans le chapitre suivant, consacré à la **recherche appliquée**, nous tenterons de démontrer que l'amélioration des milieux de prélèvement et de conservation des hématies, ainsi que la nouvelle technique de prélèvement du sang à l'aide d'un automate (ABC – Automate Blood Collector) mis au point par la Société MacoPharma, sont un réel progrès dans le domaine de la transfusion.

Les résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet des publications suivantes :

Mémoires parus dans des revues étrangères :

1. Daniela Bratosin, **Laura Mitrofan**, Carmen Palii, Jérôme Estaquier and Jean Montreuil, A novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and ageing *Cytometry A*, 66A, 78-84.(2005)
2. D. Bratosin, T. Pham-Bulai, **L. Mitrofan-Oprea**, C. Palii, J. Estaquier, J. Montreuil, Mécanismes cellulaires et moléculaires de la mort programmée des hématies, *Regard sur la Biochimie*, n° 4 (2005) 19-33.
3. Bratosin D, Estaquier J, Slomianny C, Tissier JP, Quatannens B, Bulai T, **Mitrofan L**, Marinescu A, Trandaburu I, Ameisen JC, Montreuil J., *On the evolution of erythrocyte programmed cell death: apoptosis of Rana esculenta nucleated red blood cells involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization*, *Biochimie*. 2004 Mar; 86(3):183-92

Mémoires parus dans des revues roumaines :

1. **Laura Mitrofan**, Daniela Bratosin, Vlad Artenie, Al. G. Marinescu and Jean Montreuil *Activation of a new senescent marker in induced senescent erythrocyte model in the presence of Ca²⁺: a membrane bound β -galactosidase*, *Rev. Roum. Biol.* Vol 49, No. 1-2 (2004)
2. Luminita Buia, **Laura Mitrofan**, Carmen Palii, Christian Slomianny, Maria Caloianu, Alexandru G. Marinescu, Jean Montreuil, Daniela Bratosin, *Apoptosis detection microscopical methods: nucleated erythrocytes of Rana as a model*, *Romanian Biological Sciences*, Vol II., No.1-2., p. 53-62, 2004.

Présentations dans des réunions scientifiques:

1. L. Buia, C. Iordachel, C. Palii, **L. Mitrofan**, L. Moldovan, M. Caloianu, D. Bratosin, Replicative senescence or chondrocyte apoptosis in pathogenesis of osteoarthritis, International Conference in Gerontology, September 15-16 2006, Arad, Roumanie.
2. D. Bratosin, C. Palii, **L. Oprea**, A. Héron, T. Verport, F. Goudaliez, J. Montreuil, Contributia citometriei in flux la rezolvarea problemelor actuale de transfuzie sanguina, Congresul National de Citometrie, 11-12 mai 2006, Bucarest, Roumanie.
3. C. Palii, **L. Mitrofan**, D. Bratosin et J. Montreuil, Mécanismes cellulaires et moléculaires de la mort programmée des hématies induite par les céramides, 5-ème Journée « André Verbert » - Coloque Annuel des Doctorands, 28 septembre 2005, Lille, France.

4. **L. Mitrofan**, C. Palii, D. Bratosin, J. Montreuil, Description d'une méthode originale d'étude par cytométrie en flux de la viabilité et du vieillissement des hématies marquées par la Calceine-AM, 5-ème Journée « André Verbert » - Coloque Annuel des Doctorands, 28 septembre 2005, Lille, France.
5. C. Palii, **L. Mitrofan**, D. Bratosin et J. Montreuil, Mécanismes cellulaires et moléculaires de la mort programmée des hématies induite par les céramides, Congrès annuel de la SFBBM et Forum des Jeunes Chercheurs « Biotechnologie moléculaire pour la santé », Nantes, 24-26 octobre 2005, France.
6. D. Bratosin, **L. Mitrofan**, C. Palii, J. Estaquier, J. Montreuil, A novel fluorescence assay using Calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and ageing, 15th Meeting of the European Association for the Red Cell Research, Murten Switzerland, April 21-25, 2005.
7. **L. Mitrofan**, C. Palii, D. Bratosin, J. Montreuil, Description d'une méthode originale d'étude par cytométrie en flux de la viabilité et du vieillissement des hématies marquées par la Calceine-AM, Congrès annuel de la SFBBM et Forum des Jeunes Chercheurs « Biotechnologie moléculaire pour la santé », Nantes, 24-26 octobre 2005, France.
8. D. Bratosin, **L. Mitrofan**, C. Palii, J. Estaquier, J. Montreuil, A novel fluorescence assay using Calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and ageing, Premier Congrès National de Cytométrie, Bucarest, 12-13 mai 2005, Roumanie.
9. **L. Mitrofan**, C. Palii, Al. G. Marinescu, J. Montreuil, D. Bratosin, Flow cytometry assessment of nucleated red blood cells apoptosis for aquatic environmental biomonitoring, Premier Congrès National de Cytométrie, Bucarest, 12-13 mai 2005, Roumanie.
10. D. Bratosin, L. Tcancenco, C. Palii, **L. Mitrofan**, J. Montreuil, Izolarea prin afinitate pe suport de gelatina-Annexina V imobilizata a subpopulatiei de hematii circulante in apoptoza si caracterizarea acesteia prin citometrie in flux, A XXIII-a Sesiune Stiintifica Anuala a SNBC, Sibiu, 10-13 iunie 2005.
11. D. Bratosin, **L. Mitrofan**, C. Palii, T. Pham-Bulai, J. Estaquier, J-C. Ameisen, J. Montreuil, Molecular and Cellular Mechanism of Erythrocyte Programmed Cell Death, Workshop on Cell and Molecular Biology, a Key to Defear Global Risk Diseases: Atherosclerosis, Diabetes and Immune Disorder, Bucarest, 16-20 Septembre 2004.
12. D. Bratosin, **L. Mitrofan**, C. Palii, T. Pham-Bulai, J. Estaquier, J-C. Ameisen, J. Montreuil, Molecular and Cellular Mechanism of Erythrocyte Programmed Cell Death, Workshop on Cell and Molecular Biology, a Key to Defear Global Risk Diseases: Atherosclerosis, Diabetes and Immune Disorder, Bucarest, 16-20 Septembre 2004.
13. D. Bratosin, T. Bulai, C. Palii, **L. Mitrofan**, A. Pons, J. Zanetta and J. Montreuil, *Biochemistry, fate and role of red blood cell sialic acids*, 14th Joint Meeting of the

”Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie”, the Netherlands Society for Glycobiology and the Groupe Lillois de Glycobiologie, 20-22 November 2003, Lille, France.

GÉNÉRALITÉS

I - LA TRANSFUSION, PASSÉ, PRÉSENT ET FUTUR

La prolongation de la durée de stockage des hématies dans les Centres de Transfusion a été un défi depuis la II^{ème} Guerre Mondiale. Les progrès ont été lents pour plusieurs raisons. Premièrement, la nature fondamentale des lésions de stockage reste inconnue. Quand les hématies stockées sont transfusées à un individu, quelques unes circulent avec une durée de vie normale et d'autres sont éliminées après quelques heures signifiant que des cellules vivantes et mortes co-existent dans les poches de transfusion. Malheureusement, on ne connaît pas la différence entre ces deux types de cellules, différence qui définit ce qu'on appelle « lésions de stockage ». Deuxièmement, aucun test valable n'a été jusqu'à présent imaginé pour étudier la viabilité des hématies destinées à la transfusion.

Les lésions importantes de stockage sont associées à la réduction du taux d'ATP et à des modifications membranaires comprenant l'exposition de la phosphatidylsérine. Ces changements progressent pendant le stockage. Ils sont influencés par les solutions anticoagulantes de prélèvement et de conservation. La plupart des changements observés se rapportent à des études effectuées sur du sang collecté sur citrate-phosphate-dextrose (CPD) comme anticoagulant et stocké à 4°C dans une solution saline d'adénine–glucose–mannitol (SAGM). La condition minimale générale pour la conservation des globules rouges est que l'hémolyse ne doit pas excéder 0,8% et qu'une proportion de 75% des cellules transfusées doit être maintenue dans la circulation 24 h après la transfusion (Council of Europe, 2004). Ainsi, l'utilisation de globules rouges en fin de période de stockage peut conduire à la transfusion, d'une part, de plus de 25% d'érythrocytes morts qui pourraient induire une immunosuppression et, d'autre part, de 120 µM d'hémoglobine susceptible d'induire une vasoconstriction dans la microcirculation (Revue in Solheim *et al.*, 2004)

Les globules rouges sont les transporteurs d'oxygène vers les tissus en raison des effets synergiques de l'hémoglobine, de l'anhydrase carbonique et de la bande 3 (B3) (Hamasaki et Yamamoto, 2000). Quand le CO₂ entre dans les globules rouges par les capillaires, il est rapidement hydraté par l'anhydrase carbonique en H₂CO₃ qui se dissocie rapidement en H⁺ et HCO₃⁻. La protéine de la bande 3 associée aux ions Cl⁻ du plasma permute alors HCO₃⁻ ce qui a comme conséquence d'induire un pH intracellulaire acide transitoire dans les globules rouges, déclenchant ainsi la dissociation de HbO₂ et libérant O₂.

Un autre facteur important pour la dissociation de l'O₂ de HbO₂ est l'attachement du 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-DPG) à l'Hb (Benesch *et al.*, 1968). Dans le sang frais normal, 100 ml de sang peuvent livrer 8 ml de O₂. Avec une concentration augmentée de 2,3 - DPG la livraison d'O₂ peut s'approcher de 12 ml, alors qu'après une diminution de 10% du niveau normal de 2,3-DPG, la livraison est réduite à 4 ml d'O₂. Au terme du stockage pendant plusieurs semaines dans le SAGM, le niveau de 2,3-DPG est réduit d'environ 10%. La protéine B3 montre une réduction entre les 14^{ème} et 35^{ème} jours (Messana *et al.*, 2000). En outre, le niveau d'ATP chute pendant la conservation, ce qui affecte la survie du globule rouge en réduisant la flexibilité des cellules et en augmentant de ce fait leur élimination après passage par les capillaires étroits. Les changements de la protéine B3 qui ont comme résultat la diminution de l'accumulation du glucose, sont irréversibles.

D'une part, les niveaux de 2,3-DPG et d'ATP peuvent être normalisés par incubation à court terme avec le phospho-énolpyruvate (PEP) (Matsuyama *et al.*, 1989). En outre, après transfusion, les niveaux de 2,3-DPG et d'ATP se rétablissent, mais le processus est beaucoup plus lent et nécessite une journée pour rétablir à 50–70% le niveau normal de 2,3 - DPG et une semaine pour son plein rétablissement (Hamasaki et Yamamoto, 2000). La normalisation des niveaux intracellulaires de K⁺ qui sont également réduits pendant la conservation des globules rouges, est cependant un processus beaucoup plus rapide après transfusion et s'accomplit en quelques heures. La solution modifiée d'anticoagulant et/ou les nouvelles solutions de conservation pour les globules rouges peuvent améliorer la fonction de cette cellule.

1. Historique

1.1. Les milieux de prélèvement et de conservation

L'histoire commence au début de la Seconde Guerre Mondiale quand le sang était collecté et stocké dans une solution alcaline de citrate de sodium et de glucose. Ensuite, cette solution a été acidifiée pour donner l'ACD (Acid Citrate Dextrose) (Loutit *et al.*, 1943). Même si l'ATP baisse relativement rapidement en solution alcaline comme résultat de l'activation d'une hexokinase et de l'inhibition de la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase, les auteurs ont voulu principalement prévenir la caramélisation du glucose qui se passe invariablement en solution alcaline (un problème que Hess *et al.*, ont résolu en 2000). Gibson *et al.* (1957) ne

désignent pas le CPD comme simple substitut pour l'ACD afin d'améliorer le taux de 2,3-DPG et de prolonger la durée de stockage des hématies, mais comme moyen de diminuer ce qu'il appelle « lésion de collection ». Le succès initial par l'addition d'inosine (Gabrio *et al.*, 1956) n'était pas reproductible (Lange *et al.*, 1958), probablement à cause de la contamination de l'inosine par l'adénine (Finch, 1985). L'addition ultérieure de l'adénine comme substrat pour permettre la synthèse *de novo* des nucléotides (Nakao *et al.*, 1962 ; Simon, 1962) a été plus rationnelle. L'observation que le mannitol a diminué l'hémolyse *in vitro* (Beutler, 1973) a dérivé de l'opinion erronée que le groupe alcool des sucres devrait prévenir la vésiculation des cellules pendant le stockage. Le mécanisme par lequel le mannitol fonctionne reste encore inconnu, mais il ne semble pas lié au volume de la cellule (Beutler *et al.*, 1988).

Pendant plusieurs années, malgré l'utilisation de l'adénine, du mannitol et d'autres additifs, la durée de conservation des hématies reste limitée à 6 semaines. Des améliorations récentes ont été apparemment apportées par Maryman *et al.*, en 1986, qui soutient qu'un milieu hypotonique contenant des concentrations relativement élevées de sels d'ammonium et de phosphate permet une conservation possible de 100 jours, avec une viabilité excellente allant jusqu'à 83,5%.

Il est intéressant de noter qu'aucune des solutions nouvelles proposées n'a été capable de maintenir un niveau élevé de 2,3-DPG dans le sang conservé. Etant donné que le taux de 2,3-DPG dans les cellules viables reste presque normal 8 heures après la transfusion, ce n'est probablement pas un critère important dans le cas de thérapie transfusionnelle chronique (Beutler *et al.*, 1969 ; Valeri *et al.*, 1969). La clé du maintien du 2,3-DPG est la stabilisation du pH par un tampon bicarbonate, le principal système tampon physiologique de l'organisme. Quand il a introduit le premier milieu de stockage artificiel pour la conservation des hématies il y a 30 ans Beutler *et al.*, (1971) ont utilisé ces tampons et il ont réussi à maintenir la viabilité pendant au moins 6 semaines. Ultérieurement, ils ont mis au point un milieu désigné BAGPM (bicarbonate-adénine-glucose-phosphate-mannitol) qui maintient le niveau de 2,3-DPG à 50% du taux normal, après 42 jours de stockage (Beutler *et al.*, 1972). Toutefois, l'application de ce système reste difficile, voire impossible en raison des barrières technologiques que dresse l'utilisation du bicarbonate de sodium. La technologie qui a rendu possible le développement des solutions additives expérimentales comme EAS-61 et EAS-64 a avancée au point d'envisager la mise au

point des systèmes qui maintiennent le 2,3-DPG et la viabilité pour de longues périodes (Beutler, 2000).

1.2. Les plastiques

Actuellement les globules rouges sont stockés en poches de chlorure polyvinylique (PVC) avec des dérivés de l'acide phtalique comme plastifiants. Ces derniers ont un effet stabilisant sur la membrane du globule rouge, mais passent pour être carcinogènes. Les plastiques non-PVC (plastiques de lixiviation) présentant une perméabilité au gaz élevée sont optimaux pour le stockage des plaquettes, mais induisent une hémolyse accrue des globules rouges pendant leur conservation. La déleucocytation et l'utilisation de solutions optimales de conservation peuvent réduire cette hémolyse (Seghatchian, 2003).

1.3. Les pathogènes

Récemment, l'Amotosalem HCl (un psoralène synthétique) a été introduit pour inactiver les microbes pathogènes des plaquettes et d'autres techniques de ciblage nucléique utilisant l'Inactine, PEN 110 ou la Riboflavine ont été développées pour les globules rouges (Corbin, 2002), le psoralène activé par la lumière UV s'intercalant dans l'ADN et l'ARN. Les plaquettes étant dépourvues de noyau, le processus d'inactivation des microbes pathogènes peut affecter seulement l'ADN mitochondrial. Pour les globules rouges, la formation de néoantigène a été observée après inactivation de microbes pathogènes par l'Inactine.

2. Perspectives nouvelles

2.1. Les collecteurs automatiques de sang total.

La standardisation de la transfusion sanguine peut être normalisée en collectant des volumes de sang basés sur la teneur en hémoglobine du donneur. Un avantage auxiliaire de cette collecte standard est son effet bénéfique sur tout le prélèvement du sang. Une possibilité pour éviter de rassembler un volume trop important du donneur est d'employer la technique d'aphérèse avec le retour du plasma au donneur, une technique qui semble être employée de plus en plus dans les collectes standard. Les systèmes automatisés de prélèvement et de séparation de sang deviennent de plus en plus disponibles et sont facilement programmables pour collecter le sang en se fondant sur la concentration totale d'Hb. Au moins un fabricant (MacoPharma, Tourcoing,

France) fournit un appareil qui permet d'ajouter l'anticoagulant dans le sang prélevé à hématicite constant, l'Automate MacoPharma ABC[®]. Avec la collection manuelle, tandis que le volume de sang entier rassemblé peut encore être basé sur la concentration en Hb, avec un volume constant d'anticoagulant peut avoir comme conséquence une variation de la dilution du plasma. Mais l'addition d'un volume fixe d'anticoagulant avec une teneur normalisée d'hématies crée une faible variabilité dans l'Hb du produit final. En fin de compte, la collection de sang automatisé devrait devenir une pratique courante, non seulement pour faciliter le prélèvement mais aussi pour diminuer les possibilités pour d'erreurs techniques. Un tel dispositif automatisé de prélèvement peut être programmé pour ajuster le volume de sang rassemblé sans coût ou travail supplémentaire. Pour la collecte manuelle, les obstacles sont plus grands car les volumes d'anticoagulant sont fixes tandis que le volume rassemblé est variable. Avec le développement des dispositifs simples de prélèvement comme l'appareil de MacoPharma, l'anticoagulant peut être dosé dans le sang à un taux fixe.

Peut-être le service le plus grand que les fabricants pourraient assurer actuellement est de fournir des solutions d'un pH élevé contenant le glucose et les électrolytes dans un sac unique, l'approvisionnement de la solution dans deux sacs présentant des obstacles pour combiner les deux solutions avant l'addition des hématies. La combinaison des deux solutions doit être accomplie par le fabricant. La disponibilité de telles solutions d'un pH élevé pourrait considérablement améliorer la viabilité, le 2,3-DPG et l'ATP pendant le stockage et prolonger selon Högman et Meryman (2006) la survie des hématies au moins à 42 jours.

2.2. Production d'hématies à partir de cellules souches hématopoïétiques

Giarratana *et al.* ont décrit en 2004 une méthode originale de production d'hématies à partir de cellules souches hématopoïétiques en mimant le microenvironnement médullaire en présence de cytokines et en co-culture avec des cellules stromales. Ils rapportent une expansion des cellules souches CD34⁺ (plus de $1,95 \times 10^6$ fois) et leur conversion à 100% *ex vivo* en hématies. Ils ont répondu à la question d'impact *ex vivo* du microenvironnement, d'une part sur la maturation des cellules érythroïdes et, d'autre part, sur la biosynthèse de l'hémoglobine. En outre, les hématies ainsi produites ont toutes les caractéristiques des cellules matures en ce qui concerne le contenu en enzymes, la déformabilité de la membrane et leur capacité à fixer l'O₂.

2.3. Modification de la membrane érythrocytaire vers un groupe O universel

2.3.1. Le groupe O universel. Pour éliminer les problèmes de compatibilité, une solution serait de créer un groupe O universel en modifiant enzymatiquement les antigènes ABH. Lenny *et al.* en 1994 ont tenté de modifier les groupes A et B en groupe O, nommé ECO (Enzymatically converted groupe O). Ils ont démontré que le galactose caractéristique du groupe B peut être éliminé par une α -D-galactosidase extraite du café. Les hématies ECO ont survécues normalement chez des sujets humains transfusés. La conversion du groupe A en des hématies ECO s'est avérée plus compliquée.

2.3.2. Immunocamouflage. La reconnaissance immunologique de tissu allogénique est un point critique en transfusion et en transplantation. Scott *et al.* (2000), ont récemment testé l'hypothèse par laquelle le camouflage chimique de la membrane des hématies avec du polyéthylène glycol (PEG) pourrait atténuer la reconnaissance des antigènes de surface en diminuant l'immunogénicité d'hématies étrangères. Ces études ont prouvé que les antigènes ABO/RhD et non-ABO/RhD peuvent être efficacement camouflés et que le traitement des hématies par le polyéthylène glycol (PEG-RBC) atténue de manière significative l'immunogénicité. En dépit de la perte d'identification antigénique et du potentiel immunogène de PEG-RBC, le camouflage n'a aucun effet néfaste sur la morphologie des hématies, la fragilité osmotique ou la fonction des cellules. Ainsi, les données *in vitro* et *in vivo* indiquent que le camouflage global des hématies par fixation covalente de PEG et de PEG-dérivés sur la surface des cellules puisse fournir des moyens sûrs et rentables de réduire le risque d'allo-sensitivité chez les patients chroniques transfusés. La nature chimique du PEG le rend très malléable et, par l'utilisation de diverse substances, ce composé peut facilement être conjugué par liaison covalente aux protéines sans dénaturer ces dernières, ni empêcher la liaison de petites molécules ou de substrats tels que l'oxygène et le glucose. En effet, les études précédentes des PEG-protéines indiquent que leurs fonctions enzymatiques sont préservées. D'une manière plus importante, les complexes PEG- ou méthoxypolyéthylène glycol-protéines montre un manque apparent de toxicité vis-à-vis de l'organisme récepteur et une immunogénicité diminuée ou absente même après administration répétée (Abuchowski *et al.*, 1977 a, b; Jackson *et al.*, 1987).

2.3.3. Modifications de l'hémoglobine

2.3.3.1. *Hémoglobine «cross-linked»*. Le bis-(3,5-dibromosalicyl) fumarate et un certain nombre de réactifs bifonctionnels réagissent préférentiellement avec l'oxyhémoglobine pour relier les chaînes β dans le site du 2,3-diphosphoglycérate. Des études faites par l'armée aux Etats-Unis ont conduit à l'obtention d'une hémoglobine modifiée (la chaîne α -adjacente substituée en position 99 avec le bis-(3,5-dibromosalicyl) fumarate (Chatterjee *et al.*, 1986). Baxter Healthcare (Deerfield, IL) a développé un produit (HemAssist) commercialisé. L'hémoglobine ainsi modifiée est très vaso-active, avec des effets hypertensifs et une résistance vasculaire pulmonaire augmentée (Winslow *et al.*, 1998).

2.3.3.2. *Hémoglobine humaine polymérisée*. PolyHeme (un produit polymérisé contenant du glutaraldéhyde pyridoxal-5-phosphate) est une solution chimiquement modifiée d'hémoglobine humaine. Elle a été développée par Northfield Laboratories (Evanstone, IL) comme une alternative pour le sang destiné à la transfusion (Gould *et al.*, 1998). La firme Hemosol (Parsippany, NJ) a préparé un produit polymérisé en utilisant des chaînes de o-raffinose, nommé Hemolink. HemAssist et Hemolink ont été suspendues dans la phase III des essais.

2.3.3.3. *Hémoglobine bovine polymérisée*. L'utilisation de l'Hb bovine pose quelques problèmes comme l'immunogénéicité et la transmission de maladies. Biopure Corporation (Cambridge, MA) utilise le glutaraldéhyde pour polymériser l'hémoglobine.

2.3.3.4. *Hémoglobine modifiée avec des macromolécules*. La polyéthylène glycol-Hb a été proposée comme substitut du sang par Matsushita *et al.*, (1988) et par Nho *et al.* (1992).

II. ULTRASTRUCTURE DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE

L'hématie a très tôt attiré l'attention des physiologistes et des expérimentateurs. Découverte dès le 17^{ème} siècle par Swammerdam (1658), elle fut parfaitement décrite par Leeuwenhoek qui mit en évidence la régularité de sa forme discoïdale et évalua son diamètre à 8µm. La membrane cellulaire la mieux connue, en raison de la facilité de sa préparation et de son importance physiologique, est celle qui borde les érythrocytes dont la fonction principale est de porter l'oxygène des poumons aux tissus et d'amener l'anhydride carbonique des tissus vers les poumons. Elle présente des propriétés spéciales qui sont attribuées aux protéines et aux lipides qui lui sont associés. Comme toutes les membranes des cellules vivantes, la membrane érythrocytaire est composée de deux couches monomoléculaires de lipides dans lesquelles sont localisées de nombreuses protéines membranaires intégrées avec des fonctions variées de transporteurs, de récepteurs et d'enzymes (Fig.1). Des protéines membranaires dites périphériques constituent le vaste réseau du cytosquelette qui contrôle, non seulement la taille, la forme, la flexibilité et la résistance de la membrane érythrocytaire, mais aussi les interactions cellule-cellule et la fusion membranaire. L'altération de ce complexe modifie dans une large mesure la morphologie des érythrocytes et peut aussi provoquer la fragmentation de la membrane en petites vésicules (Lodish H. *et al.*, 1997).

La membrane érythrocytaire est construite sur le modèle général des membranes plasmiques quelle que soit leur origine : deux couches monomoléculaires de lipides dans lesquelles sont intégrées des protéines, généralement des glycoprotéines. Elle renferme 40% de lipides, 52% de protéines et 8% de glucides. Ces derniers, appelés glycannes, sont conjugués soit à des protéines (glycoprotéines), soit à des lipides (glycolipides).

Les principaux constituants de la membrane érythrocytaire sont les suivants :

1. Les lipides

La majorité des lipides de la membrane érythrocytaire sont représentés par les phospholipides (20%), le cholestérol (16%) et les glycolipides (4%).

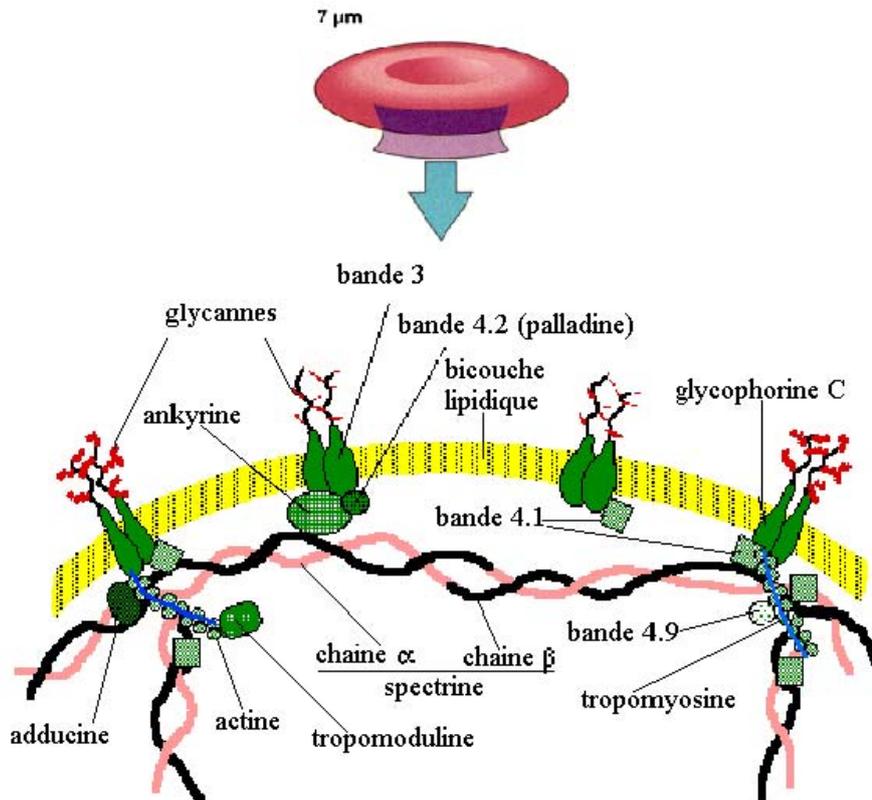


Figure 1 - Structure schématique de la membrane érythrocytaire (D'après Lodish H. *et al.*, 1997)

1.1. Les phospholipides

Les phospholipides prédominants sont la phosphatidylcholine (28%), la phosphatidyléthanolamine (26%), la sphingomyéline (25%) et la phosphatidylsérine (13%). On trouve aussi, en faibles quantités, l'acide phosphatidique (2%), le phosphatidylinositol (1%) et la lysophosphatidylcholine (1%). Les lipides sont répartis asymétriquement dans la membrane, la majeure partie de la phosphatidylcholine (65-75%) et de la sphingomyéline étant orientée vers l'extérieur de la cellule, tandis que la phosphatidyléthanolamine (80-85%) et la phosphatidylsérine (96%) sont dans le cytoplasme (Figure 2).

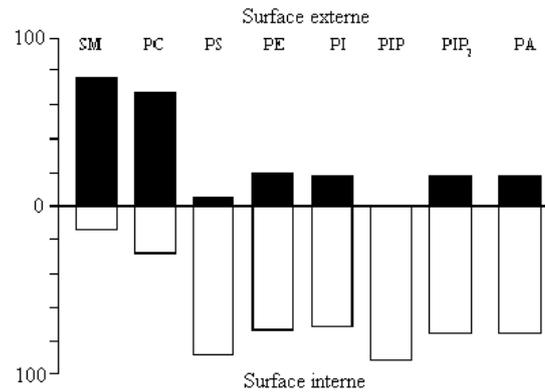


Figure 2 - Répartition asymétrique (en %) des phospholipides dans la membrane de l'érythrocyte humain. SM : sphingomyéline ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PS : phosphatidylsérine ; PI : phosphoinositol ; PIP : phosphatidylinositol-4-phosphate ; PiP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PA : acide phosphatidique (Zachovski, 1993).

En 1978, Haest et ses collaborateurs ont formulé l'hypothèse que l'asymétrie de la phosphatidylcholine était la conséquence des interactions entre ce lipide et la spectrine, le composant majeur du cytosquelette. Cette hypothèse fut ultérieurement confirmée par de nombreux auteurs et on sait à présent que les modifications de la spectrine conduisent à l'apparition de quantités importantes de phosphatidylsérine et de phosphatidylinositol dans le feuillet externe de la membrane érythrocytaire. Ce mécanisme de translocation est catalysé par des aminophosphatidyltransférases, nommées aussi flipases, qui sont spécifiques de la phosphatidylsérine et de la phosphatidylcholine.

1.2. Le cholestérol

Le cholestérol et ses esters font partie d'une classe de lipides membranaires, les stéroïdes, qui possèdent en commun un noyau cyclopentane phénanthrénique. Ils représentent 30 à 50% des lipides des membranes plasmiques. Le cholestérol est le principal stéroïde des tissus animaux. Dans la membrane, il se répartit de part et d'autre de la double couche lipidique. Par son noyau et par les substituants de ce dernier, comme le groupement hydroxyle, il est de nature amphiphile. Son rôle est de stabiliser et de maintenir la fluidité de la membrane. Le groupe hydroxyle du carbone 3 peut être estérifié par un acide gras, en donnant un ester du cholestérol.

1.3. Les glycolipides

Une partie des lipides sont glycosylés et constituent la classe des glycolipides qui sont représentés par les globosides, les trihexoside-céramides et les dihexoside-céramides.

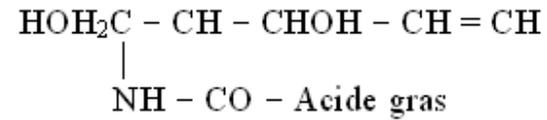
Les glycolipides érythrocytaires s'intègrent entre les phospholipides dans la couche bilamellaire, avec les longs axes hydrophobes des acides gras plantés dans la couche lipidique. Tous sont localisés dans le feuillet externe de la couche lipidique et leurs groupements glycaniques baignent dans le milieu extérieur. Comme les glycoprotéines membranaires, ils portent, eux aussi, quelques antigènes tissulaires présents dans les hématies comme, par exemple, les antigènes A, B, H, P^k, P₁, Le^a. Ces glycolipides sont le résultat de la substitution par des glycannes de lipides nommés céramides qui résultent de l'association d'un amino-alcool, la sphingosine, et d'un acide gras polyinsaturé à longue chaîne carbonée (Fig. 3A). En fonction de la structure des glycannes, les glycolipides peuvent être séparés en deux groupes :

a - Les glycolipides neutres (Fig. 3B), non-sialylés, comme les glucocérébrosides Glc β (1-1)Cer, les lactosylcérébrosides Gal(β 1-4)Glc(β 1-1)Cer, les globosides, les paraglobosides et les polyglycosylcéramides (mégaloglycolipides) découverts par Koscielak *et al.*(1976) qui ont démontré que la structure primaire des glycannes des polyglycosylcéramides était identique à celle des glycoprotéines de la bande 3 décrit à la page 25.

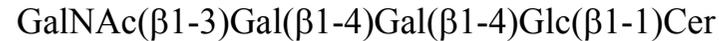
b - Les gangliosides (Fig. 3C) qui sont des glycolipides sialylés par une ou plusieurs molécules de N-acétyl ou de N-glycolylneuraminique.

Suivant le nombre de résidus d'acide neuraminique par molécule, on groupe les gangliosides en mono-, di-, tri-, tétra- et penta-sialo-gangliosides. Si les mono- et disialo-gangliosides simples comme le N-acétyl-neuraminyl-lactosylcéramide (GM₃) ou le disialyl-lactosylcéramide (GD₃) sont largement répandus dans la Nature, les gangliosides les plus complexes comme GM₁ ne se trouvent que chez les Vertébrés. Le cerveau est particulièrement riche en gangliosides (Weil, 1997). Dans les membranes érythrocytaires humaines, Hakomori *et al.*, (1993) ont isolé et caractérisé huit monosialogangliosides.

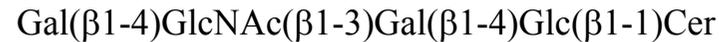
Les gangliosides majeurs sont l'hématoside et les sialoparaglobosides, à côté desquels on trouve aussi du GD_{1a}, GM₁ et GD_{1b} dans les proportions relatives suivantes : SPG>GM₃>GD_{1a}>GM₁≥GD_{1b}.

A. Céramides- (CH₂)₁₂ - CH₃**B. Glycolipides neutre:**

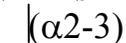
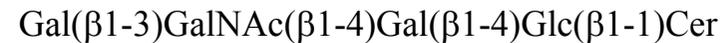
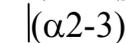
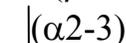
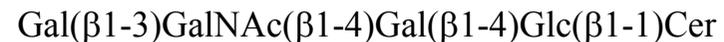
- Globoside



- Paragloboside

**C. Glycolipide sialylé (gangliosides)**

-Sialoparagloboside

-GM₃ (hematoside)-GM₁-GD1_a-GD1_b**Figure 3** – Structures des principaux glycolipides de la membrane érythrocytaire humaine

2. Protéines

La membrane érythrocytaire contient de 10 à 12 protéines majeures et plusieurs centaines de protéines mineures qui ont été mises en évidence dès 1982 par électrophorèse bi-dimensionnelle en gel de polyacrylamide (Rosenblum *et al.*, 1982), mais qui n'avaient pas été identifiées à l'exception toutefois de l'acétylcholine estérase (0,25%), une glycoprotéine membranaire fixée par un ancrage à phosphatidylinositol (PI), la Na^+K^+ -ATPase (0,005%) et la glycéro-3-phosphate déshydrogénase. Récemment, Low *et al.* (2002) sont parvenus à en caractériser 127 en appliquant les techniques de la protéomique qui associent l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) à la spectrométrie de masse (voir Annexe I). Salzer *et al.* (2002) ont observé que les vésicules libérées sous l'action du Ca^{2+} /ionophore étaient enrichies en lipides et en protéines spécifiques des « lipid rafts » de la membrane. En dehors des composants connus (cholestérol et gangliosides GM_1), Salzer *et al.* (2002) ont affirmé qu'elles sont enrichies en *protéines associées* à la membrane érythrocytaire, jamais détectées jusqu'à présent : stomatin, flotilin-1, flotilin-2, synexin et sorcin. Ces protéines sont associées à des « lipid rafts », en partageant ainsi la propriété des protéines insérées dans la membrane par un GPI (glycosylphosphate inositol). Le membre le plus connu de cette famille de protéines est l'acétylcholinestérase (AChE) dont l'abondance dans les vésicules Ca^{2+} -dépendantes était connue bien avant la découverte de l'ancrage GPI (Lutz *et al.*, 1977 ; Butifoker *et al.*, 1989).

La nomenclature des protéines majeures est déterminée par leur mobilité en électrophorèse SDS-PAGE qui les sépare en fonction de leur masse moléculaire. Les résultats obtenus par l'électrophorèse ont conduit à l'introduction de la notion de "bande" pour définir ces protéines. Pour les identifier, ces bandes ont été numérotées de 1 à 8 dans l'ordre décroissant de leurs masses moléculaires.

Les protéines membranaires du globule rouge ont été classées en deux catégories : *les protéines intégrées* et *les protéines périphériques*.

2.1. Les protéines intégrées

Les protéines intégrées sont associées directement aux acides gras des lipides membranaires grâce aux séquences d'acides aminés hydrophobes qu'elles contiennent. Elles sont insolubles dans des tampons aqueux, mais sont solubles dans des solvants organiques et dans des détergents ou encore à l'aide d'agents chaotropiques comme l'iodure de potassium et la rhodanide (Schenkel-Brunner, 1995).

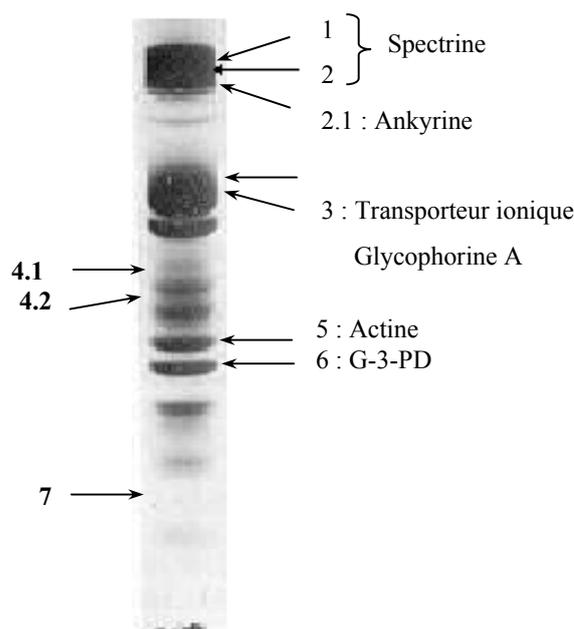


Figure 4 – Electrophorogramme en gel de SDS-polyacrylamide des protéines de la membrane des hématies humaines révélées par le Bleu de Coomassie (D’après Marchesi *et al.*, 1976). Les bandes sont numérotées selon la nomenclature de Fairbanks *et al.* (1971). G-3-PD : glycérol-3-phosphate déshydrogénase

Toutes les protéines intégrées sont caractérisées par au moins deux domaines hydrophiles, spécialement constitués par des amino-acides polaires, et par un domaine hydrophobe. L’un des segments hydrophiles des protéines est glycosylé et est en contact avec le milieu extracellulaire, tandis que le deuxième domaine plonge dans le cytoplasme et peut être phosphorylé. Le domaine hydrophobe interagit avec les chaînes carbonées des lipides et/ou le domaine hydrophobe d’autres protéines (Schenkel-Brunner, 1995).

Les protéines intégrées sont représentées par les bandes 3 et 4.5 et par des sialoglycoprotéines qui, à cause de leur contenu élevé en acide neuraminique, réagissent avec le réactif de Schiff (PAS) qui associe, à l’oxydation par l’acide périodique, la fuchsine bisulfite.

2.1.1. Les glycophorines. Les plus importantes sialoglycoprotéines sont les glycophorines. La glycophorine majeure est la glycophorine A (MN- ou α -sialylglycoprotéine) qui peut-être séparée facilement des autres composants mineurs, les glycophorines B (S_S glycoprotéines), C, D et E.

La glycophorine A dont la structure est illustrée dans la figure 5, est une protéine de 31kDa dont les fonctions sont inconnues chez l'érythrocyte normal, alors qu'il en existe 10^6 molécules par cellule. Elle contient 60% de glucides qui sont localisés du côté N-terminal et en position externe dans la membrane. La glycophorine A est reconnue comme la plus sialylée des glycoprotéines de la membrane érythrocytaire (51% des protéines totales). Elle porte donc la plupart des charges négatives de cette dernière. En effet, elle contient 25% d'acide sialique et représente 80% de la quantité totale d'acide sialique présent dans les glycoconjugués membranaires de l'érythrocyte. Elle présente les trois domaines bien différenciés suivants:

- Un segment très glycosylé (résidus 1 à 72) qui est composé d'acides aminés hydrophiles et qui est situé à la surface de la cellule. Il comporte 15 glycanes conjugués O-glycosiquement et un seul N-glycane. Les O-glycanes substituent des résidus de thréonine (Thr) et de sérine (Ser), tandis que le N-glycane est situé sur le résidu d'asparagine (Asn) en position 26. La partie O-glycosidique est essentielle dans le maintien de l'activité de groupe tissulaire MN portée par la glycophorine car un traitement par une neuraminidase supprime cette activité (Hoppe-Seyler, 1991). En effet, la structure tridimensionnelle de la protéine est maintenue grâce à des liaisons ioniques entre les résidus d'acide sialiques et des acides aminés basiques. Ainsi s'explique le fait que la désialylation de la glycophorine à l'aide d'une neuraminidase abolisse son activité de groupe MN portée par un épitope peptidique.

- Un segment (résidus 71 à 92) qui est composé d'acides aminés hydrophobes et traverse la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire.

- Un segment C-terminal (résidus 93 à 131) qui se situe dans le cytoplasme. Ce segment est riche en résidus de proline (Pro) (Schenkel-Brunner, 1995).

Dans la figure 6 ci-dessous sont représentées deux structures oligosaccharidiques caractéristiques de la glycophorine A.

La glycophorine A est reconnue comme une glycoprotéine très importante dans le domaine de l'immunologie en raison du fait qu'elle porte les déterminants de quelques épitopes spécifiques de groupes tissulaires : système ABO, antigènes Pr₂, T, Tn, Cad et M^g (Schauer *et al.*, 1997) (Fig. 8).

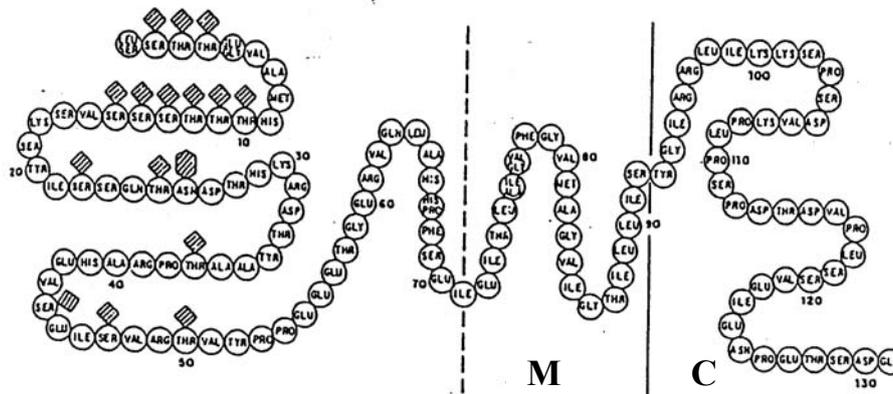


Figure 5 - Conformation de la molécule de glycophorine A avec ses trois domaines. M : segment intramembranaire ; C : segment cytoplasmique ; \diamond : O-glycannes ; $\textcircled{\text{■}}$: N-glycanne

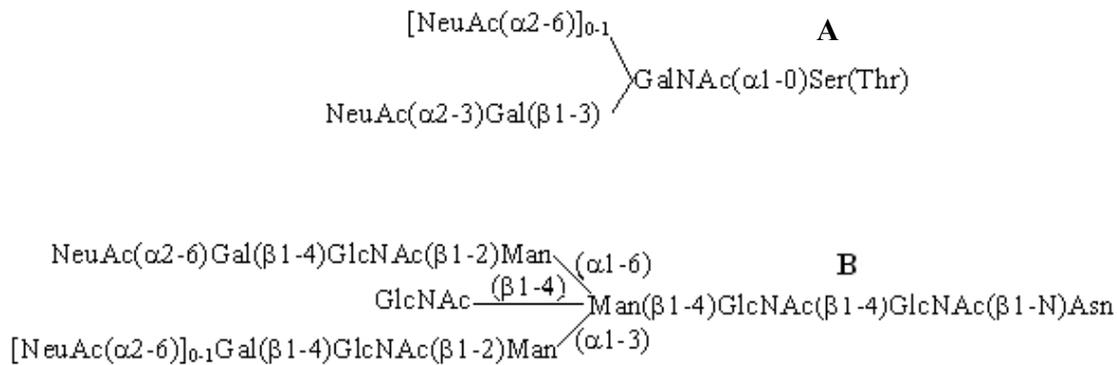


Figure 6 - Structure primaire de glycannes de la glycophorine liés O-glycosidiquement (A) et N-glycosidiquement (B).

Les déterminants antigéniques pour le système MNS sont localisés sur la chaîne peptidique des glycophorines A et B. Les autres glycophorines sont présentes en petites quantités et ne sont pas encore bien caractérisées.

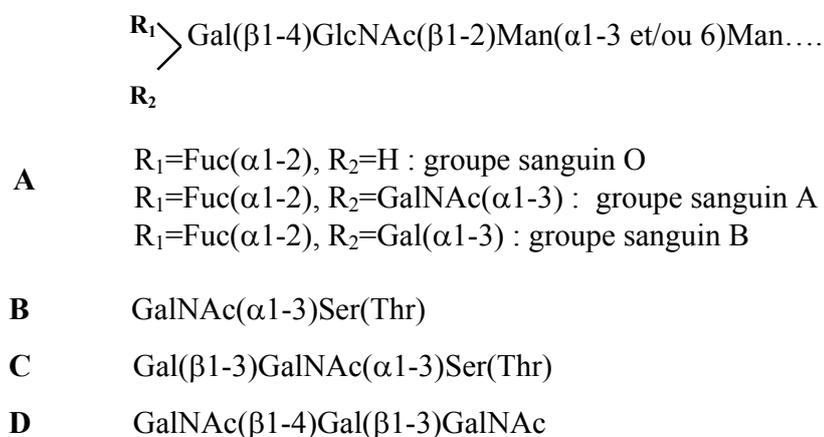


Figure 7 - Relation structure-activité d'antigénique de groupes tissulaires en position terminale d'un glycanne. A: système ABO ; B: épitope de groupe T ; C: épitope de groupe Tn ; D: épitope de groupe Cad.

2.1.2. La bande 3 est composée de deux domaines protéiques bien distincts du point de vue structural et fonctionnel (Fig. 8, p.26). Le domaine C-terminal (55 kDa) traverse les couches lipidiques de la membrane et contrôle les échanges anioniques. Le domaine amino-terminal (43kDa) est cytosolique et interagit avec l'ankeyrine. Sa fonction est d'ancrer au cytosquelette la bande 3 accompagnée de l'hémoglobine et du complexe enzymatique de la chaîne d'Embden-Meyerhof qui est le seul système de production d'énergie génératrice d'ATP pour les érythrocytes, *via* l'acide phospho-énolpyruvique (Fig. 9).

Des études ont prouvé l'importance de la bande 3 dans le maintien de l'homéostasie et de la forme discocytaire de l'hématie en particulier. Par son rôle dans l'échange des anions, elle peut-être impliquée dans la régulation du pH du sang (Jay, 1996). La structure de la bande 3 est soumise à un contrôle lié au développement de l'hématie. En effet, les glycanes de type poly-N-acétyllactosaminique sont courts chez les érythrocytes fœtaux, mais se transforment en chaînes plus longues et plus branchées dans la première année de la vie. Ce changement produit la conversion des érythrocytes de groupe i en érythrocytes de groupe I (Viitala *et al.*, 1985). La bande 3 porte, elle aussi, les épitopes glucidiques des groupes ABO.

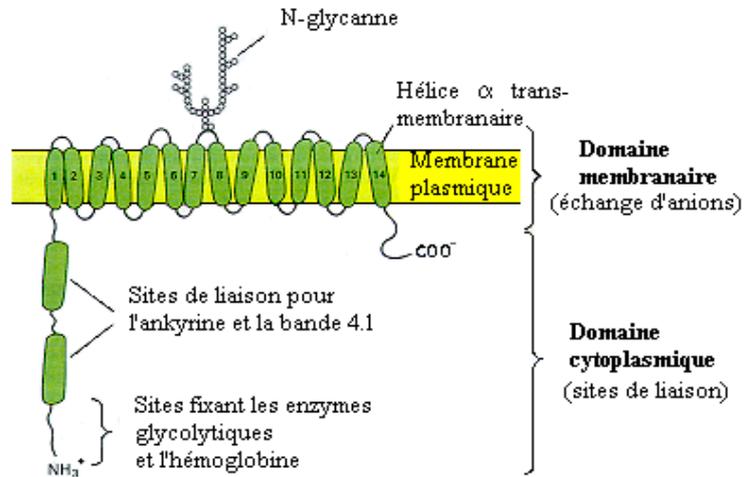


Figure 8 - Disposition de la protéine de la bande 3 dans la membrane de l'érythrocyte. On n'a dessiné qu'un des deux polypeptides jumeaux. La protéine de la bande 3 ne se lie pas seulement à l'ankyrine du cytosquelette, mais aussi aux enzymes glycolytiques et à l'hémoglobine (Lodish *et al.*, 1997)

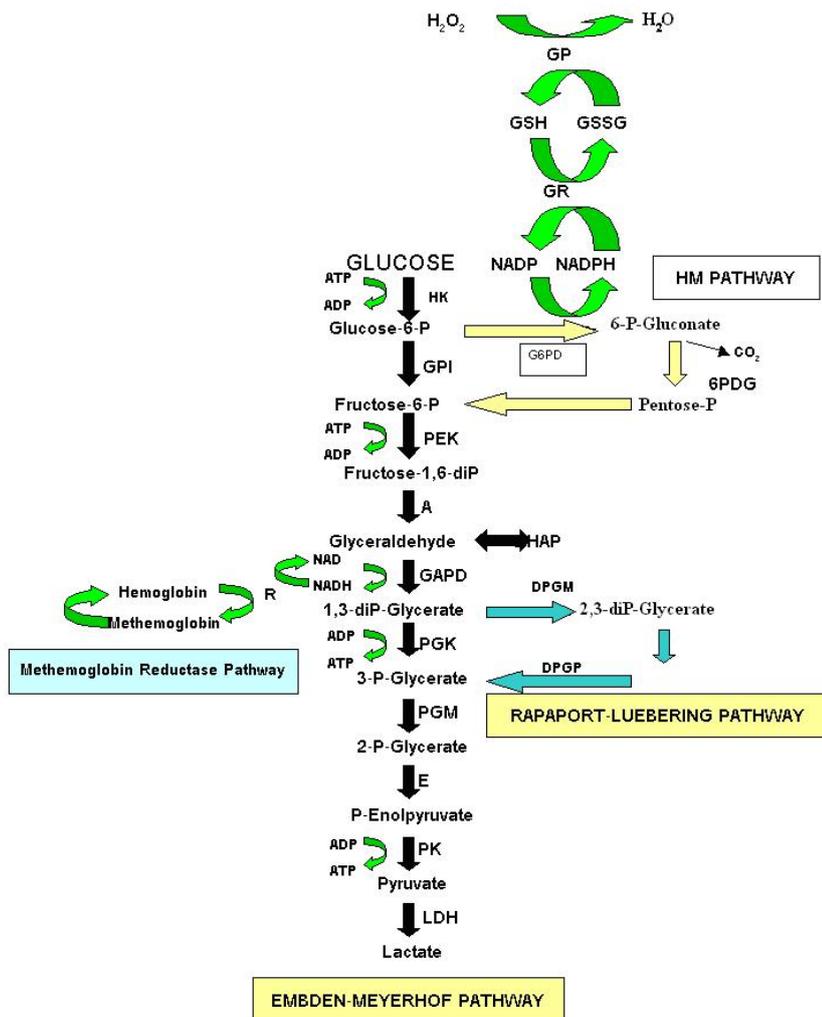


Figure 9 - Schéma des principales voies métaboliques de l'érythrocyte : la glycolyse, le 2,3 DPG shunt et la voie des pentose phosphates.

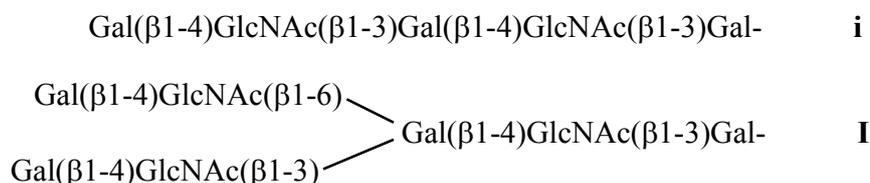


Figure 10 - Epitopes des groupes tissulaires i et I

Des résultats récents suggèrent que la bande 3 forme le noyau d'un macrocomplexe des protéines intégrées et périphériques de la membrane érythrocytaire (Fig. 11). La présence de ces protéines dans un seul macrocomplexe montre que ces protéines peuvent avoir des rôles liés, fonctionnels ou régulateurs. Ce macrocomplexe peut fonctionner comme une unité intégrée d'échanges gazeuse CO_2/O_2 (metabolom) dans l'érythrocyte. (Bruce *et al.*, 2002).

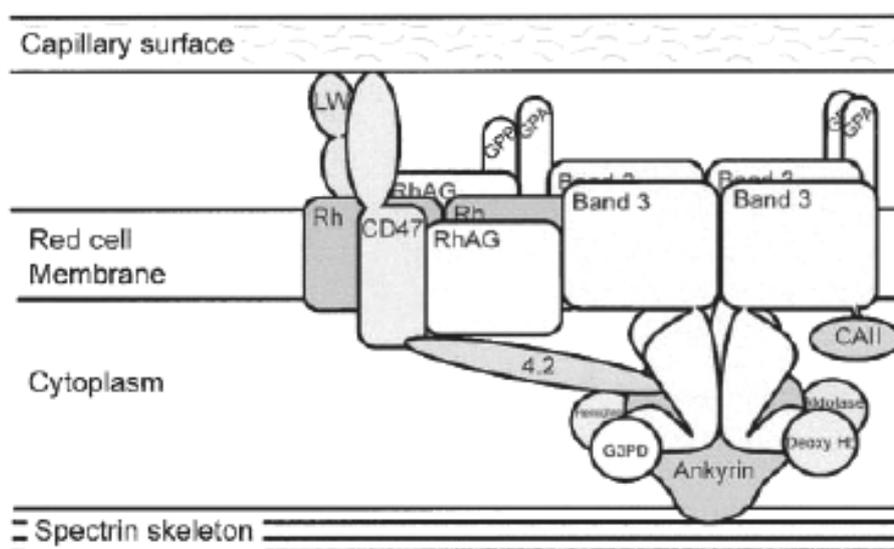


Figure 11 – Structure du macrocomplexe de la bande 3. Diagramme schématique montrant des interactions probables des protéines qui forment le macrocomplexe de la bande 3. Des tétramères de la bande 3 sont attachés au cytosquelette de spectrine par l'ankyrine. La région acide N-terminale du domaine cytoplasmique de la bande 3 lie la désoxy-hémoglobine, les hemichromes, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PD) et l'aldolase (Zhang *et al.*, 2000). La queue cytoplasmique courte C-terminale de la bande 3 lie l'anhydrase carbonique II (CAII) (Sterling *et al.*, 2001). Le dimère de GPA est situé près du domaine membranaire de la bande 3. La protéine 4.2 lie l'ankyrine, la bande 3 et CD47 (chez l'Homme) fournissant un lien entre le complexe Rh et la bande 3 (Bruce *et al.*, 2002). CD47 et LW sont étroitement associés au Rh

tétramères (Cartron, 1999) et peuvent être impliqués dans des interactions d'adhésion avec la surface du capillaire (Brown et Frazier, 2001 ; Spring *et al.*, 2001). Le tétramère de Rh est associé directement à la bande 3. GPB s'associe aux tétramères Rh (Cartron, 1999) et GPA et GPB peuvent former des hétérotétramères fournissant ainsi un autre lien entre le complexe Rh et le complexe de la bande 3 (D'après Bruce *et al.*, 2003).

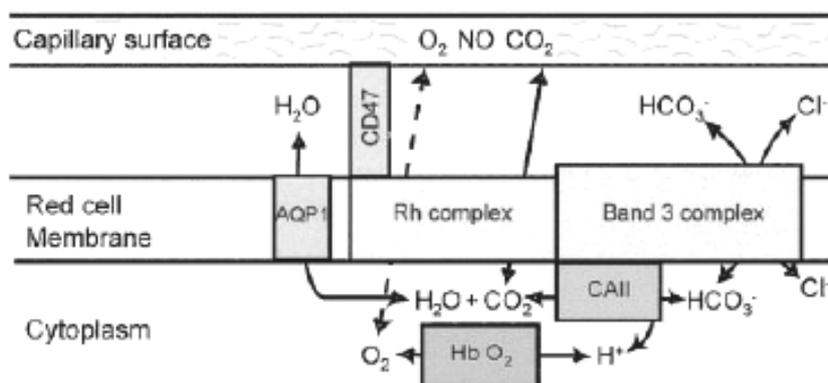


Figure 12 - Métabolisme d'échange gazeux de la membrane de l'hématie. Le modèle suggère que le CO_2 passe de la cellule endothéliale aux hématies par les protéines Rh. CAII convertit CO_2 et H_2O en HCO_3^- et un proton, puis HCO_3^- sort de l'hématie via la bande 3 en échange d'un ion Cl^- . L'élimination de HCO_3^- laisse un proton qui favorise une acidification locale dans la proximité de la bande 3 et le dégagement de l'oxygène de l'oxy-hémoglobine par l'effet Bohr. L' O_2 peut alors quitter l'hématie via le canal Rh d'échange gazeux et passer dans les cellules endothéliales. Le passage du substrat par ce métabolisme réduit la perte de substrat par diffusion du système. Dans les microcapillaires pulmonaires, le système serait inversé. Les mouvements de l'eau impliqués dans l'hydratation/déshydratation du CO_2 se font via par l'aquaporine 1 (AQP1) (Reithmeier, 2001) bien que ce composé ne soit pas directement associé au macrocomplexe de la bande 3 (D'après Bruce *et al.*, 2003).

2.1.3. La bande 4.5. La bande 4.5 contient une bande diffuse de protéines qui présentent un seul glycanne de type N-acétyllactosaminique très hétérogène, lié N-glycosidiquement et qui semble posséder une structure analogue à celle qui existe dans la bande 3. Cette protéine est responsable du transport du glucose par la membrane. Liée à la bande 3, la bande 4.5 traverse 14 fois la membrane (Fig. 9 ; p. 26).

2.2. Protéines périphériques du cytosquelette

Le cytosquelette est le résidu insoluble qui reste après le traitement de la membrane avec les détergents non-ioniques comme le Triton X-100. Il est associé à la surface cytoplasmique de

la membrane et est formé par différents polypeptides qui interagissent fortement entre eux et avec les protéines transmembranaires.

Le cytosquelette possède dans sa structure trois composants majeurs : la spectrine (bandes 1 et 2), l'actine (bande 5) et l'ankyrine (bandes 2.1, 2.2, 2.3 et 2.6).

2.2.1. La spectrine est le composant majeur du cytosquelette (2.5×10^5 copies par cellule). Deux dimères de spectrine, composés chacun des chaînes polypeptidiques α et β s'adosent tête-à-tête dans un tétramère long de 200 nm. Les bandes de plusieurs tétramères sont pontés au niveau de complexes de jonction contenant de petits filaments d'actine. Des protéines comme la tropomyosine et l'adducine se fixent alors à la spectrine.

2.2.2. L'actine, un autre composant majeur du cytosquelette, est liée à la spectrine par l'intermédiaire de la bande 4.1. Elle fait partie du complexe de jonction et représente l'une des deux protéines qui assurent la continuité entre le cytosquelette et la membrane plasmique. La bande 4.1 joue un rôle clé dans le maintien de l'intégrité de la membrane érythrocytaire et tout déficit en cette protéine provoque des anémies hémolytiques sévères. Elle existe sous deux formes 4.1a (80kDa) et 4.1b (78kDa). Mueller *et al.*, (1987) ont démontré, en utilisant une technique d'hypertransfusion sériée chez la Souris, que l'altération la plus évidente pendant le vieillissement *in vivo* est l'augmentation du rapport 4.1a/4.1b qui a été proposé comme *index de vieillissement* des hématies. Elle pourrait être responsable des déformations de la membrane observées chez les formes échinocytaires des hématies sénescents.

2.2.3. L'ankyrine unit, elle aussi, la coque fibreuse du cytosquelette à la membrane plasmique. Elle possède deux domaines : l'un s'attache spécifiquement et fortement à une zone particulière de la chaîne β proche du centre du tétramère de spectrine et l'autre se lie à une région de la protéine de la bande 3 qui flotte dans la cytosol. Dans les fantômes d'érythrocytes obtenus par lyse des cellules et dans les cellules intactes, la majorité des molécules de la bande 3 sont immobiles et incapables de diffuser dans le plan membranaire à cause de leurs interactions avec le cytosquelette. Jusqu'à preuve du contraire, il semble que la glycophorine soit, elle aussi, immobile.

III. LA MORT PROGRAMMEE DES HEMATIES MARQUE LA FIN D'UN PHENOMENE APOPTOTIQUE

La vie des hématies est limitée à 120 jours au terme desquels elles sont capturées, puis phagocytées par les cellules réticulo-endothéliales, en particulier par les macrophages résidents de la rate, du foie et de la moelle osseuse. Chaque jour, 360 milliards d'hématies sont phagocytées – soit 5 millions par seconde – et aussitôt remplacées à partir de cellules souches en franchissant les différentes étapes. Ce phénomène fascinant soulève les deux questions suivantes : 1°) Quels sont les signaux qui prononcent la sentence de mort des seules cellules sénescents ? et 2°) Quels sont les mécanismes physiologiques qui déterminent la séquestration des hématies sénescents avec une telle précision ? En d'autres termes, quels sont les signaux spécifiques qui apparaissent dans la membrane des hématies sénescents et qui permettent aux macrophages de les distinguer parmi les autres hématies ? Enfin, le terme de "mort programmée" évoquant un mécanisme d'apoptose, dans quelle mesure peut-on penser que la mort programmée des hématies relève d'un mécanisme apoptotique ?

Les résultats accumulés depuis de nombreuses années par différents auteurs et dans notre laboratoire, en particulier, apportent les réponses à ces questions sur la base de la comparaison des caractéristiques des cellules nucléées en apoptose, d'une part, et des hématies sénescents, d'autre part (Pour une revue générale, voir Bratosin *et al.*, 1998, 2005 et, les résultats de Bratosin *et al.*, 2001 et de Berg *et al.*, 2001).

1. Différents types de mort cellulaire

Les concepts de "mort cellulaire programmée", de "suicide cellulaire" et "d'apoptose" ont profondément transformé la vision des relations que la vie entretient avec la mort et avec le temps. Ce qui est "programmé" n'est pas le destin individuel de chaque cellule, mais sa capacité de déclencher sa mort prématurée en fonction de ses interactions aléatoires avec son environnement. C'est un ensemble de phénomènes cellulaires au terme desquels la cellule meurt dans des conditions physiologiques. Ce programme actif d'autodestruction doit être distingué de la mort par **nécrose** qui survient lorsqu'une cellule se trouve dans des conditions non physiologiques.

Jusqu'à la caractérisation précise des points de contrôle biochimiques de mort cellulaire programmée (PCD), la morphologie nucléaire des cellules en train de mourir (Leist et Jäättelä,

2001) a été employée comme base alternative pour leurs classifications. Plusieurs reviews récentes décrivent en détail chaque type de mort cellulaire, leur régulation (Jäättelä, 2004; Kroemer, 2004; Meijer et Codogno, 2004) ainsi que leurs implications dans des différentes pathologies telle que le cancer (Debatin et Krammer, 2004; Blagosklonny, 2004).

Cette classification peu arbitraire est en grande partie fondée sur la description des événements morphologiques, peut, en soi, suggérer des mécanismes moléculaires distincts. La nécrose se produit principalement en conditions pathologiques, telles que l'ischémie myocardique et cérébrale. Elle n'est pas clairement génétiquement programmée, mais est le point final des dommages toxiques très graves. La nécrose peut être secondaire à l'apoptose, par exemple en présence de signaux contradictoires. L'apoptose le type le plus prépondérant de mort cellulaire ("mort de cellules de type 1") peut être exécutée dans la plupart des cas par l'intermédiaire des voies qui ont d'homologies forte avec cela décrit par Bob Horvitz et ses collègues dans *Caenorhabditis elegans*. Il existe, en effet, dans chaque cellule vivante, un programme génétique de mort qui, s'il est mis en œuvre, entraîne sa disparition dans la plus grande discrétion. L'apoptose est un processus d'élimination cellulaire spontané, permettant d'assurer le renouvellement cellulaire. La mort cellulaire apoptotique intervient ainsi dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire de façon opposée à la mitose, dès l'embryogenèse. Les caractéristiques et les voies d'apoptose seront décrits plus en détail dans les sous-chapitres suivants. Les agents inducteurs de l'apoptose sont nombreux et variés et, à cet égard, nous ne citerons que les ions Ca^{2+} , les céramides, les radiations ionisantes, les antimétabolites, certaines protéines oncogènes et les virus. En règle générale, toute souffrance de la cellule déclenche sa mort par apoptose. C'est pourquoi le terme d'apoptose est devenu synonyme de mort programmée et de suicide cellulaire. Les cellules qui meurent par apoptose implorent plutôt que d'exploser comme dans la nécrose. La mort par apoptose est rapide et n'entraîne en général ni lésion, ni inflammation, ni cicatrisation, contrairement à la nécrose.

Cependant, dans quelques circonstances, une partie de ce programme peut être exécutée indépendamment des caspases. La morphologie de la mort « *caspase-indépendante* » n'est en fait pas différente de la mort cellulaire *via* les caspases. L'apoptose peut être opposé à d'autres types de mort de cellules tels que ("mort cellulaire type 2") la mort par **autophagie** de cellules, la catastrophe mitotique qui a lieu pendant la mitose (revue de Castedo *et al.*, 2004) , ainsi que la **nécrose (oncosis)**, selon des critères morphologiques tels que la condensation de la chromatine

(présente dans l'apoptose), l'accumulation des vacuoles autophagiques (exclusives pour le type 2 de mort), les dispositifs mitotique (en tant que chose observable dans la catastrophe mitotique) ou le gonflement massif des organelles cytoplasmiques (oncosis) (Jäättelä M., 2004).

La terme « **autophagie** » vient des mots grecs « individu » et « manger », et ont été inventés pour décrire comment une cellule, face à un manque de nutriments, dégrade ses propres composants intracellulaire pour survivre. Elle est, chez les Eucaryotes, l'une des voies principales de dégradation de protéine qui aide dans le "turnover" normal des constituants et des organelles cellulaires. Tandis que la dégradation par le protéasome est destinée aux protéines cytosoliques, la dégradation par autophagie inclut la dégradation des organelles entières (Ng et Huang, 2005). Il existe a trois types identifiables d'autophagie : la **macroautophagie**, la **microautophagie** et la "**chaperone mediated autophagy**".

La **macroautophagie** (associé souvent à l'autophagie) commence par la formation d'une structure double- ou multi membranaire en forme de demi-cercle dans le cytosol qui entoure par la suite la cytoplasme et/ou les organites cytoplasmiques comme les mitochondries et fusion avec un lysosome, libérant à l'intérieur une vésicule ayant une membrane simple et appelé corps autophagique. La membrane et le contenu du corps autophagique sont ensuite dégradés par les protéases lysosomiales. Dans la **microautophagie**, le cytoplasme est englouti directement par la membrane lysosomale par l'intermédiaire de l'invagination de la membrane. La rapamycin, un antibiotique de la classe des lactones macrocycliques, est un puissant inhibiteur d'une serine/thréonine kinase, appelé Target of Rapamicine (TOR) qui est impliquée à son tour en réponse aux changements d'acides aminés intracellulaire et d'ATP, agit comme « gatekeeper » pour déclencher la voie autophagique. Une autre forme d'un processus « autophagy-like » est la **xénophagie** employée par la cellule pour la dégradation sélective des pathogènes intracellulaire qui n'implique pas la séquestration du contenu cytoplasmique par une membrane isolatrice (Levine, 2005). Des publications récentes défendent l'idée que l'autophagie représente, en effet, une stratégie de survie et non pas pour la mort des cellules animales tumorales (Edinger et Thompson, 2003), pour la production d'ATP, pour le "turn-over" des protéines et organelles quand l'environnement est pauvre en nutriments (revue in Edinger et Thompson, 2004 ; Klionsky et Emr, 2000). Cependant, les conditions qui mènent à l'exécution préférentielle d'une voie ou d'une autre ne sont toujours pas claires et leur signification dans la carcinogenèse restes à élucider. (Ng et Huang, 2005).

Certaines cellules peuvent subir des morts différentes comme par exemple les neurones avec la **mort excitotoxique** (après exposition à des concentrations élevées de glutamate), gonflent transitoirement, se rétrécissent et leur noyau se condense. Par la suite, elles externalisent la phosphatidylsérine. Néanmoins, cette distinction claire n'est probablement pas appropriée en termes fonctionnels car les mêmes stimuli mortels peuvent déclencher différents programmes de mort des cellules selon le contexte cellulaire, le contenu d'ATP, par exemple (Melino et Nicotera, 2004) et tandis que les voies de la mort existent dans pratiquement chaque cellule, elles pourraient être employée différemment (Melino *et al.*, 2005).

L'apoptose en réponse aux interactions inadéquates des cellules avec la matrice extracellulaire (ECM) s'appelle **anoïkis**, un terme grec qui signifie « sans domicile » et qui implique un cas spécial de mort cellulaire, l'anoïkis liant le destin de la cellule à son lieu de résidence (Ameisen, 2005). Dans la pratique, les différents types de cellules emploient des mécanismes divers pour interpréter les signaux de la matrice extracellulaire. Anoïkis est un mécanisme essentiel pour maintenir la position correcte des cellules dans les tissus. L'induction d'anoïkis se produit quand les cellules perdent l'attachement à la matrice ou adhère à un type inadéquat de la matrice extracellulaire ce dernier étant le plus fréquent *in vivo* (Gilmore, 2005). La **dégénérescence wallérienne** est une destruction antérograde des axones et de leur gaine de myéline liée à des lésions axonales proximales ou à la mort du corps cellulaire. La lésion en cause est le plus souvent ischémique. Cependant, une origine hémorragique, tumorale ou une lésion démyélinisante ont été décrites (Bazarbacha *et al.*, 2005).

L'hématies se place dans la phase terminale d'un processus apoptotique (Revue in Testa, 2004) appelé **l'érythroptoïèse**. Des détails supplémentaires seront donnés dans le sous-chapitre 5.8.

Récemment sont apparus dans la littérature, de nouveaux termes qui désignent différents types de mort cellulaire : **paraptosis** (Sperandio *et al.*, 2000) différente de l'apoptose, mais qui est programmée parce qu'elle demande l'expression des gènes ; **eryptosis** (Lang *et al.*, 2005); **l'apoptose CD-47 dépendante et caspase-indépendante** (revue in Lorenzo et Susin, 2004) – la morte induit par un anticorps anti-CD47 semble être indépendante des voies de signalisation décrites pour l'apoptose classique dans laquelle les cellules mourantes présentent des noyaux intacts ou peu modifiés (absence de fragmentation oligonucléosomique).

2. Caractéristiques des cellules apoptotiques

Toutes les cellules apoptotiques présentent des caractéristiques identiques qui sont les suivantes :

- Modification de la morphologie par formation de boursofflures ("blebbing") de la membrane due à la destruction du cytosquelette sous l'action de protéases spécifiques.
- Perméabilisation de la paroi des mitochondries par diminution du potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$ entraînant la diffusion dans le cytosol de cytochrome c et de l'AIF (Apoptosis Inducing Factor).
- Influx de Ca^{2+} dans le cytoplasme.
- Désialylation des glycoconjugués membranaires.
- Externalisation de la phosphatidylsérine et/ou de la thrombospondine.
- Activation de protéases spécifiques de l'apoptose.
- Fragmentation du noyau sous l'action d'endonucléases spécifiques.
- Émission de vésicules appelées "corps apoptotiques" qui contiennent des fragments de noyaux et des inclusions cytoplasmiques enveloppés dans la membrane plasmique et qui sont capturés, puis phagocytés par les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules bordantes.

L'apoptose correspond à une rétraction progressive de la cellule, avec condensation de la chromatine et du cytoplasme, suivie d'une fragmentation caractéristique de l'ADN aboutissant à la formation de fragments cellulaires ou corps apoptotiques. Les organites intracellulaires contenus dans les corps apoptotiques sont structurellement intacts. Les corps apoptotiques formés sont ensuite phagocytés par les macrophages ou des cellules épithéliales de voisinage normales. La formation de corps apoptotiques avec membrane plasmique intacte prévient le largage des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire. L'apoptose nécessite la participation active de la cellule pour son propre mort par des événements intracellulaires sous contrôle génétique. L'apoptose est ainsi un mécanisme prédéterminé et constitue une forme de mort cellulaire programmée, contrairement à la nécrose qui est une forme de mort cellulaire passive, toujours pathologique, déclenchée par une agression.

Dans la majorité des cellules, une multitude de changements se produisent au cours de la cascade d'événements apoptotiques. Ces événements morphologiques et biochimiques constituent

les traits caractéristiques de l'apoptose et suggèrent la présence d'une voie de mort cellulaire conservée au cours de l'évolution (Wyllie *et al.*, 1980). Il existe deux voies principales de déroulement de l'apoptose : la *voie des récepteurs de mort* (voie extrinsèque) et la *voie mitochondriale* (voie intrinsèque).

3. Voies de déroulement de l'apoptose

3.1. Voie des récepteurs de mort

Certains membres de la superfamille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNF-R), regroupés sous le terme de « récepteurs de mort », comportent une région intracellulaire appelée « domaine de mort » (Death Domain –DD, en anglais) permettant la transmission dans la cellule du signal de mort. Les plus connus de ces récepteurs de mort sont CD95/Fas/Apo-1 et TNF-RI (Locksley *et al.*, 2001). L'interaction du récepteur de mort avec son ligand entraîne la trimérisation du récepteur et, par conséquent, le rapprochement des DD. Chaque DD est associée à un « domaine effecteur de mort » (Death Effector Domain –DED, en anglais). Le recrutement vers la membrane des DED a pour effet d'attirer des unités de procaspase-8 (la procaspase-8 possédant également une séquence DED) pour former un complexe appelé DISC («Death Inducing Signaling Complex» = complexe de signalisation de l'induction de la mort).

3.1.1. La voie du Fas/APO-1/CD95

La protéine Fas joue un rôle essentiel. Exprimée à la surface des cellules de nombreux tissus dont le foie et les lymphocytes T cytotoxiques, elle constitue un récepteur pour le ligand Fas dont l'expression est restreinte aux lymphocytes T cytotoxiques et aux cellules Natural Killer (cellules NK) activées. La liaison de Fas à son ligand déclenche l'apoptose. Par le biais de ce système, le lymphocyte T cytotoxique peut induire l'apoptose d'une cellule cible. Une autre voie complémentaire, celle des enzymes cytolytiques (granzymes et perforine) permet aux lymphocytes T cytotoxiques d'induire une réaction de cytotoxicité par apoptose. Pour Fas, le DISC est constitué de trois récepteurs Fas transmembranaires liés au niveau cytosolique avec trois unités adaptatrices FADD (Fas Associated Death Domain) qui elles-mêmes sont couplées à trois molécules de procaspase-8 inactive. La formation du DISC (Death Inducing Signaling Complex) induit le rapprochement des unités de procaspases-8. Elles peuvent donc s'autoactiver

pour engendrer des molécules de caspase-8 actives (fig. 13). On connaît actuellement plusieurs substrats de la caspase-8. En effet, elle clive la protéine Bid. Bid est inactive sous sa forme native, mais la forme tronquée (appelée tBid), va s'intégrer dans la membrane externe mitochondriale pour transmettre le signal apoptotique (voir la voie mitochondriale) (Crompton, 2000). Elle active la procaspase-3 en caspase-3 qui possède de nombreux substrats comme ICAD, la gelsoline, les lamines nucléaires et PAK2 (p21 Activated Kinase-2) (Zheng *et al.*, 1998). Ces différentes protéolyses tantôt activatrices, tantôt inhibitrices sont impliquées dans la morphologie de la cellule apoptotique (comme la formation des boursoflures ("blebs") et la fragmentation nucléaire). Cette voie est régulée par la protéine cytoplasmique FLIP (« FLICE Inhibitory Protein », sachant que FLICE est la caspase-8) qui inhibe la formation du complexe DISC par capture de la procaspase-8. L'ensemble de ces mécanismes sont illustré dans la figure 13 (p. 37).

3.1.2. La voie du "Tumor Necrosis Factor" (TNF)

Quand le récepteur de TNF (TNFR-55kDa) est lié au TNF, le signal régulateur de croissance est transmis dans la cellule. TNF est mitogène pour les cellules normales et cependant il lance la mort programmée de cellules causant la fragmentation de l'ADN et la cytolysse. Attaché à son ligand, TNFR se trimérise et recrute la protéine adaptatrice TRADD (TNFR-Associated Death Domain) aussi bien que d'autres domaines de mort contenus dans des protéines telles que la RIP (Receptor Interacting Protein), le RAIDD (Receptor-interacting protein-associated ICH1_CED-3 homologous protein with a Death Domain) et le FADD (Fas Associated Death Domain). Le recrutement de ces protéines conduit à l'activation d'une cascade de caspases et finalement à l'apoptose. D'autre part, la voie de survie cellulaire TNF-induite est médiée par le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells). L'activation de NF- κ B se produit par l'intermédiaire de la phosphorylation d'I κ B (Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells), ayant pour résultat la dissociation et la localisation nucléaire de NF- κ B actif. Des études récentes ont démontré que les cellules dans lesquelles la voie de signalisation NF- κ B est bloquée sont prédisposées à subir l'apoptose en réponse à TNF. Par conséquent, NF- κ B peut jouer un rôle critique dans la capacité de TNF d'agir en tant qu'inducteur d'apoptose et agent anti-tumoral. L'ensemble de ces mécanismes sont illustré dans la figure 14 (p. 38).

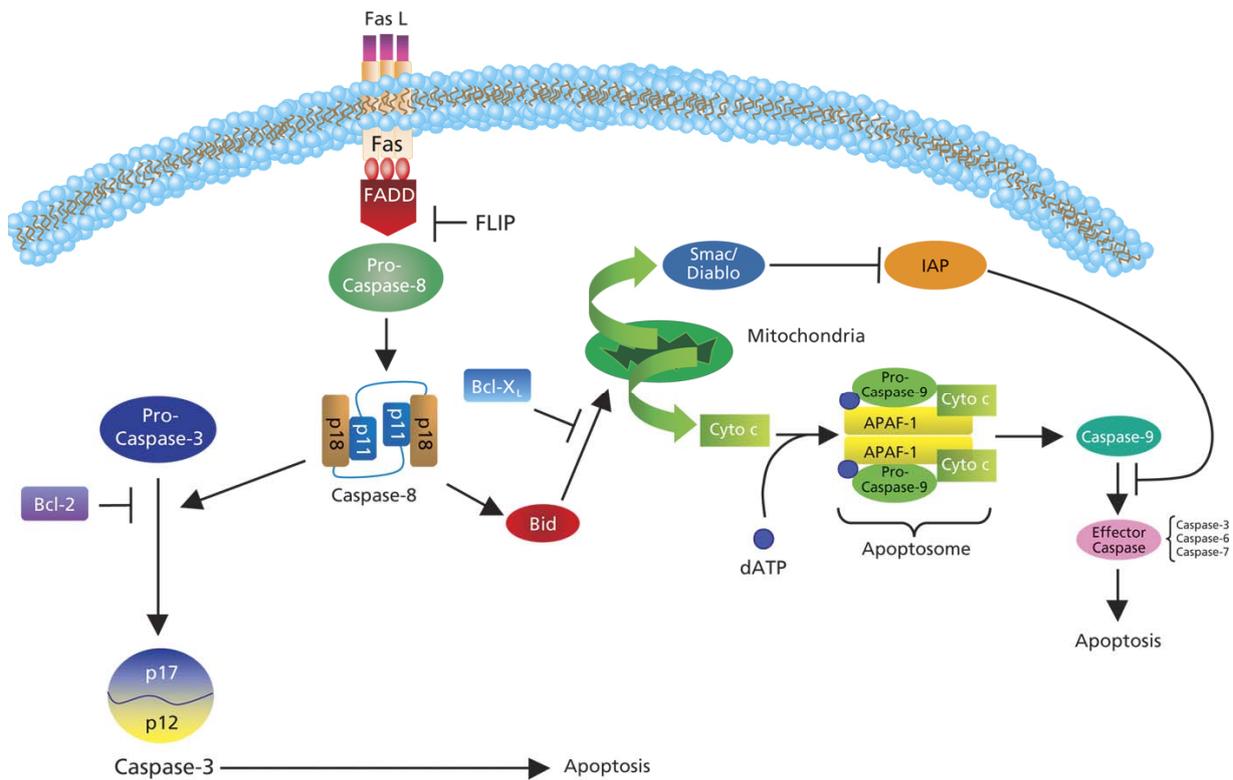


Figure 13 - La voie du Fas. L'interaction avec le Fas ligand (Fas-L) induit le trimérisation du Fas dans la membrane de cellules cibles qui, ainsi activé, recrute FADD (Fas-associated death domains) par la voie d'interactions avec le domaine de mort du Fas et FADD. La procaspase-8 est recrutée par le système Fas-FADD *via* des interactions entre le domaine effecteur de mort (DED : death effector domain) du FADD et le proenzyme, conduisant ainsi à l'activation de la caspase-8. Une fois activée, la caspase-8 active elle-même 9 autres caspases, induisant ainsi une cascade de caspases qui mène finalement à l'apoptose. Les caspases clivent la laminine nucléaire conduisant à la cassure du noyau. L'apoptose Fas-induite peut être efficacement bloquée à plusieurs étapes par la protéine FLICE-inhibitrice (FLIP), par Bcl-2 ou par le modificateur A de la réponse des cytokines (CrmA : cytokine response modifier A). D'ailleurs, la caspase-8 peut activer Bid qui peut alors s'associer aux mitochondries et favoriser la fuite du cytochrome c. En présence d'ATP, le cytochrome c complexe et active Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor 1) qui se lie alors aux caspases en aval, comme la pro-caspase-9, et les active. Ainsi commence la "cascade des caspases". En outre, Smac/Diablo est libéré des mitochondries et bloque les protéines IAP (Integrin-Associated Protein) qui normalement interagissent avec la caspase-9 pour empêcher l'apoptose (Figure extraite d'un document SIGMA).

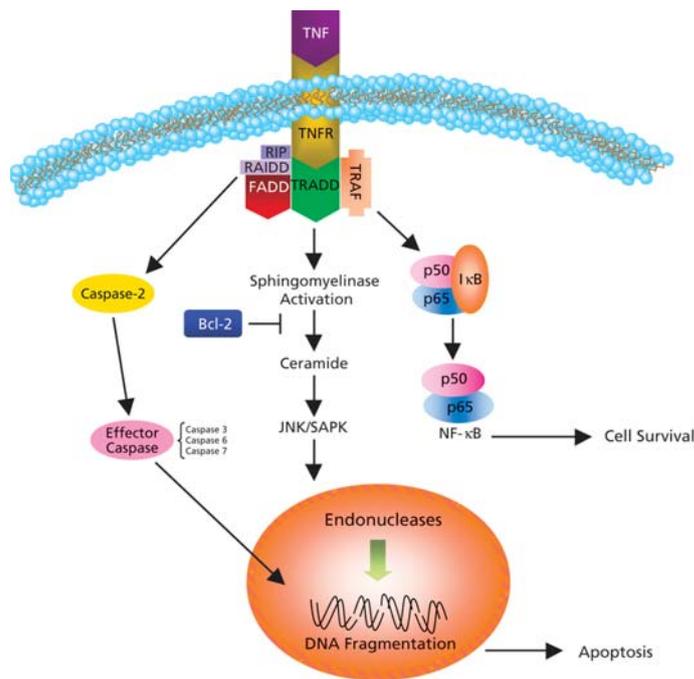


Figure 14 - La voie du TNF (Figure extraite d'un document SIGMA)

3.1.3. La voie ATM/p53c.

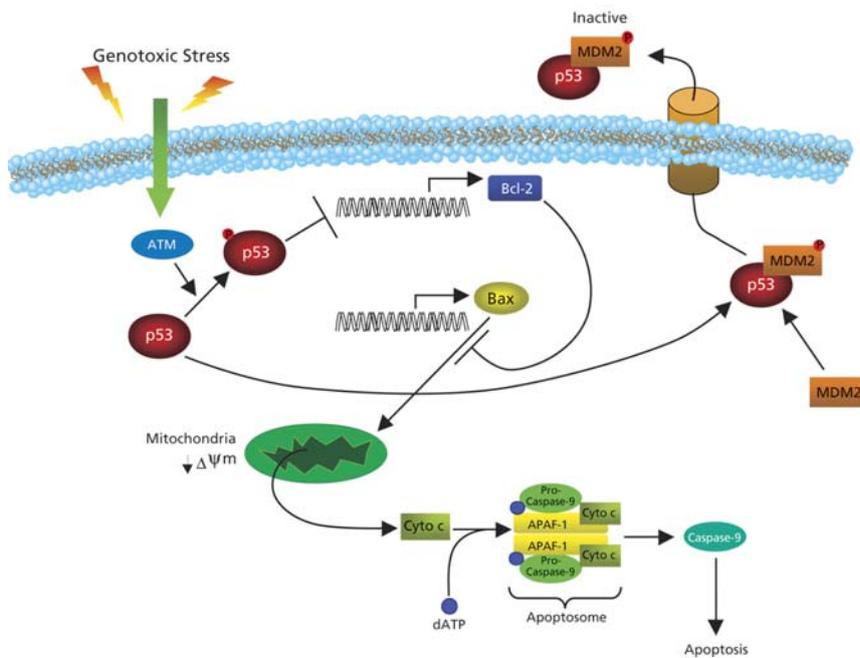


Figure 15 - La voie ATM/p53c. Le gène muté de la télangiectasie (ATM) code une protéine kinase qui agit en tant que suppresseur tumoral. L'activation d'ATM, via des dommages à l'ADN, stimule la réparation d'ADN et bloque la progression du cycle cellulaire. Un mécanisme par lequel ceci se produit est la phosphorylation ATM-dépendante de p53. p53 peut causer l'arrêts de la croissance cellulaire à un carrefour qui permet soit la réparation de d'ADN,

soit le déclenchement de l'apoptose si l'ADN endommagé ne peut pas être réparé (Figure extraite d'un document SIGMA).

3.2. Voie mitochondriale de l'apoptose

Les mitochondries subissent deux changements principaux pendant l'étape préliminaire de l'apoptose. D'une part, la membrane mitochondriale externe devient perméable aux protéines, ayant pour résultat la libération des protéines solubles inter-membranaire (SIMPs) de la mitochondrie : cytochrome c et facteur d'induction de l'apoptose (AIF : apoptosis inducing factor) entraînant l'activation des caspases et des DNases (Kluck *et al.*, 1997). D'autre part, le potentiel mitochondrial de la membrane interne ($\Delta\Psi_m$) est réduit et il semble que l'altération de la fonction mitochondriale soit une caractéristique universelle qui accompagne l'apoptose, indépendamment du stimulus et du type cellulaire concerné. La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) est un événement précoce de l'apoptose (Green et Kroemer, 1998 ; Green et Reed, 1998 ; Kroemer *et al.*, 1995 ; Kroemer et Reed, 2000) qui affecte, à la fois, les membranes mitochondriales externes et internes. La membrane mitochondriale externe devient perméable aux protéines, tandis que la membrane interne continue à maintenir les protéines de la matrice mitochondriale. En conséquence, seules les protéines de l'espace soluble intermembranaire sont libérées des mitochondries d'une manière massive et non-spécifique (Patterson *et al.*, 2000).

Dans la plupart des cas, les cellules manifestent une baisse du potentiel de la membrane mitochondriale interne ($\Delta\Psi_m$), phénomène qui précède souvent la dégradation de l'ADN (Cossarizza *et al.*, 1995; Marchetti *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1995 a,b). La diminution de $\Delta\Psi_m$ constitue un événement irréversible du processus apoptotique, réglé par des membres de la famille de Bcl2/Bax (Deshmukh *et al.*, 2000; Goldstein *et al.*, 2000; Hirsch *et al.*, 1997 ; Zamzami *et al.*, 1995b). La peroxydation des lipides induit aussi une diminution du potentiel mitochondrial (Carini *et al.*, 1992).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale est réalisée par le complexe PTPC (Permeability Transition Pore Complex) et est liée à la chute du potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$. L'organisation de ce complexe est schématisée dans la figure 16. Il résulte essentiellement de l'association de VDAC (Voltage – Dépendent Anion Channel) qui est une porine et de l'ADP

– ATP translocase, un transporteur qui intervient également dans le métabolisme énergétique de la cellule. Ce complexe pro-apoptotique est sous le contrôle d'onco- et d'anti – oncoprotéines des familles Bax/Bcl- 2 schématisées dans la figure 17 (pour des revues récentes, voir Belzacq *et al.*, 2002 et Tsujimoto., 2002). En conséquence, la perméabilisation de la membrane mitochondriale déclenche une série de réactions cataboliques qui ont comme résultat la mort des cellules.

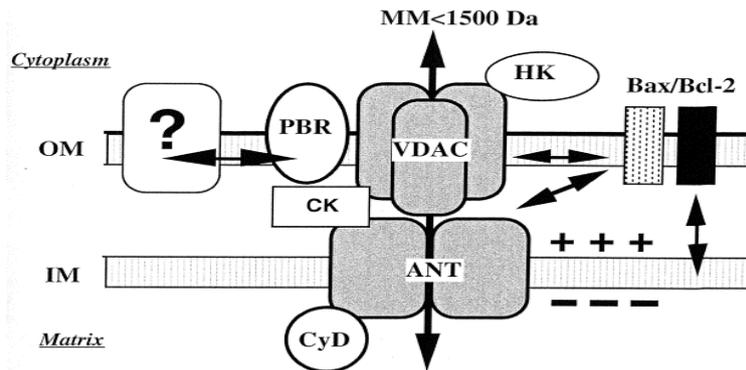


Figure 16– Schéma de l'organisation du complexe PTPC. ANT : adénine nucléotide translocase ; VDAC : voltage – dependent anion channel ; PBR : peripheral benzodiazepin receptor ; CyD : cyclophiline D ; HK : hexokinase ; CK : créatine kinase ; OM : outer membrane ; IM : inner membrane ; Bax, Bcl₂ : protéines oncogènes (D'après Belzacq *et al.*, 2002).

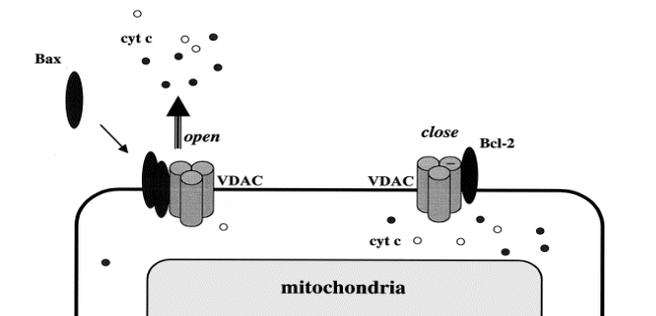


Figure 17 – Mécanisme du contrôle de la perméabilisation de la membrane mitochondriale par les protéines oncogènes Bax, pro-apoptotiques et Bcl-2, anti-apoptotiques (D'après Tsujimoto, 2002).

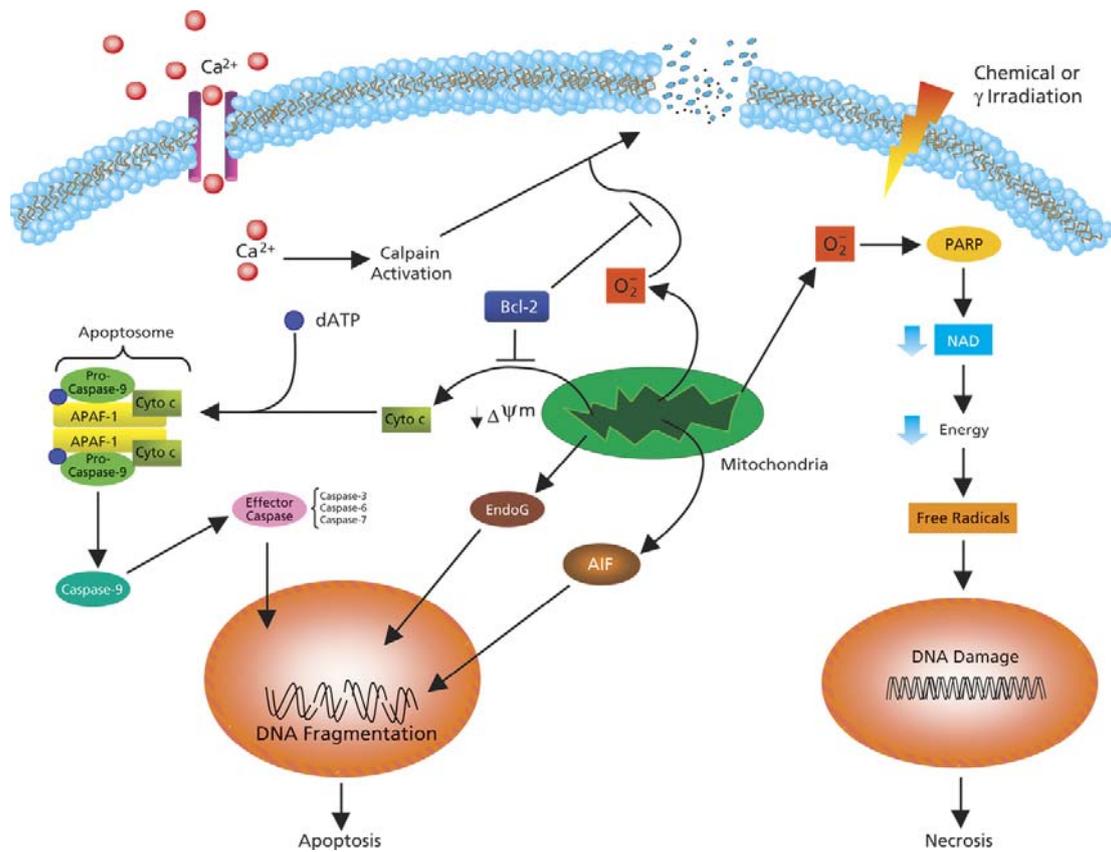


Figure 18 - Mitochondrie et apoptose. Les dommages oxydatifs dus à la production endogène des peroxydes (Reactive Oxygen Species ou ROS) par la mitochondrie peuvent mener à la mort de cellules par apoptose ou nécrose. L'augmentation des niveaux cytosoliques de Ca^{2+} peut induire une transition de perméabilité (PT) dans la membrane mitochondriale suivi du dégagement des protéines solubles inter-membranaire (SIMPs) de la mitochondrie : cytochrome c et AIF (Apoptosis Inducing Factor) avec l'activations des caspases et respective l'activation des DNases. Le cytochrome c, une protéine principale dans le transport d'électron et semble agir en formant les complexes multimerique avec Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor 1), une protéase, qui active alternativement la pro-caspase-9, et commence une cascade d'activation des caspases en aval. Bcl-2 et Bcl-X peuvent empêcher la formation de pores et bloquer le dégagement du cytochrome c, et par conséquent empêcher l'apoptose. PT est également liée à la génération mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène. Par contre, les niveaux élevés du stress oxydatif peuvent mener à l'activation de PARP (Poly-ADP-ribose polymérase). PARP activé cause des changements conformationnels de la structure de la chromatine permettant ainsi le recrutement des protéines de réparation d'ADN ou d'autres facteurs de transcription. Ce processus consomme une grande quantité de NAD⁺, causant un épuisement d'ATP menant à la nécrose (Figure extraite d'un document SIGMA).

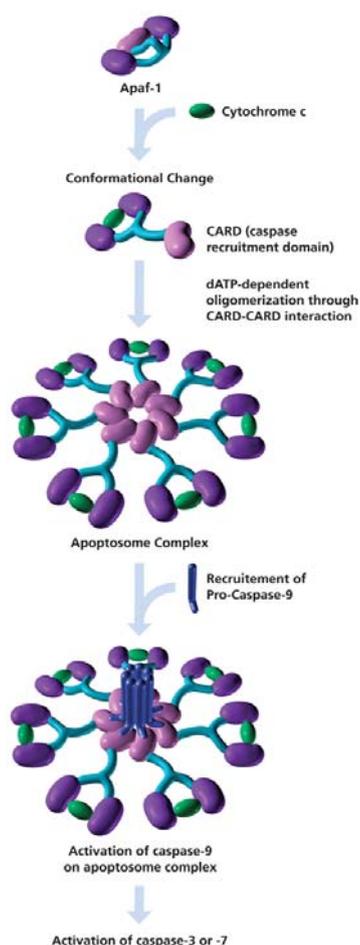


Figure 19 - Voie intrinsèque d'activation des caspases. Le cytochrome c libéré se lie à l'Apaf-1 en présence du dATP/ATP. Due à ce phénomène, l'Apaf-1 change de conformation permettant aux molécules d'Apaf-1 de s'associer les uns avec les autres. Cette formation a comme conséquence la formation d'une structure qui contient 7 molécules d'Apaf-1, de cytochrome c et d'ATP. La pro-caspase-9 contient un domaine de recrutement de caspase (CARD : caspase recruitment domain) qui est employé pour médier des interactions spécifiques avec l'Apaf-1 CARD, qui devient exposée sur l'apoptosome pendant l'assemblage. La pro-caspase-9 est auto-activée et, après clivage, la caspase-9 reste liée à l'apoptosome où peut activer ensuite des caspases exécutrices tels que les caspases -3 et -7 (Figure extraite d'un document SIGMA).

3.3. La voie lysosomale

En 2004, Guicciardi *et al.* décrivent une *voie lysosomale de l'apoptose*. Des protéases lysosomales peuvent, en effet, être libérées dans le cytosol où elles contribuent à la cascade apoptotique en amont des mitochondries. Le lysosome subit la perméabilisation de sa membrane en réponse à différents stimuli comme la photodestruction par UV, les peroxydes (agents ROS) et des médiateurs lipidiques tels que la sphingosine. La production intralysosomale de la céramide à partir de la sphingomyélinase acide activée est également liée à l'activation de la cathepsine D et à la perméabilisation de la membrane lysosomale. L'accumulation de ces agents dans les lysosomes *via* des réactions médiées par des enzymes tels que les cathepsines B et L a comme conséquence, des dommages membranaires et la libération des protéases lysosomales dans le cytosol. La destruction massive du lysosome déclenche la nécrose cellulaire, tandis qu'une destruction partielle et une perméabilisation sélective sont associées à l'induction de l'apoptose.

4. Molécules impliquées dans l'apoptose

4.1. Les caspases. Les caspases sont une famille de cystéine-protéases qui jouent un rôle crucial dans l'apoptose. L'activation de la caspase-3, un des exécuteurs principaux de l'apoptose est souvent considérée comme le point de non-retour dans l'apoptose et, ainsi, l'inhibition des caspases pourrait fournir un mécanisme d'arrêt de la cascade apoptotique. Les caspases contiennent un résidu fortement conservé de cystéine dans leur site actif. La famille des caspases se compose de 14 membres au moins chez les mammifères qui sont constitutivement exprimés dans presque tous les types de cellules comme proenzymes inactifs (zymogènes) qui deviennent actifs en réponse à une variété des stimuli apoptotiques. Les pro-caspases (32-56 kDa) contiennent quatre domaines : un prodomaine N-terminal, une grande sous-unité (17-21 kDa), une petite sous-unité (10-13 kDa) et une région courte de liaison entre les grandes et petites sous-unités (Earnshaw *et al.*, 1999). L'activation des caspases comporte le clivage protéolytique du proenzyme aux niveaux de résidus spécifiques d'aspartate entre les domaines, ayant comme résultat la délétion du pro-domaine aussi bien que de la région de liaison, conduisant ainsi à la formation d'un hétérodimère contenant une grande et une petite sous-unité (Liang et Fesik, 1997). La caspase active est un tétramère composé de deux hétéro dimères. Les caspases ont été classées en 3 groupes selon leur fonction dans la cellule. Ainsi, certaines caspases comme les caspases -2, -8, -9 et -10 sont dites « initiatrices ou caspases amont » et sont impliquées dans l'initiation du signal apoptotique. D'autres caspases, comme les caspases -3, -6 et -7 sont dites « effectrices ou caspases aval ». Elles sont impliquées dans la transduction du signal apoptotique et sont responsables de l'autodestruction de la cellule durant la phase effectrice de l'apoptose (Wolf et Green 1999). Enfin, certaines caspases, comme les caspases -1, -4, -5 et -11, ne sont pas impliquées dans le processus apoptotique, mais jouent un rôle important dans certains processus inflammatoires (Wang *et al.*, 1998). Le rôle des caspases -12, -13 et -14 qui sont les dernières caspases découvertes, reste indéterminé.

4.2. Le gène p53. Des mutations du gène p53 sont fréquemment trouvées dans des tumeurs animales et humaines et il est admis que le gène p53 est inactif fonctionnellement dans 70% des tumeurs humaines (Evan *et al.*, 1995). La forme sauvage de p53 agit comme un suppresseur de tumeur par activation du gène p21 WAF-1/Cip-1 dont le produit inhibe la kinase dépendant de la

cycline G1, arrêtant ainsi la progression du cycle cellulaire. Dans les conditions où une réparation de l'ADN est nécessaire, la cellule est bloquée en phase G 1, ce qui lui donne le temps de réparer son ADN. Lorsqu'une atteinte irréparable de l'ADN se produit, la cellule déclenche sa propre mort par apoptose. C'est pourquoi la forme sauvage de p53 est considérée comme le « gardien » du génome (Lane, 1992). Lorsque le gène p53 est muté, son produit ne permet plus l'arrêt du cycle cellulaire. La cellule échappe alors à ce système de contrôle et un phénotype malin de la cellule peut être engendré. Il est donc considéré de façon générale que les protéines issues d'un gène p53 muté exercent un effet anti-apoptotique. D'autre part, dans les cellules où le gène p53 n'est pas muté, il existe une régulation par p53 des gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2 et Fas (CD95) (King et Cidlowski, 1998). Le gène p53 sauvage active la transcription du gène codant pour Fas (CD95). Un mutant p53 sensible à la température diminue l'expression de Bcl-2 anti-apoptotique et augmente l'expression de Bax (pro-apoptotique) dans la lignée leucémique murine MI (King et Cidlowski, 1998). Plusieurs lignées de cellules leucémiques myéloïdes n'expriment pas la protéine P53 en raison de mutations du gène p53 (Sugimoto *et al.*, 1992). Dans ces lignées, l'implication de p53 dans la régulation du programme apoptotique est très improbable. Le rôle du p53 dans l'induction de l'apoptose et en même temps de suppresseur tumoral a été décrit en détail par Slee E. *et al.* (2004).

4.3. La famille des protéines Bcl-2. Le gène bcl-2 (dont le produit est la protéine Bcl-2) est le premier membre de cette famille à avoir été identifié. C'est un proto-oncogène impliqué dans le développement des lymphomes B humains. La famille des protéines Bcl-2 s'est beaucoup étendue et comprend à la fois des molécules pro-apoptotiques et des membres anti-apoptotiques (Gross *et al.*, 1999). Le ratio entre ces deux groupes contribue en partie à l'orientation de la cellule vers la mort programmée ou vers la survie (Hengartner, 2000). L'une des caractéristiques de ces molécules est leur capacité à former des homo- aussi bien que des hétéro-dimères permettant aux anti- et aux pro-apoptotiques de se neutraliser mutuellement. La classification de ces protéines est liée à la fois à leur structure et à leur fonction. Ces molécules possèdent jusqu'à 4 domaines d'homologie à Bcl-2, désignés comme BH1, BH2, BH3 et BH4 (segments en hélice- α). La plupart des molécules anti-apoptotiques ont conservé ces quatre domaines (exemple : Bcl-2 et Bcl-xL) et constituent le groupe I. Par contre, les molécules pro-apoptotiques (groupe II) comportent fréquemment une perte de la séquence BH4 (Bax, Bak, Bcl-xs). Des études de

délétion et de mutagenèse tendent à montrer que le domaine BH3 est d'importance cruciale pour les groupes de molécules de cette famille qui ont une fonction pro-apoptotique. Le groupe III est ainsi composé de protéines dites « BH3-domain-only » ne comportant que le domaine BH3 et ne comprend à ce jour que des molécules pro-apoptotiques dont l'une des mieux connues est Bid (Crompton, 2000). Cette protéine Bid constitue un lien entre les deux voies d'induction de l'apoptose. Certaines molécules de la famille Bcl-2 possèdent un domaine carboxy-terminal hydrophobe justifiant leur localisation membranaire, essentiellement au niveau du feuillet externe de la membrane mitochondriale. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont des protéines membranaires que l'on retrouve au niveau de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire. Par contraste, les molécules pro-apoptotiques sont essentiellement localisées au niveau du cytosol ou du cytosquelette avant l'initiation de l'apoptose et sont exportées vers la mitochondrie pour propager le stimulus apoptotique.

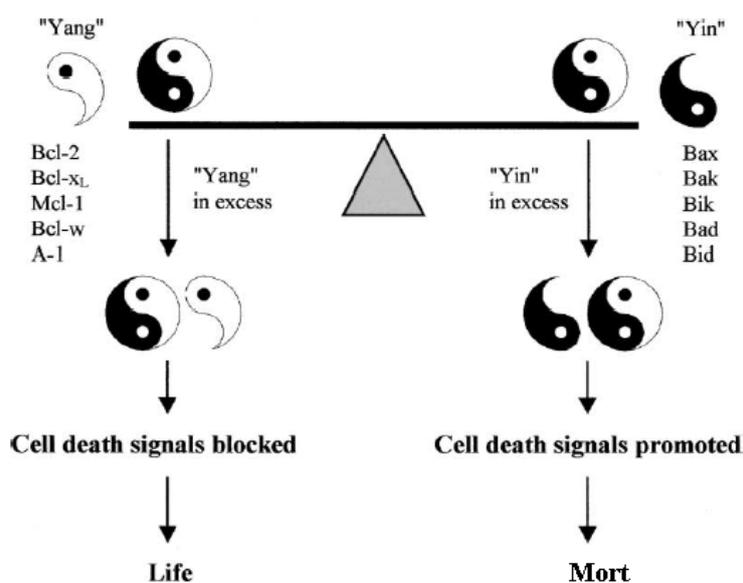


Figure 20 - Le « Yin » et le « Yang » moléculaires dans l'apoptose et le mécanisme du contrôle de l'apoptose cellulaire par les protéines oncogènes (D'après Ziwei Huang, 2002)

5. La mort programmée des hématies marque-t-il la fin d'un phénomène apoptotique ?

Les hématies humaines meurent-elles d'apoptose ? *A priori*, sur la base de bon nombre d'arguments, l'hypothèse d'un mécanisme apoptotique pouvait parfaitement être retenue comme hypothèse de travail mais les hématies ne possédant ni noyau, ni mitochondries qui sont les exécuteurs de la sentence de mort, ne peuvent mourir d'apoptose (Ralf, 1992 ; Green et Reed, 1998).

Tel est le dogme bien que ces cellules présentent la plupart des caractéristiques de cellules en apoptose :

5.1. Diminution progressive de la taille par émission de vésicules/modifications morphologiques de l'hématie. La diminution progressive de la taille illustrée par le Tableau II est liée à l'émission de vésicules. Ce phénomène s'accompagne de modifications morphologiques de l'hématie qui, comme le montre la figure 21, passe de la forme discocytaire (A) aux formes échinocytaires I, II et III (B, C et D) des hématies vieillissantes et, finalement, aux formes sphérocytaires (E et F) des hématies sénescents qui sont les seules à être capturées par les macrophages et qui sont les seules à être phagocytées. L'ensemble de ces phénomènes sont liés à une attaque dévastatrice de la spectrine du cytosquelette des hématies qui a été clairement illustrée par « Western blotting » à l'aide d'anticorps anti-spectrine par Berg *et al.*, 2001.

Tableau II - Diminution de la taille des érythrocytes au cours de l'évolution du pro-érythroblaste à l'hématie sénescence.

Nature des cellules	Dimensions
Pro-érythroblaste	16µm
Erythroblaste basophile I	13µm
Erythroblaste basophile II	12µm
Erythroblaste polychromatophile I	11µm
Erythroblaste polychromatophile II (expulsion du noyau et des mitochondries)	9µm 8µm
Réticulocyte	7,7µm
Érythrocyte jeune	6,7µm
Érythrocyte mature	6,2µm
Érythrocyte sénescence	

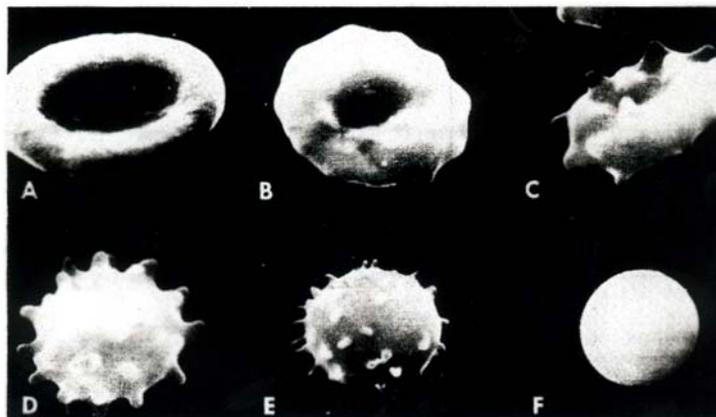


Figure 21 - Modifications de la morphologie des hématies humaines au cours de leur vieillissement. A: discocytes; B-D: échinocytes; E: sphéroéchinocytes avec spicules; F: échinocytes lisses (« smooth echinocytes »). Les formes A à D sont réversibles. Les formes sphéroéchinocytaires des hématies sénescentes E et F sont irréversibles et sont seules phagocytées (in Weed *et al.*, 1974).

5.2. Altération du cytosquelette par action des calpaïnes et de certaines caspases qui conduit à des modifications de la morphologie des cellules

5.3. Désialylation et capture des hématies par les macrophages. Les membranes des hématies sont riches en glycoconjugués – glycoprotéines et glycolipides – hautement sialylés à l'image de la glycophorine, une glycoprotéine de 31 kDa qui représente 52 p. cent des protéines totales membranaires et contient 25 p. cent d'acide sialique, soit 80 p. cent des acides sialiques totaux de la membrane. Sous l'action des neuraminidases membranaires parfaitement décrites et caractérisées par le groupe de G. Tettamanti (Chiarini *et al.*, 1993 ; Venerando *et al.*, 1997 ; Tringali *et al.*, 2001), les glycoconjugués membranaires sont progressivement désialylés (Bratosin *et al.*, 1995) induisant ainsi la capture des hématies par les macrophages et leur clairance du sang circulant (Halbhuber *et al.*, 1972 ; revue in Bratosin *et al.*, 1998). Cette désialylation peut être à la fois le résultat de la perte des glycoprotéines et/ou des glycolipides aussi par la formation des vésicules. Les acides sialiques ainsi libérés sont internalisés dans le cytosol de l'hématie par un récepteur membranaire où ils sont détruits en acide pyruvique et N-acétylmanosamine par une aldolase découverte par Bulai *et al.* (2003).

5.4. Perte de l'asymétrie de la double couche de lipides et externalisation de la phosphatidylsérine. Liée à l'asymétrie de la répartition des phospholipides dans la membrane érythrocytaire, la quasi-totalité de la phosphatidylsérine est, chez les hématies matures, en position intra-cytoplasmique. Au cours du vieillissement de l'hématie, elle est externalisée dans le feuillet lipidique externe, passant de 300 sites à 300.000 sites par cellules (Tait *et al.*, 1994) et, suivant le dogme actuel, elle est responsable de la phagocytose de l'hématie (Schroit *et al.*, 1985 ; McEvoy *et al.*, 1986 ; revue in Bratosin *et al.*, 1998). En même temps, l'externalisation de la phosphatidylsérine conduit à l'adhérence des hématies aux parois des cellules endothéliales (Manodori *et al.*, 2000). Le choc osmotique (Lang *et al.*, 2004a), le stress oxydatif, l'élimination du Cl⁻ extracellulaire ou la perte d'énergie, conduisent à l'augmentation d'une conductibilité non sélective des cations Ca²⁺ (Brand *et al.* 2003; Duranton *et al.* 2002, 2003; Lang *et al.* 2002, 2003a, 2005a), activant ainsi un canal membranaire perméable pour le Ca²⁺ vraisemblablement par l'intermédiaire de la prostaglandine 2 (PGE2) (Lang *et al.*, 2005b). L'entrée des ions Ca²⁺ mène à l'activation d'une scramblase sensible aux ions calciques qui expose la phosphatidylsérine à la surface de la membrane érythrocytaire. L'influx des ions Ca²⁺ dans le cytosol de l'hématie est bien connu depuis les travaux de Aiken *et al.* (1992) et de Romero et Romero (1999). L'éryptose est encore stimulée par la céramide qui est formé dans la cellule *via* l'activation PAF (Platelet Activating Factor)-dépendente d'une sphingomyélinase. La scramblase est sensibilisée aux ions calciques par la céramide (Lang *et al.* 2004).

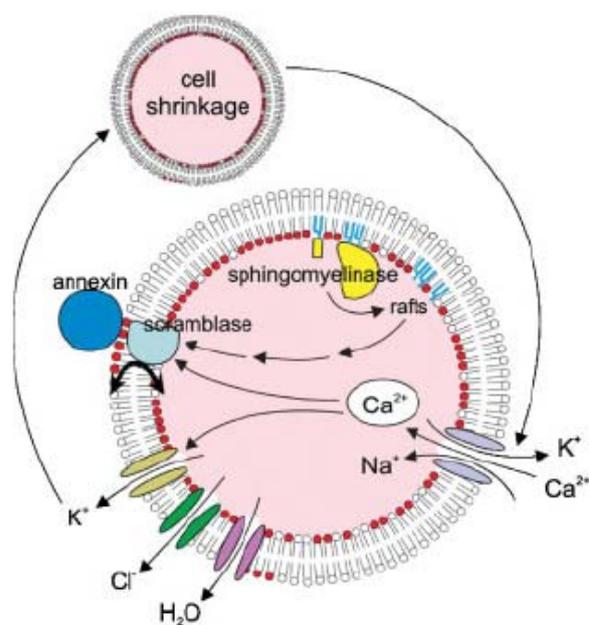


Figure 22 - Mécanismes contribuant à l'apoptose érythrocytaire suivant le choc osmotique. Le choc osmotique mène à la stimulation des canaux Ca²⁺-perméables, l'augmentation ultérieure de Ca²⁺ cytosolique active le canal sensible aux ions K⁺ (canal de Gardos) qui mène à la perte de K⁺ et ainsi au rétrécissement des cellules. Ca²⁺ active en outre une scramblase et l'asymétrie de la phosphatidylsérine membranaire est perdue. Le rétrécissement de la cellule active ensuite une sphingomyélinase et la céramide formée sensibilise la cellule au Ca²⁺ (D'après Lang *et al.*, 2004).

D'autres études se sont concentrées sur la mort Ca^{2+} -dépendante des érythrocyte (Lang *et al.*, 2003, Bratosin *et al.*, 2001) et l'externalisation de la phosphatidylsérine (Williamson *et al.*, 1992). L'effet des différents métaux sur l'externalisation de la phosphatidylsérine a été étudié : le plomb (Pb^+) (Kempe *et al.*, 2005) et le Hg^{2+} (Eisele *et al.*, 2006). Dans un premier temps ces métaux activent la conductance K^+ -sélective clotrimazole sensitive (activation des canaux pour le K^+) et dans un deuxième temps vont activer la scramblase érythrocytaire qui externalise la phosphatidylsérine. En outre, le Hg^+ augmente la formation des céramides. L'apparition de phosphatidylsérine est sous la dépendance de l'activation des caspases dans de nombreux modèles d'apoptose (Martin *et al.*, 1996), mais n'est pas systématique (Ferraro-Peyret *et al.*, 2002).

5.5. Activation des caspases -3 et -8. Des études récentes du groupe de Mandal ont montré que le stress oxydatif (Mandal *et al.*, 2002) active la caspase-3 et que cet enzyme intervient dans le vieillissement (Mandal *et al.*, 2003) par la dégradation caspase 3-dépendante de la bande 3. Etant donné que les érythrocytes manquent de mitochondries et qu'ils subissent pourtant l'activation des caspases, les auteurs concluent qu'une machinerie impliquant l'activation de la caspase-8 par l'intermédiaire des récepteurs la mort, avant l'activation de la caspase-3 pourrait exister dans l'érythrocyte mature. Leurs études montrent que le Fas, FasL, FADD et la caspase-8 sont localisés dans des microdomaines de la membrane des hématies âgées et aussi dans celles qui ont subi un stress oxydatif. Simultanément à la formation de ce "Fas-complex", les caspase 8 et 3 s'activent, tandis que l'activité d'aminophospholipid translocase (APLT) baisse en comparaison avec les érythrocytes jeunes. Mandal et ses collaborateurs démontrent sans équivoque que l'activation de la caspase-3 joue un rôle essentiel dans l'externalisation de la phosphatidylsérine, un événement central lié à l'érythrophagocytose (Mandal *et al.*, 2005) même si certains inducteurs d'apoptose comme l'ionomycine, le choc osmotique ou la conservation prolongé dans les centres de transfusion n'amènent pas à l'activation des caspases, comme dans les cellules nucléées (Berg *et al.*, 2001 ; Lang *et al.*, 2004 ; Weil *et al.*, 1998).

5.6. Activation de la calpaïne. Les calpaïnes sont, elles aussi, présentes dans le cytoplasme ou liées aux membranes sous la forme inactive de procalpaïnes. Après une augmentation du calcium cytosolique, les calpaïnes sont autoactivées (inhibées par une protéine appelée calpastatine) et elles vont ainsi médier le clivage de la fodrine et d'autres changements morphologiques tels que

le rétrécissement de cellules donc elles détruisent spécifiquement les protéines du cytosquelette et ainsi sont responsables des modifications de la forme des cellules et des boursofflures de la membrane.

Les hématies n'ont pas les composants essentiels de la cascade mitochondriale des caspases comprenant l'Apaf-1, le cytochrome c et la caspase-9 (Berg *et al.*, 2001). Cette protéase endogène clive d'abord la pompe à Ca^{2+} , après la Bande 3 et finalement quelques protéines du cytosquelette (Salamino *et al.*, 1994). En effet, l'action de la calpaïne sur la pompe à Ca^{2+} est double (Wang *et al.*, 1988) : à des concentrations faibles et pour des temps courts d'exposition, la calpaïne augmente l'hydrolyse de l'ATP et l'activité de la pompe à Ca^{2+} . Par contre, à des concentrations fortes et à des temps d'exposition plus longs, la pompe à Ca^{2+} est dégradée accompagnée de la perte de son activité (Salamino *et al.*, 1994). L'intervention des calpaïnes dans la mort des hématies a été mise en évidence par leur inhibition spécifique à l'aide de peptides naturels (leupeptine) ou de synthèse (E-64) Bratosin *et al.* (2001). Au cours du vieillissement, la concentration en Ca^{2+} augmente progressivement dans le cytosol des hématies, entraînant par un mécanisme connu depuis longtemps, l'autoactivation de la procalpaïne inactive en calpaïne active alors que, dans le même temps, l'activité de la calpastatine, antagoniste de la calpaïne, diminue. Dans une dernière étape, la calpaïne attaque le cytosquelette entraînant les modifications morphologiques de l'hématie.

5.7. Phagocytose par les macrophages

5.7.1. Elimination des corps apoptotiques

Il est admis désormais que le processus d'apoptose ne s'arrête pas à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques mais s'achève lorsque ces «cadavres» ont été éliminés par phagocytose, sans perturbation de l'environnement, c'est-à-dire sans provoquer de réaction inflammatoire.

Au cours du vieillissement, le volume érythrocytaire diminue avec le temps, accompagné d'une augmentation de la densité cellulaire particulièrement pendant la première partie de la durée de vie et une diminution du contenu d'hémoglobine pendant la deuxième (Werre *et al.* 2004). Ces changements sont associés à une perte de cholestérol, de phospholipides et à une diminution linéaire de la surface cellulaire de 20 p. cent, tous conduisant vers une perte de la

membrane pendant le vieillissement. Cette perte pourrait être aisément expliquée par la formation des microvésicules par les hématies de tous âges avec des vésicules dérivées des érythrocytes âgés contenant plus d'hémoglobine. L'analyse par HPLC a prouvé que la composition en hémoglobine de ces vésicules ressemble à celle des érythrocytes les plus âgés, y compris HbA1c ce qui sont les produits de glycation et de carbamylation (Willekens *et al.*, 1997). La génération des vésicules enrichies en hémoglobine dénaturée est une partie intégrante du processus de vieillissement érythrocytaire. Ces vésicules sont également capturées par les cellules du Kupffer où l'exposition de la phosphatidylsérine joue un rôle important. D'ailleurs, les antigènes de sénescence SA sont présents sur ces vésicules. Ainsi, les vésicules et les érythrocytes sénescents peuvent être capturés et phagocytés par les mêmes signaux (Bosman *et al.*, 2005).

Le maintien de l'homéostasie tissulaire nécessite un équilibre permanent entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. L'élimination des cellules apoptotiques est essentielle à plusieurs niveaux tels que le maintien de l'homéostasie tissulaire, l'organogenèse, le remodelage, le développement, l'entretien du système immunitaire, la protection des tissus contre les néoplasies et contre les réactions inflammatoires (Ogden *et al.*, 2001). Lors d'études sur des modèles d'apoptose *in vitro*, en l'absence de phagocytes, les cellules apoptotiques évoluent vers la nécrose secondaire. Cette nécrose libère le contenu cellulaire qui comprend, entre autres, des enzymes potentiellement inflammatoires et des macromolécules immunogènes.

5.7.2. Reconnaissance du globule rouge sénescant par le macrophage

Les phagocytes reconnaissent les cellules apoptotiques comme des cellules à éliminer. Cette reconnaissance est conditionnée par l'apparition de structures reconnues comme des « eat-me signals », littéralement « signaux de mangez-moi » (Ren et Savill, 1998) que nous appellerons des signaux d'élimination. Plusieurs types de mécanismes peuvent conduire à l'expression de ces signaux d'élimination:

- l'expression de structures nouvelles comme la phosphatidylsérine
- la modification de molécules déjà présentes à la surface,
- la perte de molécules susceptibles d'exercer une fonction de "masquage biologique".

Il est admis que les types de signaux d'élimination dépendent du type de cellules et du mode d'apoptose. D'autre part, les différentes populations de phagocytes expriment différents ensembles de récepteurs, capables de reconnaître les signaux d'élimination, ce qui détermine (au

moins en partie) le type des phagocytes qui vont éliminer les cellules apoptotiques. Engloutir une cellule en apoptose est un acte particulier dans l'univers de la phagocytose. Tout d'abord, les proies à engloutir sont des cellules du soi et non pas des pathogènes. Un trait original de cette forme de phagocytose est le fait que ses acteurs peuvent être des phagocytes professionnels, tels que les macrophages, mais aussi des amateurs tels que les cellules dendritiques, les fibroblastes ou les hépatocytes.

Parmi les récepteurs intervenant au niveau des macrophages pour la reconnaissance de la membrane des globules rouges au cours de la sénescence, on notera :

5.7.2.1. *Récepteurs de la phosphatidylsérine.* Les macrophages interagissent spécifiquement avec la phosphatidylsérine soit directement par l'intermédiaire de récepteurs (CD36, récepteur LDL, ou « scavenger »), soit indirectement par l'intermédiaire de molécules de pontages sécrétées par le macrophage (MFG-E8). Cette modification membranaire semble donc jouer un rôle important dans la reconnaissance des globules rouges sénescents par les macrophages.

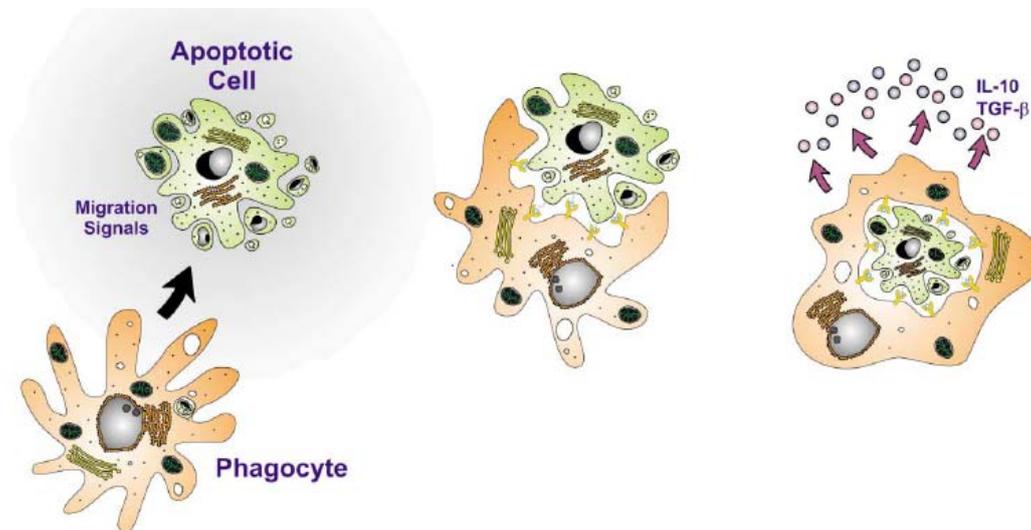


Figure 23 - *Les étapes d'élimination des cellules apoptotiques.* A : Les cellules en apoptose libèrent des signaux solubles dans le but d'attirer des phagocytes professionnels. B : Une fois le contact établi, le phagocyte est capable de reconnaître sa proie à l'aide des signaux « eat-me ». C : Une fois les corps apoptotiques ingérées, le phagocyte commence à produire des cytokines anti-inflammatoires, comme IL-10 et TGF- β , créant ainsi un milieu anti-inflammatoire autour du site d'apoptose (Lauber *et al.*, 2004).

5.7.2.2. *Reconnaissance des antigènes de sénescence.* Plusieurs protéines peuvent contribuer à la formation d'antigènes de sénescence. La nature des épitopes membranaires sur lesquels se fixent les immunoglobulines n'a pas encore été définie avec certitude. En effet, des discussions se concentrent sur l'agrégation *versus* le fractionnement de la bande 3 comme étapes finales dans la formation de néoantigènes. Dans la première hypothèse, la liaison de l'hémoglobine dénaturée avec les domaines cytoplasmiques de la bande 3 cause l'oligomérisation de la bande 3, avec pour résultat la formation d'un néoantigène qui est reconnu par les IgG. Cette hypothèse est soutenue par beaucoup de données montrant une association entre l'augmentation de la fixation des IgG et l'oligomérisation de la bande 3 *in vitro* et *in vivo*. L'augmentation concomitante de la fixation à la membrane des chaînes de globine démontre la participation de l'hémoglobine dans ce processus (Lutz, 2004 ; Rettig *et al.* 1999).

Pour certains auteurs, comme Kay *et al.* (1975), il s'agirait de protéines modifiées de la bande 3, en particulier par une protéolyse (calcium-induite le plus souvent) qui donnerait naissance à un "antigène cellulaire de sénescence" (SCA) entraînant ainsi un changement de conformation qui induit la fixation d'IgG auto-immunes et une phagocytose médiée par les récepteurs Fc.

Dans la deuxième hypothèse, le fractionnement de la bande 3 dans le domaine membranaire est l'événement central qui mènera aux changements de conformation ayant pour résultat la génération d'un néoantigène de sénescence érythrocytaire spécifique. Cette hypothèse est soutenue par des données d'"immunoblotting" montrant le fractionnement lié au vieillissement et par des données fonctionnelles telles qu'une diminution de la capacité de transport d'anions (Kay, 2004). Les deux théories expliquent la perte d'interaction entre la membrane et le cytosquelette, indiqué par une plus grande mobilité de la bande 3 et une diminution du nombre de sites de fixation de l'ankyrine (Rettig *et al.* 1999; Bosman et Kay, 1988). Dans les deux hypothèses, un rôle central est attribué à l'oxydation comme événement causal. Les diverses données indiquent que le fractionnement de la bande 3 au cours du vieillissement est provoqué par l'activation de calcium-protéases (Schwarz-Ben Meir, 1991).

Les deux hypothèses restent vraies probablement pour un certain nombre de raisons :

1^o- Les changements du domaine cytoplasmique de la bande 3 affectent la structure et la fonction du domaine membranaire, ce qui rend difficile d'indiquer exactement le site initial de la perturbation.

2°-En raison du rôle central de la bande 3 dans l'homéostasie érythrocytaire, beaucoup de processus peuvent induire des changements de cette bande, y compris les pathologies érythrocyte-spécifiques mais probablement aussi d'autres conditions telles que le vieillissement, la grossesse (Belo *et al.*, 2002) , la pathologie cardiovasculaire (Santos-Silva *et al.*, 1995) et le diabète (Romano *et al.*, 2002).

3° - Les changements structurels présent *in situ* dans le domaine transmembranaire de la bande 3 peuvent facilement être perdus après isolement de la membrane et après d'autres procédures analytiques.

La présence des produits de fractionnement de la bande 3 peut également expliquer la perte de l'eau pendant la première partie de la durée de vie des hématies comme une conséquence osmotique d'une diminution de la capacité de transport d'anions de la bande 3 (Kay, 2004 ; Werre *et al.*, 2004).

Pour d'autres auteurs, l'épitope serait de nature glucidique : glycannes de la glycophorine pour Henrich *et al.* (1983) formant le "senescent factor glycopeptide" (SFG), liaison α -galactosyl pour Galili (1983), glycannes poly-N-acétyllactosaminique de la bande 3 pour Beppu *et al.*, (1992). Les résidus β -galactosyls exposés par la désialylation de la glycophorine sont aussi des antigènes de sénescences impliqués dans la clairance des globules rouges par les macrophages. Le stress oxydatif peut contribuer à la formation de néoantigènes, mais aussi entraîner une accumulation de "low density lipoprotéine" (LDL) oxydées. Les lipoprotéines modifiées par oxydation peuvent ensuite être reconnues par le « *scavenger receptor* » des macrophages et phagocytées indépendamment de l'opsonisation des érythrocytes (Beaumont *et al.*, 2005).

5.7.2.3. *Le complément et la phagocytose des hématies.* L'activation du complément n'est probablement pas impliquée. Quand des érythrocytes de divers âges ont été marqués avec des anticorps fluorescente anti-protéines du complément (CD55 et CD59), l'intensité de fluorescence a diminué avec l'âge de l'érythrocyte mais la surface moyenne a diminué plus encore, avec pour résultat une légèr augmentation avec le vieillissement du nombre de récepteurs CD55 et de CD59 par unité de surface cellulaire (Willekens *et al.*, 1998).

5.7.2.4. *CD47 et SHPS-1.* CD47, également connu sous le nom de IAP (Integrin-associated membrane protein) contrôle des processus d'adhérence (McDonald *et al.*, 2004) en tant que signal d'antiphagocytose (Bessus *et al.*, 2005). CD47 a été impliqué comme ligand pour le

récepteur SHPS-1 (Jiang *et al.*, 1999; Seiffert *et al.*, 1999). Cette protéine qui fut initialement identifiée en association avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ (Brown *et al.*, 1990), est également un membre de la superfamille d'immuno globulines, ayant un domaine extracellulaire Ig-V-like, cinq segments intégrés dans la membrane et une queue cytoplasmique courte (Brown et Frazier, 2001). CD47 et SHPS-1 semblent constituer un système de communication cellule-cellule (système CD47-SHPS-1) ce qui joue un rôle important dans la phagocytose des globules rouges sénescents par les macrophages spléniques (Oldenborg *et al.*, 2000).

5.7.2.5. La glycation des protéines. L'augmentation de la concentration plasmatique du glucose dans le diabète entraîne la glycosylation non-enzymatique (glycation) de différentes protéines extra- et intracellulaires (revue in Lapolla *et al.*, 2005). Ces composés résultent de la condensation non-enzymatique du monosaccharide qui, réagissant sous sa forme aldéhydrique avec les groupements $-\text{NH}_2$ libres des protéines, conduit à un dérivé iminé (base de Schiff) qui, subissant le « réarrangement d'Amadori », se transforme en une amide stable formant ainsi les « Advanced Glycation End Products » (AGE) (Fig. 24, p. 56).

Schmidt *et al.*, (1992) ont identifié deux récepteurs des produits de glycation avancée (AGE) exprimés à la surface des macrophages et des cellules endothéliales auxquels se lient les AGE. Les globules rouges de sujets diabétiques ont une adhésion anormale aux cellules endothéliales humaines en culture (Wautier et Wautier, 1999). L'un de ces récepteurs est de type lactoferrine et l'autre, de poids moléculaire de 35 kDa, lie des protéines glyquées et les globules rouges de sujets diabétiques. Cette molécule de 35 kDa a été purifiée, caractérisée et clonée. Elle est considérée comme le récepteur pour des AGE et dénommée RAGE. Le récepteur appartient à la superfamille des immunoglobulines.

Ainsi, a été récemment expliquée la capture, suivie de leur phagocytose, des cellules en apoptose du sang circulant – des hématies, en particulier (Ando *et al.*, 1999 ; Vlassara *et al.*, 1987) – ainsi que celle des protéides plasmatiques en « apoptose moléculaire ».

La bande 3, protéine transmembranaire majeure, est facilement accessible à la glycation, tandis que les protéines de la bande 4.1 le sont moins. Selon les estimations, 20 à 40 % de la bande 4.1 sont glyqués, mais cette modification n'a apparemment pas d'influence sur la mobilité électrophorétique des bandes 4.1a et 4.1b.

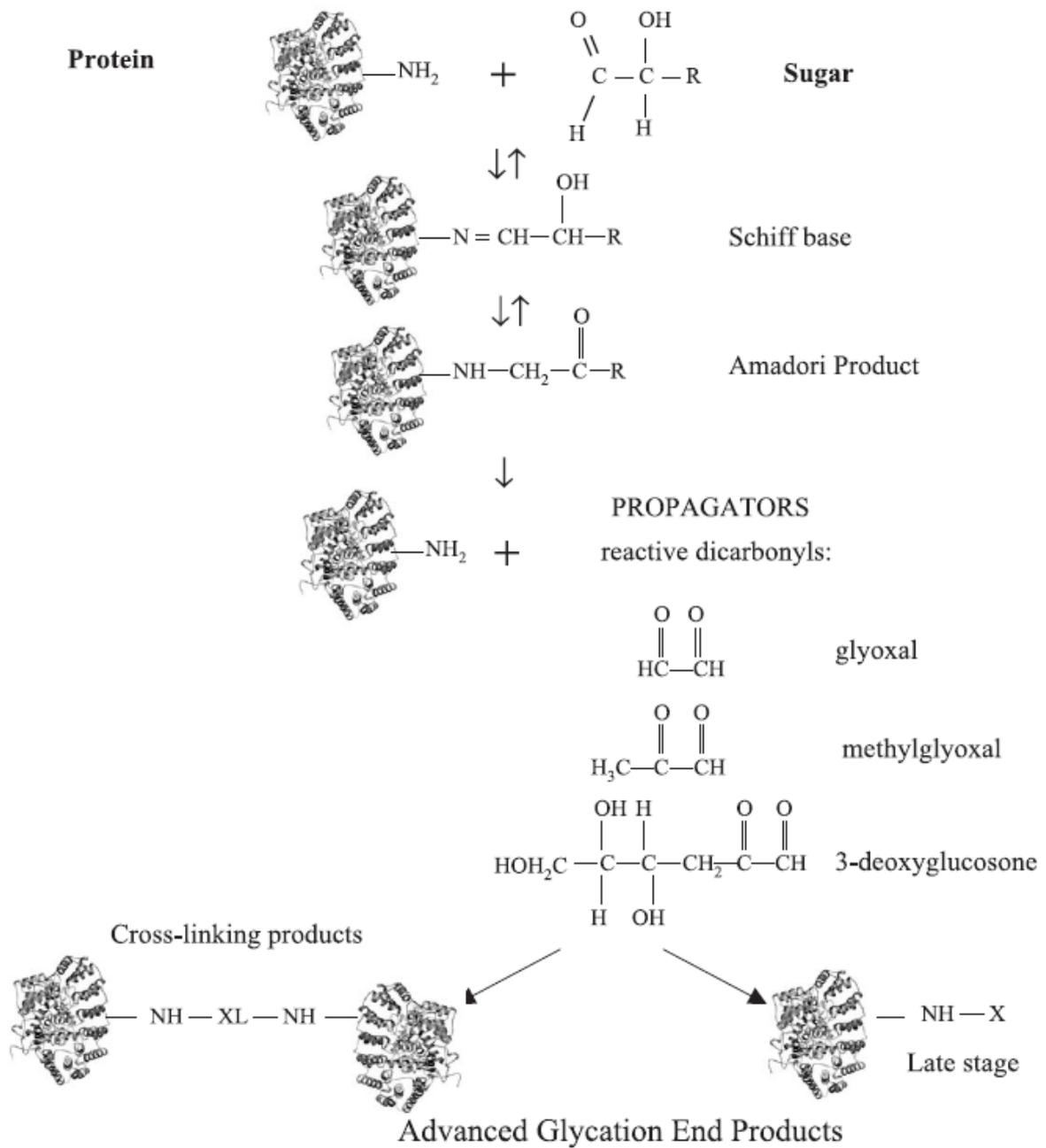


Figure 24 – Les étapes de la glycation non enzymatique (D'après Lapolla et al., 2005)

Aucune anomalie fonctionnelle de la bande 4.1 secondaire à la glycation n'a, en effet, été établie (Wautier et Wautier, 1999). La carboxyméthyllysine, produit de glycation avancée bien caractérisé, est présente sur les érythrocytes des patients diabétiques et a une grande affinité pour le récepteur RAGE (Schmidt *et al.*, 1999).

5.7.2.6. Reconnaissance de type lectinique entre les hématies apoptotiques et les phagocytes. Les modifications des glycanes ont été parmi les premières détectées à la surface des cellules apoptotiques (Duvall *et al.*, 1985). Les hématies sont capturées par les macrophages grâce à une β -galactectine présente dans les membranes des macrophages. Cette capture est inhibée compétitivement par des β -galactosides comme le lactose (Bratosin *et al.*, 1995). Les résidus d'acide sialique se comportent donc comme des signaux d'anti-reconnaissance tandis que les résidus de β -galactose démasqués par la désialylation sont les signaux de reconnaissance et de capture des hématies par les macrophages.

5.7.2.7. Rôle des anticorps dans l'érythrophagocytose. De nombreuses modifications interviennent au niveau de la membrane du globule rouge au cours de la sénescence et au moins deux mécanismes semblent co-exister pour permettre la reconnaissance et l'internalisation de l'érythrocyte sénescant par le macrophage, l'un correspondant à la voie classique dépendante des immunoglobulines (Beaumont *et al.*, 2005) et l'autre à une voie alternative indépendante des immunoglobulines (Bratosin *et al.*, 1998). L'érythrophagocytose appelle la question suivante : les anticorps lui sont-ils indispensables ? De nombreux travaux démontrent que la phagocytose des hématies est opsonine et auto-anticorps IgG-dépendante (Historique *in* Bratosin *et al.*, 1995, 2002 ; Lutz, 2004 ; Bosman *et al.*, 2005). Cependant, en étudiant récemment la clairance d'hématies désialylées de souris immuno-déficientes BALB/c, SCID et RAG 2 ko, puis ré-injectées aux animaux et en appliquant, d'autre part, le procédé d'érythrophagocytose *in vitro* décrit à la page 88. Bratosin *et al.* (2002) ont démontré qu'il existait une voie alternative immunoglobuline-indépendante d'érythrophagocytose qui reste à explorer.

De ces différentes observations, il ressort que les modifications biochimiques profondes que connaît la membrane des globules rouges au cours de leur vieillissement et au terme de 120 jours constituent des signaux qui mettent en oeuvre plusieurs mécanismes complexes d'une très grande spécificité et qui conduisent à l'élimination des érythrocytes sénescants par les macrophages résidants. Contrairement à ce qui était admis initialement, cette reconnaissance ne

ne passe pas systématiquement par l'opsonisation du globule rouge, malgré l'augmentation de la présence d'immunoglobulines et du composant C3b du complément fixés à la surface des érythrocytes. Ainsi, d'autres mécanismes mettant en jeu des récepteurs spécifiques contribuent à l'identification des érythrocytes devant être éliminés. L'étape suivante de l'érythrophagocytose consiste en l'internalisation du globule rouge dans un phagosome suivie de sa destruction totale.

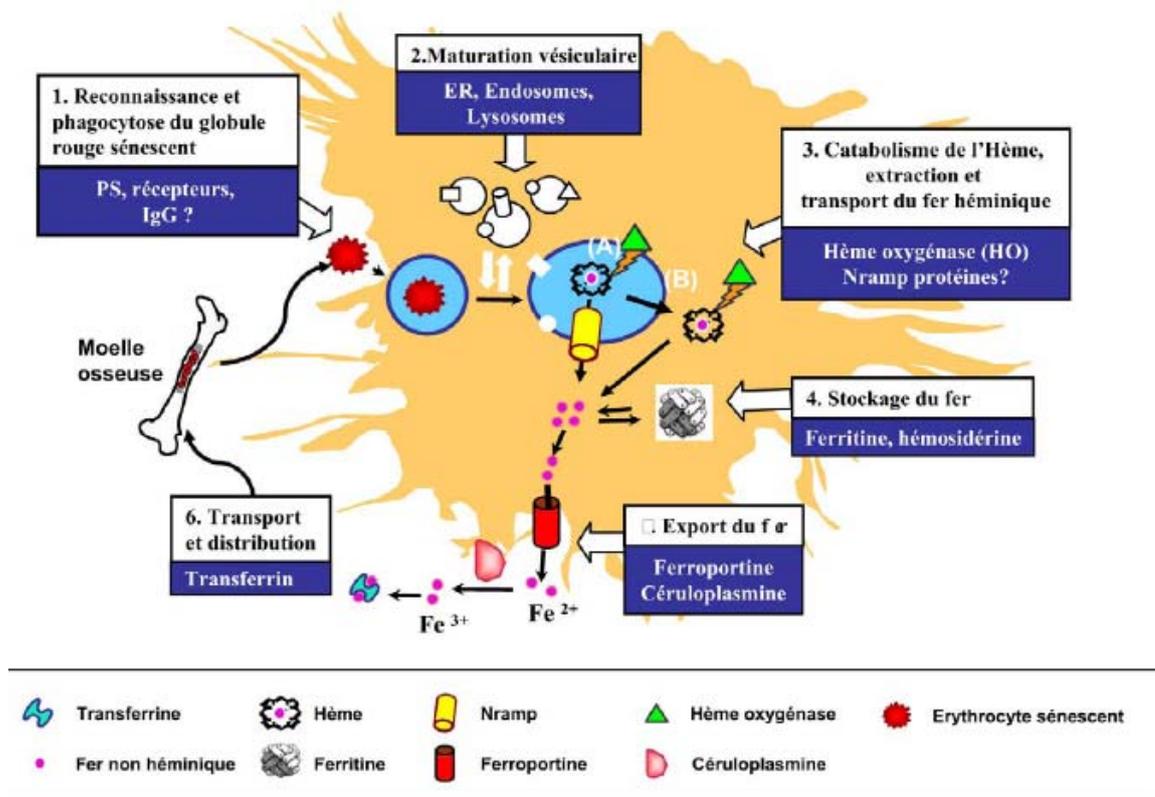


Figure 25 - Représentation schématique d'un macrophage et des différentes étapes du processus d'érythrophagocytose et de recyclage du fer hémérique. La reconnaissance spécifique d'un globule rouge vieilli par un macrophage tissulaire (1) est suivie de l'internalisation du globule rouge par phagocytose. La maturation de l'érythrophagosome permet le recrutement des enzymes nécessaires à la dégradation des constituants du globule rouge (2). L'hème est ensuite dégradée par l'hème oxygénase (3) soit dans le phagosome, auquel cas le fer sort probablement de l'endosome par un transporteur de la famille Nrap (A) soit directement dans le cytoplasme après transport ou diffusion de l'hème à travers la membrane phagosomale (B). Le fer est ensuite soit mis en réserve associée à la ferritine (4), soit recyclé vers le plasma par la ferroportine, puis oxydé par la céruloplasmine (5). Enfin, le fer se fixe sur la transferrine plasmatique pour être distribué aux précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse (6) (D'après Beaumont *et al.*, 2005).

5.8. Les hématies humaines meurent-elles d'apoptose ?

L'ensemble de ces résultats relèvent-ils d'un mécanisme apoptotique ? Il faut reconnaître que l'hématie humaine sénescence présente bien des caractéristiques de cellules en apoptose. Pour faire la distinction entre l'apoptose érythrocytaire et celle des cellules nucléées, Lang *et al.*, en 2005 ont suggéré le terme *d'éryptosis*. La conclusion que nous proposons place l'hématie dans la phase terminale d'un processus apoptotique dont le but est de lui donner naissance et qui fait d'elle une créature post-apoptotique. Cette évolution des érythroblastes vers l'hématie comporte deux phases : la première, nucléée, est dite érythroblastique et la seconde, anucléée, est dite érythrocytaire.

1 – Phase nucléée : Cette phase marque le passage de l'érythroblaste immature à l'érythroblaste mature et est caractérisée par l'activation des caspases -3, -6 et -7 *via* le ligand Fas. Elle est inhibée par l'oncogène anti-apoptotique Bcl-X_L dont l'activation par l'érythropoïétine protège les érythroblastes de l'apoptose.

2 – Phase anucléée : Cette étape, liée à l'activation des caspases, est dépendante de la DNase II macrophagique. Elle voit l'expulsion des organites cytoplasmiques des érythroblastes et, pour la petite histoire de la Science, il est, à cet égard, intéressant de noter que, dès 1971, Bessis et Danon avaient, sans le savoir, découvert un mécanisme d'apoptose grâce à l'application de la microscopie électronique. Ils avaient, en effet, décrit en détail l'énucléation des érythroblastes ainsi que la destruction des mitochondries, du reticulum endoplasmique et du cytosquelette (Bessis et Brecher, 1971 ; Danon *et al.*, 1971 ; Bessis, 1973). Danon *et al.* en 1971, puis Testa en 2004 étaient même allés jusqu'à montrer que les noyaux étaient « emballés » dans la membrane plasmique de l'érythroblaste et que celle-ci présentait un caractère électronégatif inférieur à celui des érythroblastes immatures. On sait à présent, que la première observation concernait les corps apoptotiques et que la seconde était liée à la désialylation caractéristique des membranes des cellules en apoptose. Récemment, le mécanisme d'élimination et de phagocytose du noyau a été rapporté par Yoshida H. *et al.* (2005).

En conclusion, nous pouvons considérer que l'hématie se place dans la phase terminale d'exécution d'un processus apoptotique (Revue *in* Testa, 2004) – conclusion partagée par Morioka *et al.*, (1998) et par Bosman *et al.*, (2005) – qui a débuté dans la phase terminale de la

différenciation de la lignée rouge et au stade de l'érythroblaste polychromatophile II où apparaissent les symptômes de l'apoptose « vraie » avec, en particulier, l'expulsion du noyau (cf. Tableau II, p. 46). Peu à peu, le cytoplasme est débarrassé de ses inclusions pour devenir une sorte de momie que l'on aurait vidée de ses viscères, une belle image de l'hématie offerte par Daugas *et al.* (2001) dans un article intitulé : « Erythrocytes : Death of a mummy ». Les mêmes auteurs émettent des réserves sur l'emploi du terme « apoptose » - toutefois largement utilisé actuellement par des auteurs (Lang *et al.*, 2002, 2005) – pour désigner la mort programmée des hématies et proposent le terme d'« éryptosis ».

Malgré les progrès réalisés dans la dernière décade dans le domaine des mécanismes cellulaires et moléculaires de la mort programmée des hématies, celle-ci reste une énigme. Or, la connaissance de ces mécanismes est indispensable pour répondre à la question de savoir pour quelles raisons les hématies transfusées disparaissent aussi rapidement de la circulation malgré toutes les tentatives effectuées pour améliorer les conditions de leur prélèvement et de leur conservation (Scott *et al.*, 2005). Les échecs sont liés, selon Beutler (2000), d'une part, à notre ignorance de la nature des « storage lesions » que présentent les hématies conservées dans les centres de transfusion et, d'autre part, au fait que nous ne disposons pas encore de critères fiables de viabilité de ces cellules. Il n'en reste pas moins que l'hématie est loin d'être une banale vésicule constituée d'hémoglobine entourée d'une membrane et flottant dans la circulation et que, selon Aminoff (1985) « One of the most extensively studied cells, the red blood cell, with a definite life span, seems to me to be the ideal model to study senescence ».

IV. LES GLYCOSIDASES ERYTHROCYTAIRES

1. Répartition des glycosidases dans la membrane érythrocytaire

Les glycosidases sont des enzymes ubiquitaires, trouvés dans les lysosomes, la membrane plasmique, le cytosol et le plasma sanguin (Lombardo *et al.*, 1980 ; Weng et Spiro, 1996 ; Gopalan *et al.*, 1989 ; Willemsen *et al.*, 1991 ; Venerando *et al.*, 1997). Dans chaque compartiment sous-cellulaire les glycosidases peuvent être présentes sous des formes différentes comme la N-acétyl-D-glucosaminidase et les sialidases (Venerando *et al.*, 1997 ; Mahuran *et al.*, 1985). Les glycohydrolases lysosomales ont un pH optimal acide (Lombardo *et al.*, 1984), tandis que celles de la membrane plasmique et du cytosol peuvent avoir un pH optimal neutre (Venerando *et al.*, 1997 ; Aviles *et al.*, 1996).

Les hématies contiennent une importante collection d'hydrolases (Bosmann 1971, 1974) les plus variées parmi lesquelles des glycosidases qui jouent un rôle capital dans le vieillissement, la sénescence et la mort programmée des érythrocytes. La plupart des glycosidases - qui sont aussi les plus importantes dans la phagocytose des hématies - sont localisées dans la membrane des globules rouges et toutes possèdent la particularité d'avoir un pH d'activité optimale acide, variant de 4,4 à 5,8 (Tableau III).

Tableau III - Liste des glycosidases présentes dans la membrane érythrocytaire (Goi *et al.* 2000)

Enzyme	pH optimum	K_m ($\times 10^{-3}$ mol/l)
N-acétyl- β -D-glucosaminidase	3,8 ; 4,4 ; 5,6	0,7 ; 0,6 ; 0,36
β -D-glucuronosidase	4,8	2,00
β -D-galactosidase	4,4	0,29
α -D-galactosidase	4,3	0,70
α -L-fucosidase	5,0	0,35
α -D-glucosidase	5,8	0,33
β -D-glucosidase	5,0	0,60
α -D-mannosidase	5,8	1,00
N-acétyl- α -D-neuraminidases neutre	7,2	-
N-acétyl- α -D-neuraminidases acide	4,7	0,256

Les glycosidases érythrocytaires sont impliquées dans différentes pathologies comme le diabète (Venerando *et al.*, 2003 ; Goi *et al.*, 1999).

Des études sur des cellules polarisées (neurones, cellules épithéliales) démontrent que quelques protéines et lipides de la membrane plasmique sont inégalement distribués à sa surface et sont enrichis dans des microdomaines de la membrane (caveolae, "lipid rafts" ou microdomaines enrichis en glycosphingolipides) qui peuvent être isolés et analysés (Brown et London, 1997 ; Simons et van Meer, 1988 ; Anderson, 1993 ; Palestini *et al.*, 1998 ; Muniz et Riezman, 2000). Bien que la présence des microdomaines dans des membranes d'érythrocytes humains n'ait jamais été étudiée en tant que tels, quelques données évoquent cette possibilité (Suzuki *et al.*, 1986 ; Haldar *et al.*, 1989 ; Bojesen et Bojesen, 1996), y compris le déroulement de processus de microvésiculation pendant le vieillissement des hématies (Lutz et Fehr, 1979). Les résultats obtenus par Goi *et al.*, 2000 démontrent que les glycohydrolases sont inégalement réparties à la surface des érythrocytes et constituent un matériel intéressant pour étudier la répartition des glycohydrolases dans des microdomaines membranaires. A cet égard, la figure 27, p. 64, montre clairement qu'en se fondant sur des extractions fractionnées des glycohydrolases par des solutions de chlorure de sodium ou de détergents comme le Triton X-100 et l'octylglucoside, Goi *et al.*, 2000 ont démontré, d'une part, que certains enzymes étaient fixés à la membrane, les uns par des liaisons de type ionique, comme la β -D-glucosidase, la β -D-galactosidase et l' α -D-mannosidase, les autres par des liaisons hydrophobes les ancrant plus ou moins profondément dans la double couche lipidique de la membrane, comme l' α -D-glucosidase.

Une partie de l'enzyme peut être libérée par traitement par une solution 1 M de NaCl, indiquant une association dans la membrane principalement fondée sur un réseau de liens ioniques. Vraisemblablement, cette partie se compose d'une forme sécrétée de l'enzyme ou d'une enzyme dérivée du plasma sanguin adhérant à la surface de l'érythrocyte (Clark *et al.*, 1981). Une autre partie peut être solubilisée par traitement avec des détergents (Triton X-100, octylglucoside) qui affecte différemment les microdomaines de la membrane (Muniz et Riezman, 2000 ; Hooper et Turner, 1998 ; Low et Finean, 1977). Par conséquent, cette partie de l'enzyme devrait appartenir au microdomaine affecté. Une troisième partie, mineure, est constituée par des protéines intégrées concernant des domaines de la membrane résistant à l'un ou l'autre des détergents (Brown et London, 1997). Enfin, aucune des enzymes étudiées ne semble être sensible

au traitement avec phosphoinositide-spécifique phospholipase C (PIPLC), éliminant la possibilité que les enzymes soient ancrés par un pont GPI (Fig. 26) ou, par un pont PIPLC-sensible.

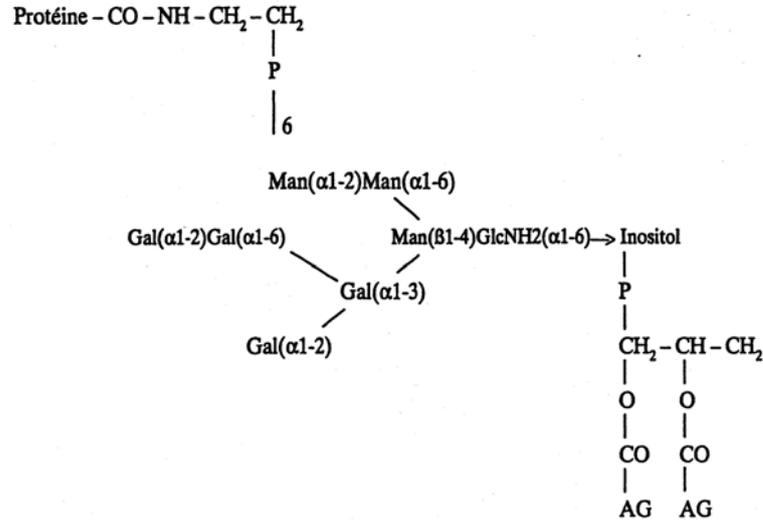


Figure 26 - Schéma général de l'ancrage des protéines dans les membranes plasmiques de cellules par un glycosylphosphoinositide (GPI).

Dans le cas de la β -D-galactosidase (EC 3.2.1.23) et de l' α -D-mannosidase (EC 3.2.1.24), la partie majoritaire (70% et 61%, respectivement) est faiblement associée, tandis que pour l' α -D-glucosidase (EC 3.2.1.20) la partie majoritaire est libérée par traitement avec un détergent (89% et 85% avec Triton X-100 et octylglucoside, respectivement), les autres glycohydrolases ayant un comportement intermédiaire. Ces observations sont conformes à la notion que les glycohydrolases ont une distribution « géographique » différente dans la membrane de l'érythrocyte où certains domaines sont plus riches en certains enzymes (par exemple l' α -D-glucosidase, β -D-glucuronidase (EC 3.2.1.31), α -D-galactosidase (3.2.1.22) dans les domaines plus sensibles aux détergents utilisés) et d'autres domaines plus riches en d'autres enzymes, comme β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21), présente la plupart du temps dans la fraction de la membrane résistante à l'octylglucoside, ou comme β -D-galactosidase, α -D-mannosidase et α -L-fucosidase (EC 3.2.1.51) qui sont associée d'une manière faible.

D'autre part, aucune des glycosidases mentionnées dans le Tableau III ne réagit avec la phosphoinositide phospholipase démontrant ainsi que les glycosidases ne sont pas intégrées dans la membrane par un glycosylphosphoinositide (GPI). A l'opposé, la situation et les propriétés des neuraminidases, enzymes-clés dans le déclenchement de l'érythrophagocytose, ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, sont radicalement différentes.

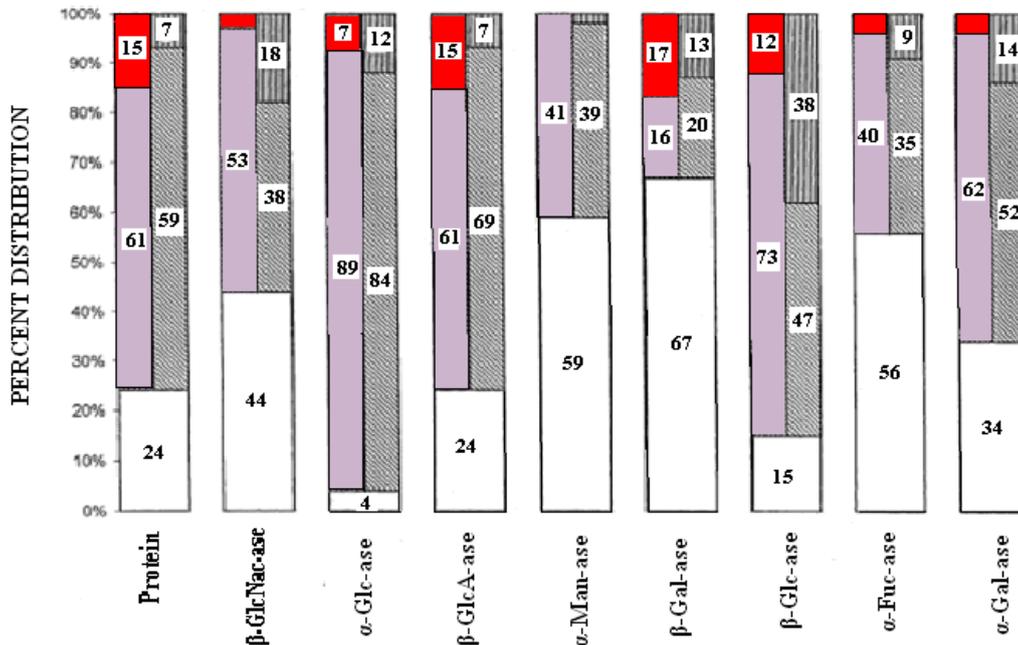


Figure 27 - Répartition des glycohydrolases dans la membrane érythrocytaire : (a) la partie associée à la membrane, non intégrée et périphérique, libérée par traitement avec 1.0 mole/l NaCl (barre ouverte) ; (b) la partie intégrée dans la membrane, solubilisée par le Triton X-100 (barre violet) ou par l'octylglucoside (barre oblique à gauche en haut et à droite en bas) ; et (c) la fraction intégrée dans la membrane résistante au traitement par des détergents (barre rouge : Triton X-100 ; rayure verticale : octylglucoside). Les pourcentages ont été calculés par rapport aux protéines totales et l'activité enzymatique a été dosée dans les surnageants et le culot obtenu après chaque solubilisation assumant une distribution égale des pertes dans les différentes parties. Les valeurs rapportées dans les colonnes correspondent aux pourcentages de répartition des composés (d'après Goi *et al.*, 2000).

En effet, le groupe de Tettamanti (Venerado *et al.*, 1997) a démontré qu'il existait deux N-acétylneuraminidases membranaires chez l'hématie ancrées, l'une directement dans la membrane et, l'autre, par l'intermédiaire d'un bras GPI. Toutes deux présentent des propriétés différentes qui sont précisées dans les Tableaux III et IV.

La source enzymatique de la neuraminidase acide est le surnageant obtenu après le traitement par la phosphatidylinositol-phospholipase C (PIPLC) et la centrifugation des "*resealed vesicles*". La source de neuraminidase neutre est le culot obtenu après le traitement par PIPLC et centrifugation des "*resealed vesicles*".

Tableau IV- Localisation des neuraminidases érythrocytaires humaines. Toutes les activités enzymatiques sont exprimées en unités internationales. ND = indétectable (Venerando *et al.*,1997).

Source de l'enzyme	Neuraminidase ($\mu\text{U}/\text{mg}$ protéine)	
	pH 4,7	pH 7,2
"White ghosts"	$23,0 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,05$
"Resealed ghosts"	$14,3 \pm 0,7$	$56,9 \pm 2,3$
Vésicules "inside-out"	ND	ND
Vésicules "inside-out" lysées	$16,4 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,02$

Tableau V - Spécificité de substrat des neuraminidases acide et neutre obtenues à partir de la membrane érythrocytaire humaine (Venerando *et al.*,1997).

Substrat	V_{max} apparent ($\mu\text{U}/\text{mg}$ protéine)	
	Neuraminidase acide	Neuraminidase neutre
Gangliosides		
GD1 _a	170	420
GM3 (+ 0,1% Triton CF-54)	380	650
Glycoprotéines		
Fétuine	0	24,8
α_1 - Glycoprotéine acide	0	29,8
Transferrine	0	28,0
Oligosaccharides		
α -2,3-Sialyllactose	37,1	33,0
Substrat artificiel		
MU-NeuAc	104	66,6

2. Les glycohydrolases et le vieillissement cellulaire

Le vieillissement est un processus biologique inévitable caractérisé par un déclin des différentes fonctions physiologiques. Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer les modifications progressives du vieillissement. L'une d'entre elle est la théorie de la diminution du

télomère et l'autre, celle des radicaux libres qui veut que les radicaux superoxydes (ROS) peuvent causer des dommages oxydatifs au cours du vieillissement. Les hématies sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif étant donné qu'elles y sont exposées continuellement car les radicaux libres d'oxygène sont produits par l'autooxydation de l'hémoglobine. En outre, les érythrocytes contiennent une quantité importante d'acides gras non-saturés qui sont de très bons substrats pour les réactions de peroxydation (Katherine *et al.*, 1997). En conclusion, l'érythrocyte est un modèle excellent pour étudier les effets du vieillissement cellulaire. La mesure des changements de l'activité spécifiques des différentes enzymes au cours de vieillissement, on peut fournir des informations importantes en gérontologie (Glass et Gershon, 1984).

Tableau VI - Activité des enzymes antioxydants dans les hématies humaines pendant le vieillissement (D'après Junqueira *et al.*, 2004).

Group	Age interval (years)	Cu, Zn-superoxide dismutase (U/mg Hb)	Catalase (U/mg Hb)	Glutathione peroxidase (mU/mg Hb)
1	20-29	4.3 ± 0.2	140 ± 5	12.3 ± 0.9
2	30-39	4.9 ± 0.1	172 ± 4	13.4 ± 0.5
3	40-49	4.7 ± 0.1	155 ± 3	16.4 ± 0.3
4	50-59	5.1 ± 0.1	152 ± 3	17.3 ± 0.4
5	60-69	4.8 ± 0.1	166 ± 4	21.4 ± 1.4
6	≥ 70	6.2 ± 0.2	168 ± 4	31.6 ± 1.2

Pendant le vieillissement physiologique des érythrocytes, accompagné d'une perte d'ATP, plusieurs enzymes diminuent leurs activités : glucose-6-phosphate dehydrogénase (Sass *et al.*, 1965 ; Baxter et Beeley, 1975 ; Walls *et al.*, 1975; Choy *et al.*, 1979; Shinozuka *et al.*, 1985 ; Shinozuka *et al.*, 1988), les enzymes intracellulaires comme la pyruvate kinase (Gattegno *et al.*, 1976), la cholinestérase (Gattegno *et al.*, 1976 ; Choy *et al.*, 1979), la glutamate-oxaloacétate transaminase (Sass *et al.*, 1965 ; Kadlubowski et Agutter, 1977 ; Seaman *et al.*, 1977), la Na/K ATPase (Kadlubowski et Agutter, 1977), l'aldolase (Bulai *et al.*, 2003). Les hématies âgées présentent une augmentation modérée de la méthémoglobine accompagnée d'une diminution de la cytochrome b5-réductase et de son cofacteur b5 (Takshita *et al.*, 1983). La caractérisation de la population âgée montre clairement que ces hématies souffrent de l'accumulation de dommages oxydatifs (Glass *et al.*, 1983 ; Imanishi *et al.*, 1985).

Tableau VII - Activités enzymatiques et dosage des acides sialique, exprimés en $\mu\text{U}/\text{mg}$ et en $\mu\text{g}/\text{mg}$ des protéines respectivement (D'après Goi *et al.*, 2005).

	Erythrocytes					
	Young subjects			Elderly subjects		
	Young	Average	Senescent	Young	Average	Senescent
Acidic sialidase	7.83 ± 1.60	6.33 ± 1.50	3.3 ± 1.12	8.06 ± 1.55	6.81 ± 1.43	3.6 ± 1.08
Neutral sialidase	3.8 ± 1.35	8.97 ± 1.51	11.15 ± 1.63	4.01 ± 1.72	5.89 ± 1.60	5.96 ± 1.55
β -D-glucuronidase	710 ± 130	535 ± 120	200 ± 80	500 ± 105	350 ± 110	150 ± 90
α -D-glucosidase	247 ± 43	143 ± 32	75 ± 26	210 ± 55	126 ± 37	60 ± 27
Total sialic acid	58.6 ± 10.1	53.2 ± 7.8	40.3 ± 5.5	43.7 ± 4.3	40.4 ± 6.1	32.7 ± 4.9
Fluorescence anisotropy	0.223 ± 0.008	0.224 ± 0.007	0.242 ± 0.012	0.228 ± 0.009	0.229 ± 0.011	0.271 ± 0.013
Number of cells $\times 10^9$ (%)	16.6 ± 2.32 (17.8)	58.9 ± 2.65 (63.3)	17.5 ± 1.40 (18.8)	17.5 ± 1.54 (19.6)	54.6 ± 2.73 (61.3)	16.9 ± 1.27 (19.0)

Tandis que l'activité des enzymes antioxydants augmente avec l'âge (la superoxyde dismutase plasmatique et érythrocytaire, la glutathion peroxydase, la Cu,Zn-superoxyde dismutase et la catalase) (Mecocci *et al.*, 2000 ; Junqueira *et al.*, 2004), excepté la sialidase neutre, l'activité de toutes les glycohydrolases, diminue progressivement au cours de vieillissement physiologique, de sujets jeunes et âgées. Il s'avère que l'activité de la β -D-glucuronidase, dans les jeunes et les moyens, est plus importante que dans les hématies jeunes isolées par ultracentrifugation suivant la méthode de Lutz *et al.*, (1992). Un comportement tout à fait différent est présenté par la sialidase neutre dont l'activité augmente progressivement avec le vieillissement autant chez les sujets âgés que chez les sujets jeunes. Pour la sialidase neutre, l'activité dans les érythrocytes sénescents est environ 50% plus faible chez les sujets âgés comparés aux sujets jeunes. D'autre part, pour la teneur globale en acide sialique, Goi *et al.*, 2000 ont observé une diminution significative des deux groupes considérés dans le vieillissement des érythrocytes. L'étude de la fluidité de la membrane (anisotropie de fluorescence) démontre que seul les érythrocytes sénescents présentent des altérations, avec des valeurs plus élevées que ceux des jeunes et d'âge moyen. La différence est plus évidente chez les sujets âgés.

La β -D-glucuronidase est présente sous deux formes, l'une faiblement associée et l'autre fermement ancrée (Goi *et al.*, 2000) dans la membrane érythrocytaire. Sur la base de ces résultats, les auteurs émettent l'hypothèse que la diminution de la fluidité membranaire peut causer la perte de la forme faiblement associée.

Dans le cas de la sialidase neutre, la diminution de la fluidité membranaire observée chez les sujets âgés peut être la raison de l'expression diminuée de cette enzyme (Goi *et al.*, 2005). En fait, l'enzyme neutre, différente de l'acide, est présent au niveau de la membrane de l'hématie sous une forme masquée (cryptic form) qui peut être démasquée *in vitro* par des modification de la structure de la bicouche lipidique (Tringali *et al.*, 2001). Par conséquent, il est imaginable que les glycohydrolases de la membrane de l'hématie soient susceptibles d'agir différemment selon les différents domaines de la membrane.

Les auteurs ont observé que les enzymes plus fermement associés à la membrane, comme l' α -D-glucosidase (Goi *et al.*, 2000) et la sialidase acide ne montrent pas statistiquement de différences significatives entre les érythrocytes des sujets jeunes et âgés, alors que le niveau de la β -D-glucuronidase, qui est faiblement associé à la membrane, est nettement plus bas chez les hématies jeunes et les moyens séparées par ultracentrifugation des sujets âgés. Ceci peut être expliqué (Goi *et al.*, 2005) par une perte prématurée de la forme faiblement associée. Est également remarquable le comportement de la sialidase neutre qui, comme les enzymes fermement associées à la membrane, ne montre pas de différences chez les jeunes érythrocytes des deux groupes, mais il augmente nettement pendant le vieillissement de l'érythrocyte chez les jeunes sujets.

Les glycohydrolases de la membrane érythrocytaire fournissent des indications utiles et précoces des changements structuraux et fonctionnels de la membrane et récemment l'attention des chercheurs s'est tournée vers les β -galactosidases dont de nombreux auteurs pensent que l'augmentation de leurs activités serait un marqueur de sénescence et d'apoptose. Pour cette raison, l'étude des relations entre cet enzyme et la sénescence érythrocytaire nous a été confiée.

CHAPITRE SECOND

TRAVAUX PERSONNELS

Nous ferons précéder l'exposé des résultats que nous avons obtenus dans le domaine de la recherche fondamentale, puis dans celui de la recherche appliquée, par la description des méthodes générales que nous avons utilisées dans ces deux domaines.

I - MATERIEL ET METHODES D'APPLICATION GÉNÉRALE

Pour l'ensemble des recherches que nous avons effectuées, nous avons utilisé la batterie suivante de critères de viabilité des hématies qui concernent tous les caractéristiques classiques suivantes des cellules en apoptose, tels que nous les avons mentionnés antérieurement : modifications de la morphologie, désialylation, externalisation de la phosphatidylsérine, phagocytose, dosage de l'ATP, mesure de l'hémolyse, test à la calcéine-AM, dosage des superoxydes, détermination du pH intracellulaire, recherche des signaux d'antiphagocytose.

1. Préparation du « biomatériel »

Les expériences ont été réalisées sur du sang humain récolté sur héparine et fourni par le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille (Directeur : Dr. Jean-Jacques Huart). Après avoir isolé les érythrocytes, nous en avons préparé les membranes et le cytosol. Par ultracentrifugation en gradient de Percoll nous avons séparé les populations d'érythrocytes jeunes, matures et sénescents. Enfin, nous avons soumis les hématies à une « sénescence accélérée » en les incubant avec des céramides ou en les gardant dans leur plasma.

1.1. Préparation de la population totale des hématies

Les cellules sanguines ont été, dans un premier temps, isolées par centrifugation (4°C, 1.000 x g, 5 min). Elles ont été ensuite lavées à 3 reprises avec plusieurs volumes de tampon PBS de pH 7,4. Après chaque lavage, la couche supérieure des leucocytes a été soigneusement éliminée par pipetage.

Nota : Les prélèvements ont été effectués, en appliquant des lois de l'éthique, avec le consentement des donneurs préalablement informés que les échantillons étaient destinés à la recherche scientifique. En outre, chacun de ces derniers a fait l'objet d'un certificat de conformité.

1.2. Préparation des membranes érythrocytaires et du cytosol

La préparation des membranes érythrocytaires a été réalisée en utilisant la méthode proposée par Gahmberg et Hakomori (1973) qui hémolysent les hématies dans un milieu hypotonique

(5mM PBS + 1mM EDTA) de pH 7,4. Pratiquement, à 1 ml de sédiment érythrocytaire, on ajoute 39 ml de tampon PBS hypotonique à 4°C et, après une forte agitation, les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 20 min à 8000 g (Ultracentrifugeuse Beckman J21, rotor JA 20). Le surnageant a été éliminé par aspiration, tandis que le culot a été resuspendu dans le même tampon hypotonique et ultracentrifugé dans les mêmes conditions. Cette opération est répétée trois fois jusqu'au blanchissement des membranes.

Pour nos recherches sur les enzymes cytosoliques (les estérases en particulier), nous avons utilisé le surnageant de la première centrifugation après sédimentation des membranes. Dans le cas particulier des estérases et pour avoir une concentration plus élevée d'enzymes, nous avons utilisé le lysat plus concentré, en lysant les hématies avec de l'eau distillée à 4°C (1/3, v/v) sous forte agitation.

1.3. Isolement des hématies sénescents, seules phagocytées par les macrophages

Principe : Une étape décisive a été franchie par l'isolement par Bratosin de la population d'hématies sénescents qui sont les seules à être phagocytées par les macrophages (Bratosin *et al.*, 1997). Cet auteur, en posant en hypothèse que les hématies sénescents devaient avoir la taille la plus faible et la densité la plus élevée et devaient, en conséquence, se situer dans la zone la plus profonde des tubes d'ultracentrifugation préparative en gradient autoformé de Percoll. Cette hypothèse s'est révélée exacte et ainsi furent isolées et décrites pour la première fois les hématies humaines sénescents qui présentent les caractéristiques suivantes :

- 1- Observées en microscopie électronique de balayage, toutes sont des sphéroéchinocytes, comme le montre la figure 28 ci-dessous.
- 2- Elles sont les plus désialylées.
- 3- Elles externalisent massivement la phosphatidylsérine contrairement aux autres populations (Fig. 30, p. 75).

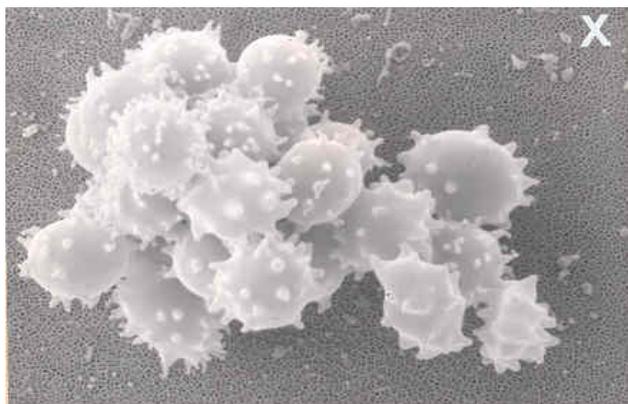


Figure 28 – Observation en microscopie électronique de balayage de la population des hématies sénescents isolées du sang humain par ultracentrifugation en gradient autoformé de Percoll selon le procédé de Lutz *et al.* (1992) modifié par Bratosin *et al.* (Résultats non publiés).

4- Elles sont les seules hématies à être capturées (Fig. 29 ci-dessous), puis phagocytées.

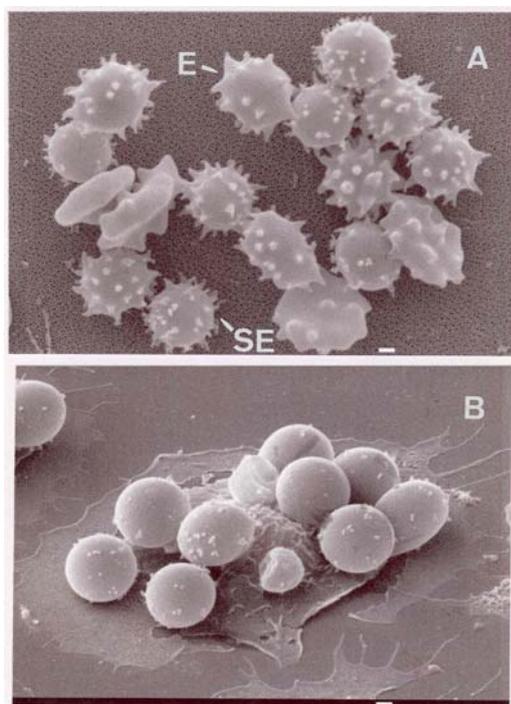


Figure 29 – Observation en microscopie électronique de balayage de la capture spécifique des hématies sénescents (B) par les macrophages de souris incubés avec un mélange des différents types d'hématies (A) : échinocytes (E) et sphéroéchinocytes (SE). Seuls ces derniers ont été capturés. Barre: 1 μ m (Bratosin *et al.*, 1997b).

Mode opératoire : Les hématies sont déposées à la surface d'une solution de Percoll avec une osmomolalité de 320 à 330 mosmol/kg. Cette osmomolalité est obtenue par la dilution de 151 ml solution de Percoll commercial (340 mOs/kg H₂O) avec un tampon Percoll qui contient 114 mM NaCl, 0.05% D-glucose, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaH₂PO₄.H₂O, jusqu'à 200 ml. Le pH a été ajusté à 7,2 avec une solution de KOH 1 M. Le fractionnement des hématies s'effectue avec un hématocrite de 15% dans des tubes de 40 ml à l'aide d'une ultracentrifugeuse Beckman J2-21, équipée d'un rotor JA 20, pendant 60 min à 16500 rpm et 4°C. Les bandes obtenues ont été récupérées par aspiration et l'élimination de particules de Percoll (silice colloïdale liée au polivinylopyrrolidone) par dilution avec du tampon PBS de pH 7,4 contenant 0,2 mM de PMSF, suivi d'une centrifugation à 1000xg pendant 5 min à 4°C. Cette opération a été répétée trois fois. Les cellules situées à la surface de la bande majeure ont été récupérées: elles constituent la population des hématies jeunes. Les fractions les plus denses ont été aspirées. Elle constitue la population des hématies âgées. L'homogénéité et la qualité des populations ont été vérifiées par une nouvelle séparation en Percoll et par analyse en "dot-plot" par cytométrie de flux dans le système FSC/SSC.

1.4. Fixation des hématies

En vue de leur conservation, les hématies destinées à l'utilisation des lectines ont été incubées (5×10^8 cellules/ml) pendant 10 min à 20°C avec une solution de fixation (2 g formaldéhyde et 0.2 g glutaraldéhyde dans 100 ml du tampon PBS pH 7,4). Après 3 lavages avec du tampon PBS pH 7.4, les cellules ont été resuspendues dans le même tampon (2×10^7 cellules/ml).

Pour la microscopie électronique de balayage 200×10^7 cellules ont été fixés à l'aide de 2 ml de tampon cacodylate 0.1M glutaraldéhyde 1,25% de pH 7,2 et observées à l'aide d'un microscope électronique CF JEOL 35.

2. Méthodes analytiques

2.1. Méthodes cytométriques

La plupart des critères de viabilité que nous avons appliqués aux hématies sont fondés sur l'analyse par cytométrie en flux qui a été effectuée à l'aide d'un cytofluorimètre Becton Dickinson de type FACScalibur. Les données obtenues ont été collectées et analysées à l'aide d'un ordinateur de type Mackintosh, en utilisant le programme CellQuest. L'analyse par la diffusion de la lumière a été faite dans un système linéaire et celle de la fluorescence dans un système logarithmique.

2.1.1. Etude des modifications morphologiques des hématies par dot-plots FSC/SSC bi- et tridimensionnels

Cette technique qui sépare les populations d'hématies viables et sénescents est fondée sur les changements de morphologie (FSC) et de densité (SSC) des cellules. Pour chaque échantillon constitué de 900µl de tampon Isoton (le liquide même qui circule dans le cytofluorimètre) et de 100µl de suspension érythrocytaire obtenue en ajoutant 1µl de sédiment dans 1ml tampon PBS (soit 2×10^7 hématies), 10.000 cellules ont été analysées dans le système « dot-plot » où les hématies se répartissent selon leur taille (FSC) et leur densité (SSC).

Nota : Nous avons introduit de nouveaux paramètres, grâce au logiciel dont le cytofluorimètre est équipé et que nous avons mis au point : le « X Geo Mean » lié à la taille des cellules et le « Y Geo Mean » lié à leur densité. Ces paramètres permettent de quantifier d'une manière exacte la taille et, respectivement, la densité des cellules.

2.1.2. Mesure par cytofluorimétrie de l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) : test à l'Annexine-V-FITC

Principe : Chez les hématies viables, la phosphatidylsérine est implantée dans le feuillet lipidique interne de la membrane et est donc orientée vers le cytosol. Au cours du vieillissement, sous l'action de flipases ou de scramblases, elle passe dans le feuillet lipidique externe et est donc externalisée. Comme nous l'avons souligné antérieurement, la phosphatidylsérine est considérée

comme un marqueur de phagocytose, reconnu par un récepteur spécifique de la membrane macrophagique. L'annexine-V-FITC est classiquement utilisée pour déterminer quantitativement le pourcentage de cellules sénescents ou en apoptose. L'annexine-V est une protéine de (35-36 kD), Ca^{2+} dépendante qui a une très grande affinité pour la charge négative des phospholipides et plus spécifiquement pour la phosphatidylsérine. Liée à un fluorochrome, comme l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), elle est un excellent marqueur des cellules apoptotiques.

Mode opératoire : 100 μl de suspension d'hématies (1×10^5 cellules) dans un tampon HEPES de pH 7,4 préparé par dilution au dixième de la solution-mère fournie par Pharmingen sont incubés pendant 15 minutes à la température du laboratoire et à l'obscurité, avec 5 μl (0.05 μg) de solution stock d'annexine V-FITC. Les hématies sont ensuite suspendues dans 400 μl de tampon HEPES et analysées (10.000 cellules) par cytofluorimétrie en flux dans le mode FL1 (fluorescence de l'annexine V-FITC)/FL2 (autofluorescence des hématies) à l'aide du programme CellQuest. La fluorescence (FL1) est exprimée en échelle logarithmique.

Un exemple caractéristique des résultats obtenus est donné dans la figure 28 ci-dessous :

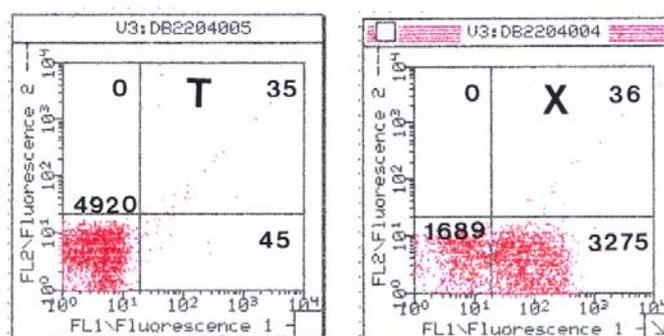


Figure 30 – Dot-plot dans le mode FL2/ FL1 de la fixation de l'annexine-V sur les populations d'hématies totales (T) et sénescents (X). Cadran supérieur droit : cellules non-identifiées ; Cadran inférieur gauche : région des hématies annexine V-négatives ; Cadran inférieur droit : région des hématies annexine V-positives. Nombre de cellules comptées : 5.000. Les valeurs portées dans les cadrans indiquent les quantités d'hématies concernées (d'après Bratosin *et al.*, 1997).

2.1.3. Analyse par cytofluorimétrie en flux des modifications des structures glycaniques : test des lectines-FITC

En utilisant des lectines-FITC on peut visualiser par cytofluorimétrie en flux les modifications que subissent les structures glycaniques à la surface des érythrocytes. Pour chaque

lectine, nous avons défini une concentration qui permette d'éviter l'hémagglutination. Une solution de lectine-FITC dans le tampon PBS-PMSF (0,2mM) a été ajoutée à 1ml de suspension d'hématies (en PBS/PMSF) correspondant à 10^6 cellules. Après une heure d'incubation à 4°C à l'abri de la lumière, les échantillons ont été analysés par cytofluorimétrie en flux dans le système FL1/FL2. Les résultats ont été exprimés en nombre de sites de fixation calculés à partir des valeurs des « means » logarithmiques de fluorescence. La capacité de liaison et la constante de dissociation sont calculées à l'aide du logiciel Enzfitter Biosoft Software (Cambridge, UK) par la méthode de Scatchard (Scatchard, 1949).

Ce protocole a été appliqué aux lectines-FITC suivantes : lectines spécifiques des acides sialiques : *Wheat germ* agglutinin (WGA) de spécificité large, *Sambucus nigra* (SNA) spécifique des liaisons α -2,6-sialyl et *Maackia amurensis* (MAA) spécifique des liaisons α -2,3-sialyl ; lectines spécifiques des résidus terminaux β -galactosyl dévoilés par la désialylation : *Ricinus communis* (RCA₁₂₀) et *Erythrina cristagalli* (ECA) ; *Helix pomatia* (HPA) spécifique des résidus α - et β -N-acétylgalactosaminyl, *Dolichol biflorus* (DBA) spécifique des résidus α -N-acétylgalactosaminyl.

2.1.4. Dosage cytométrique des radicaux libres (« Reactive Oxygen Species » ou ROS)

Ces composés, hautement réactionnels, s'attaquent, pour les dénaturer, aux protéines et aux lipoprotéines et sont, dans une large mesure, facteurs d'apoptose et de mort cellulaire.

Principe : Dans certaines conditions, les cellules surproduisent les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui oxydent à leur tour la cardiolipine de la membrane interne. Ces changements peuvent être détectés en utilisant des techniques de cytométrie en flux.

Les ROS sont constamment produites dans des conditions normales par suite du métabolisme aérobie des cellules. Elles incluent les radicaux libres tels que l'anion superoxide O_2^- , les radicaux hydroxyle $\cdot OH$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Elles sont des espèces passagères dues à leur réactivité chimique élevée et peuvent réagir avec l'ADN, les protéines, les hydrates de carbone et les lipides d'une façon destructive. L'induction de l'apoptose par le stress oxydatif a été montré par des études où l'addition des niveaux bas du ROS induisaient l'apoptose et l'observation que les divers antioxydants tels que la N-acétylcystéine (NAC) peuvent empêcher la mort des cellules (Lennon *et al.*, 1991). En outre, la production des ROS se produit dans

l'apoptose induite par le TNF et par Fas (Wolfe *et al.*, 1994 ; Suzuki *et al.*, 1998) aussi bien que dans le traitement des cellules par divers agents comme l'irradiation ultra-violette et les drogues chimiothérapeutiques (Zamzami *et al.*, 1995 ; Gorman *at al.*, 1998). Les ROS sont des espèces de courte durée de vie et ont habituellement une demi-vie de moins d'une seconde ce qui rend difficile la détection des effets oxydants dans l'apoptose.

La cytométrie en flux ou la fluorimétrie sont employées pour détecter les ROS à l'aide du diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (DCFH-DA) qui représente la technique le plus largement répandue pour mesurer directement l'état redox d'une cellule illustrée par la figure 29 ci-dessous. Il s'agit d'une molécule perméable pour la cellule et non-fluorescente. Elle présente beaucoup d'avantages par rapport à d'autres techniques. En particulier, elle est très facile à employer, est extrêmement sensible aux changements de l'état redox d'une cellule et est peu coûteuse. Elle peut être utilisée pour suivre les changements de ROS dans le temps. Les estérases cellulaires, en hydrolysant les groupements acétyles, clivent le DCFH-DA non-fluorescent en 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (DCFH₂) fluorescent, réaction schématisée dans la figure 31 ci-dessous :

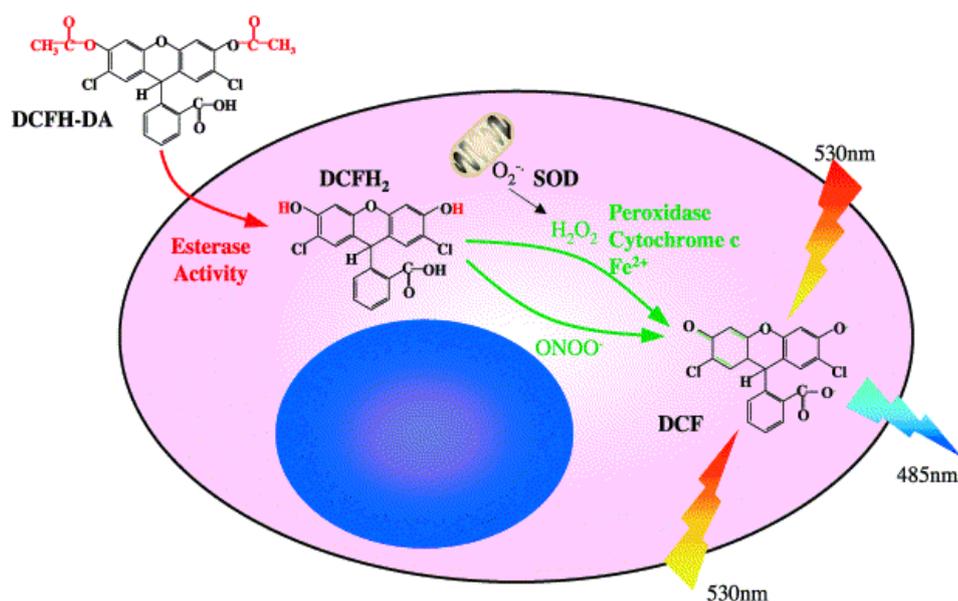


Figure 31 - Mécanisme de la désacétylation du DCFH-DA, molécule perméable vis-à-vis de la membrane et précurseur non-fluorescent de DCF, fluorescent et imperméable vis-à-vis de la membrane.

Les peroxydases, le cytochrome c et les ions Fe^{2+} oxydent DCFH₂ en 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF) en présence de peroxyde d'hydrogène. L'accumulation de DCF dans les cellules peut être mesurée par l'augmentation de la fluorescence à 530 nm quand l'échantillon est excité à 485 nm. La fluorescence à 530 nm peut être mesurée en utilisant un cytomètre d'écoulement et est proportionnelle à la concentration du peroxyde d'hydrogène dans les cellules (Bass *et al.*, 1983 ; Royall et Ischiropoulos, 1993).

Mode opératoire :

- Préparer une solution stock 100mM de DCFH-DA (50mg dans 1ml de DMSO)
- Préparer extemporanément une solution réactive 500µM en ajoutant 1µl de solution stock à 499µl d'eau ppi
- A 50 µl d'une suspension d'hématies (10^7 cellules dans 1ml de tampon PBS de pH 7,4), on ajoute 450µl du même tampon et 10µl de la solution 500µM de DCFH-DA (concentration finale en DCFH-DA: 10µM)
- Après une incubation à 37°C pendant 1 heure à l'obscurité, les mesures sont effectuées par analyse cytofluorimétrique en flux dans le mode FL1 porté en abscisses, les ordonnées correspondant au nombre de cellules.

Contrôle de l'expérience (témoin positif): Après l'incubation, un échantillon-témoin est centrifugé (5 min, 2000 rpm, 4°C). Une fois le surnageant éliminé, on ajoute 1 ml de tampon PBS de pH 7.4 en 2mM H₂O₂. Après une incubation à 37°C pendant 1 h à l'obscurité, l'échantillon est analysé en cytofluorimétrie dans le mode FL1 porté en abscisses, les ordonnées correspondant au nombre de cellules.

2.1.5. Test de viabilité cellulaire. Test à la calcéine-AM

Introduction :

Les travaux pionniers de Brunning *et al.* (1980) ont conduit à la mise au point de méthodes utilisant des marqueurs fluorescents pour explorer la viabilité cellulaire et étudier la cytotoxicité de substances les plus diverses. La plupart de ces méthodes utilisent la calcéine-AM, un dérivé de la fluorescéine, considéré comme le meilleur indicateur de la viabilité et de la cytotoxicité cellulaire grâce à sa rétention supérieure dans la cellule et à l'intensité de la fluorescence au pH physiologique (Haugland, 2002 ; Weston *et al.*, 1990). Dans la dernière

décade, le test à la calcéine-AM a remplacé la méthode conventionnelle au ^{51}Cr d'étude de la viabilité (Bell *et al.*, 1988 ; Levesque *et al.*, 1995 ; Noel-Hudson *et al.*, 1997 ; Kapanen *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2002 ; Kaya *et al.*, 2003) et de la cytotoxicité (Callewaert *et al.*, 1991 ; Wang *et al.*, 1993 ; Papadopoulos *et al.*, 1994 ; Lichtenfels *et al.*, 1994 ; Roden *et al.*, 1999 ; Neri *et al.*, 2001) et il a été utilisé pour quantifier l'apoptose (Estaquier *et al.*, 1996 ; Gatti *et al.*, 1998 ; King *et al.*, 2000 ; Ben *et al.*, 2001 ; Green *et al.*, 2002 ; Gylys *et al.*, 2004).

Initialement appliqué aux cellules nucléées, ce test a été étendu aux hématies humaines par D. Bratosin qui l'avait découvert dans le Handboock of Fluorescent Probes de R. Haugland (édition de 1996). Dans le cadre d'un travail d'équipe mené en étroite collaboration avec Carmen Palii, nous avons participé à sa mise en place parmi les critères de viabilité des hématies destinées à la transfusion et sommes parvenue à la conclusion qu'il représentait un test de choix en raison de sa simplicité, de sa sensibilité et de sa fiabilité – de sa reproductibilité, en particulier. Il a fait l'objet d'un mémoire paru dans *Cytometry* et intitulé : D. Bratosin, L. Mitrofan, C. Palii, J. Estaquier and J. Montreuil, A novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and ageing *Cytometry* 66A (2005) 78-84.

Principe : Ce test est fondé sur l'utilisation de la calcéine-AM, un ester acétique non-fluorescent de la fluorescéine (Fig. 32 ci-dessous), qui traverse passivement les membranes des cellules viables et est transformé par les estérases cytosoliques en calcéine fluorescente qui donne un signal vert intense à 530 nm. Celle-ci n'est retenue que par les cellules possédant une membrane intacte dans laquelle la « multidrug resistance protein » (MRP) est inactive (Homolya *et al.*, 1993 ; Hollo *et al.*, 1996). La disparition de la calcéine signe donc, à la fois, la diminution de l'activité estérasique caractéristique des cellules en apoptose et la fuite de ce composé hors les cellules en apoptose en raison de la perméabilisation de leur membrane. Ces deux mécanismes complémentaires font de la calcéine-AM un excellent test de viabilité des hématies destinées à la transfusion, en particulier.

Mode opératoire :

- Préparer une solution stock 1mM de calcéine-AM à 1mg dans 1ml de DMSO
- Préparer extemporanément une solution réactive 100µM en ajoutant 10µl de la solution stock à 490µl de tampon PBS pH 7,4

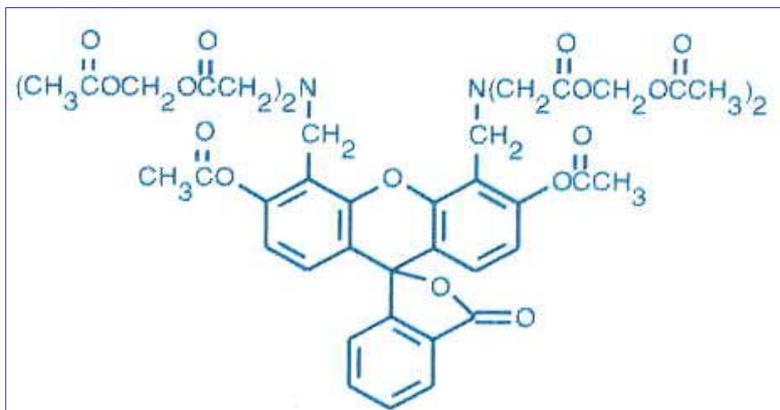


Figure 32 – Formule chimique de l'acétoxyméthyl ester de la fluorescéine (Calcéine-AM).

- A 20 μl d'une suspension d'hématies (10^7 cellules dans 1ml de tampon PBS pH 7,4) on ajoute 180 μl du même tampon et 10 μl de la solution 100 μM de calcéine AM (concentration finale en calcéine AM : 1 μM)
- Après une incubation à 37 $^\circ\text{C}$ pendant 45 min à l'obscurité, on ajoute 150 μl de tampon PBS pH 7,4
- Les mesures sont effectuées par cytofluorimétrie en flux dans le mode FL1 porté en abscisses, les ordonnées correspondant au nombre de cellules.

D'autre part, nous avons réalisé un double marquage par l'annexine-V marquée à la phycoérythrine et par la calcéine-AM en vue de préciser l'ordre chronologique de la diminution de l'activité estérasique, d'une part, et de l'externalisation de la phosphatidylsérine, d'autre part, dans les conditions suivantes.

Les hématies sont d'abord incubées pendant 45 min à 37 $^\circ\text{C}$ en présence de calcéine-AM (0,5 μM) comme décrit ci-dessus. Elles ont ensuite été isolées par centrifugation (2000 x g, 4 $^\circ\text{C}$ pendant 5 min) et reprises dans 100 μl de tampon HEPES de pH 7,4 contenant du chlorure de calcium 2,5mM et incubées avec 10 μl d'annexine-V marquée à la phycoérythrine (annexine-V-PE) pendant 15 min à la température de laboratoire et à l'abri de la lumière. Après l'addition de 400 μl de tampon HEPES calcique, les cellules ont été analysées en histogrammes biparamétriques FL1 (calcéine) versus FL2 (annexine-V-PE). Les expérimentations ont été réalisées en triple exemplaire.

Pour la mesure de l'activité estérasique du cytosol des hématies pré-traitées, 10^6 hématies ont été hémolysées avec 300 μ l d'eau distillée. Après élimination des membranes (10.000 g ; 4°C ; 20 min), la fluorescence du cytosol a été déterminée en utilisant un lecteur en plaques de fluorescence (Microplate Fluorescence Reader FLx800, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) équipé d'un logiciel KC Junior. Les conditions de la lecture sont les suivantes : excitation à 485 nm; émission à 528 nm; sensibilité: 100. Les résultats ont montré que les échantillons ainsi préparés ont donné une fluorescence très forte (50.000 unités de fluorescence) vis-à-vis du témoin (800 unités de fluorescence). Le protocole a été appliqué trois fois et les résultats sont reproductibles, avec une déviation de $\pm 15\%$.

Pour la mesure de l'activité estérasique du cytosol des hématies non-traitées, le cytosol a été préparé comme décrit au point 1.2. et, après élimination des membranes (10.000 g ; 4°C ; 20 min), 250 μ l du surnageant ont été incubés avec 15 μ l (100 μ M) de calcéine-AM à 37°C pendant 45 minutes à l'obscurité dans des plaques NUNCLON™. L'intensité de la fluorescence a été mesurée dans les conditions décrites au point 2.2.5.1. Le même protocole a été appliqué aux prélèvements témoin.

Résultats

2.1.5.1. Influence du temps d'incubation sur le marquage par la calcéine-AM

Comme le montre la figure 33 (p. 82), l'hydrolyse de la calcéine-AM par les estérases cytosoliques augmente rapidement après 45 min d'incubation. Au delà, l'intensité du "mean de fluorescence" se stabilise en raison de la libération spontanée de la calcéine concomitante à la perméabilisation de la membrane pendant les temps prolongés de l'incubation. Nous avons donc choisi un temps d'incubation de 45 min qui correspond au point d'inflexion des deux courbes de tendance. La figure 34 (p. 82) montre que, dans ces conditions expérimentales, deux régions correspondant l'une aux cellules marquées et l'autre aux cellules non-marquées sont clairement définies.

2.1.5.2. Le test de la calcéine-AM est spécifique de l'activité estérasiques du cytosol des hématies

Pour démontrer que ce test est spécifique des estérases cytosoliques et non des estérases membranaires, comme l'acétylcholinestérase un enzyme extracellulaire des hématies humaines

dont l'activité diminue significativement avec le vieillissement (Prall *et al.*, 1998), la calcéine-AM a été ajoutée à la fraction cytosolique préparée selon un protocole décrit précédemment (p. 70).

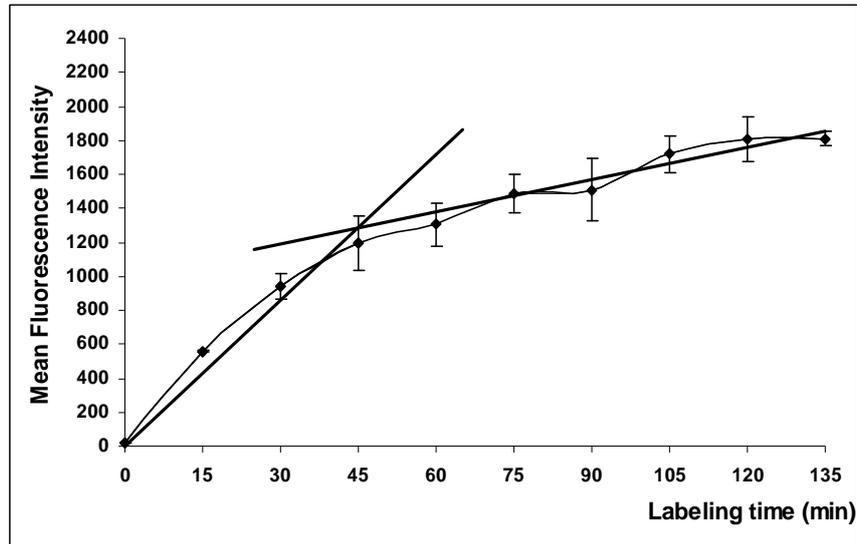


Figure 33 – Cinétique de l'activité estérasiqne du cytosol d'hématies humaines exprimée en « Mean Fluorescence Intensity » (MFI) ± déviation standard. Les incubations ont été effectuées sur les hématies de 3 patients différents en présence de calcéine-AM 5 μ M à 37°C pendant des temps variant de 0 à 50 min.

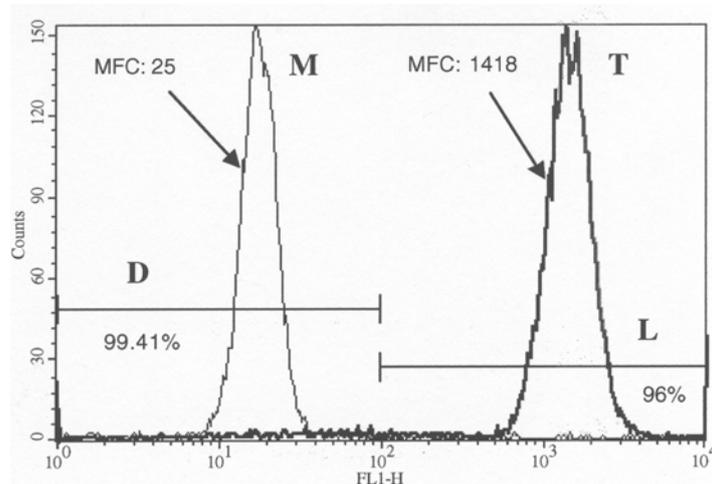


Figure 34 – Analyse comparative par cytofluorimétrie en flux dans le mode FL1 (fluorescence de la calcéine) d'hématies traitées en présence et en absence d'une saponine, puis incubées en présence de calcéine-AM. En abscisses : intensité de la fluorescence exprimée en « Mean Fluorescence Intensity » (MFI) ; en ordonnées : nombre relatif de cellules comptées.

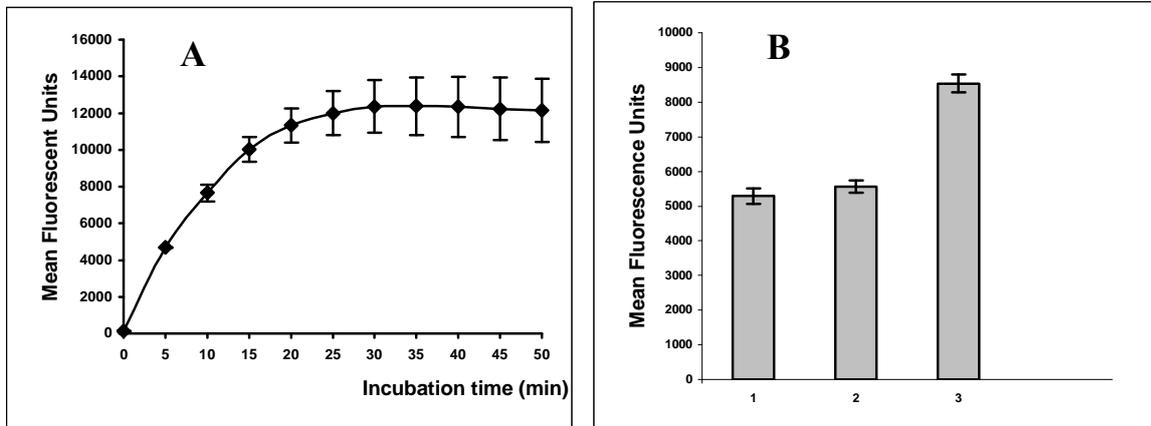


Figure 35 – **A** - Effet du temps d'incubation sur l'activité estérasique du cytosol des hématies humaines vis-à-vis de la calcéine-AM. En abscisses : temps d'incubation (en min) ; en ordonnées : « Mean Fluorescence Intensity » (MFI) \pm déviation standard. Expérimentation effectuée en triple exemplaire. **B** - Intensité de la fluorescence du cytosol d'hématies préincubées (37°C, 45 min) avec la calcéine-AM avant d'être lysées. La fraction cytosolique des hématies de trois donneurs différents a été analysée et les valeurs de MFI (en ordonnées) sont celles de 3 expérimentations différentes.

Comme le montre la figure 35 A, l'analyse spectrofluorimétrique effectuée à l'aide d'un lecteur de fluorescence en plaques démontre sans ambiguïté que le cytosol des érythrocytes contient les estérases actives et que le plateau est acquis en moins de 30 min en raison de l'absence de la barrière membranaire.

Ce résultat est confirmé par l'intensité de la fluorescence mesurée sur les fractions cytosoliques des hématies préincubées (37°C pendant 45 min) en présence de la calcéine-AM (5 μ M) avant d'être lysées. Comme le montre la figure 35 B, les expérimentations ont été réalisées avec des hématies de trois donneurs différents. Elles révèlent une fluorescence intense qui varie d'un individu à l'autre.

2.1.5.3. Le test à la calcéine-AM est un marqueur de l'intégrité membranaire

Pour vérifier que le test à la calcéine-AM est un marqueur de la perméabilisation membranaire et de mort cellulaire, nous l'avons appliqué à des hématies traitées par une saponine. La figure 36 de la page suivante est très démonstrative de l'efficacité du test au vu de la diminution spectaculaire de la fluorescence des cellules qui passe de 1420 à 25 MFI. Elle confirme la séparation nette et sans ambiguïté du territoire des cellules viables de celui des

cellules mortes. Elle montre, en outre, que le « test calcéine-AM » représente un excellent critère pour rechercher les effets toxiques de substances.

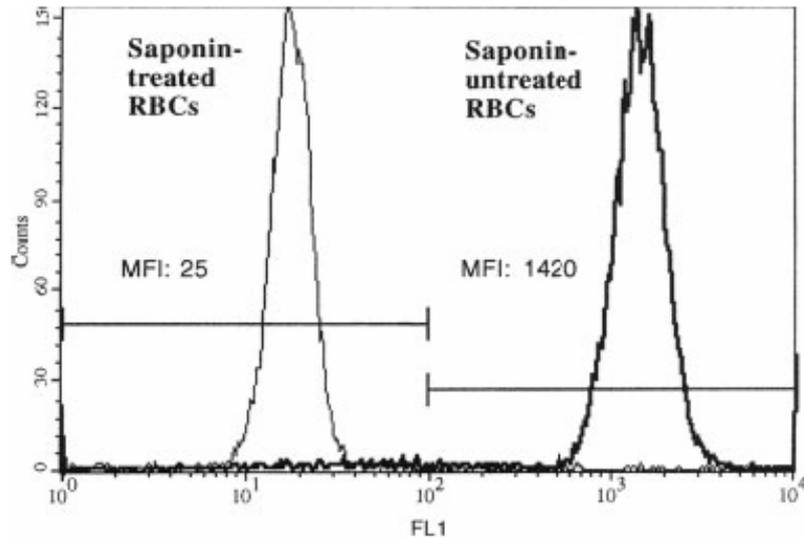


Figure 36 – Analyse cytométrique de la fluorescence dans le mode FL1 des hématies traitées par la saponine et par la calcéine-AM. Histogrammes superposés des hématies traitées et non-traitées par la saponine et marquées à la calcéine-AM. MFI: intensité du mean de fluorescence. Abscisses: intensité de la fluorescence en échelle logarithmique. Ordonnées: nombre relatif de cellules. Nombre de cellules comptées: 10.000. Les résultats sont représentatifs de trois expérimentations.

2.1.5.4. La calcéine-AM est un marqueur de l'apoptose des hématies humaines induite par les ions Ca^{2+}

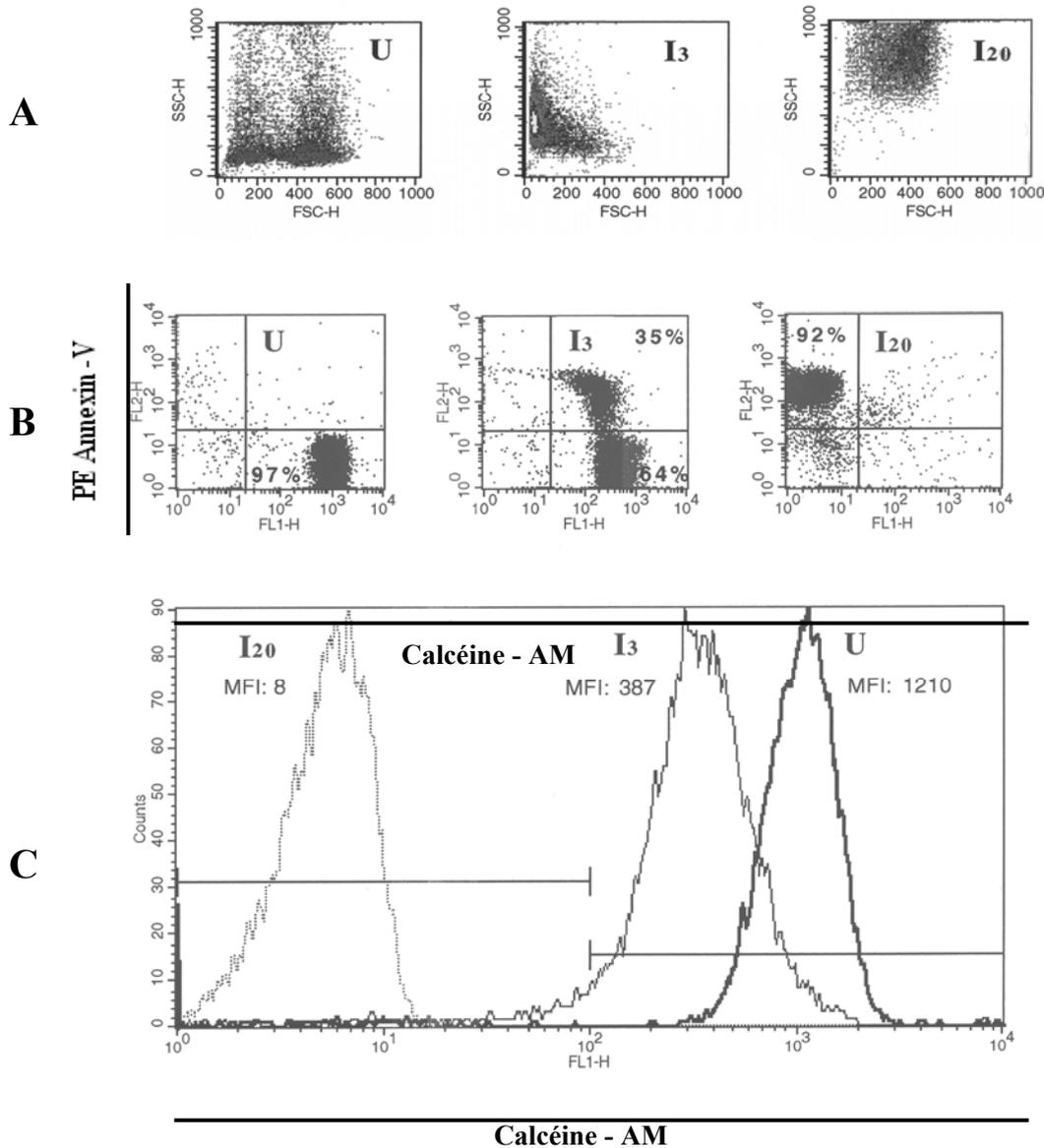
La mort programmée des hématies portant les caractéristiques des cellules nucléées en apoptose, comme les modifications morphologiques et l'externalisation de la phosphatidylsérine peut être induite par influx de calcium (Bratosin *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2001; Bratosin *et al.*, 2002). Nous avons appliqué ce procédé en vue de comparer les données fournies par le test à la calcéine-AM, d'une part, et par les tests classiques appliqués aux hématies sénescents, d'autre part dot-plot FSC/SSC, test à l'annexine-V et dosage de l'ATP. Les résultats que nous avons obtenus se résument de la manière suivante.

1°) L'analyse cytofluorimétrique dans le mode FSC (taille des cellules)/SSC (densité des cellules) (Fig. 37 A) et témoignent de la diminution dramatique de la taille accompagnée d'une augmentation de la densité des cellules, la région supérieure gauche correspondant aux hématies de volume le plus réduit et de densité la plus élevée.

2°) Le double marquage des hématies par l'annexine-V-PE et par la calcéine-AM montre que la diminution de l'activité estérasique précède l'externalisation de la phosphatidylsérine.

En effet, au terme de 3 heures d'incubation (I₃), alors que l'activité estérasique a diminué des deux tiers, la valeur du MFI passant de 1210 à 387 (Fig. 37 C), 35% seulement des hématies sont annexine-V-positives (Fig. 37 B, I₃, cadran supérieur droit). Après 20 heures d'incubation (I₂₀), l'activité estérasique a totalement disparu (Fig. 37 C) alors que 92% des cellules survivantes sont annexine-V-positives (Fig. 37 B, I₂₀, cadran supérieur gauche).

3°) La diminution de l'activité estérasique est parfaitement corrélée avec celle de la concentration en ATP, un autre marqueur de sénescence et d'apoptose cellulaire, qui passe de 54 $\mu\text{M/dL}$ de sang à 22 μM , puis à 4 μM après 3 heures et 20 heures d'incubation respectivement (Fig. 37 D).



D

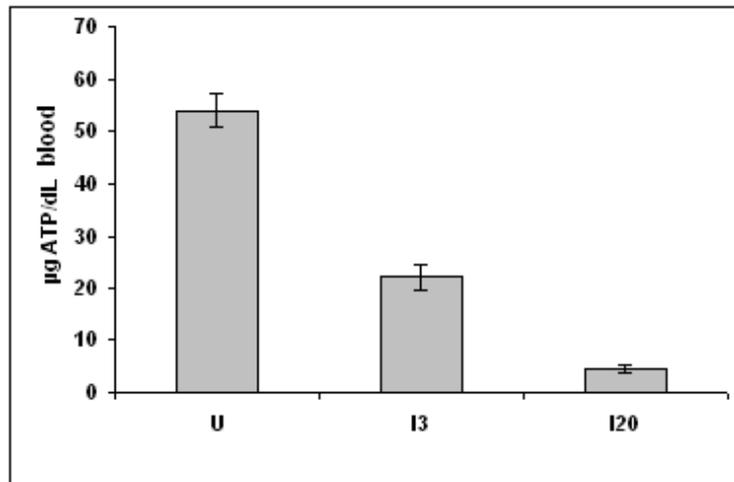


Figure 37 - Analyse comparative des modifications morphologiques, de l'externalisation de la phosphatidylsérine, de l'activité des estérases cellulaires et du contenu en ATP des hématies humaines incubées en absence (U pour « untreated ») et en présence d'ionophore A 23187 (0,5 µM) et de chlorure de calcium (2,5 mM) pendant 3h (I₃) et 20h (I₂₀).

A: Analyse en dot-plot des modifications morphologiques. En abscisses: FSC (taille); en ordonnées: SSC (densité). La région supérieure gauche du dot-plot correspond aux cellules à volume réduit et à haute densité.

B: Analyse par cytofluorimétrie en flux dans le mode FL1 (calcéine-AM)/ FL2 (annexine-V-PE) des hématies doublement marquées à la calcéine-AM et à l'annexine-V- PE. Cadran inférieur droit: région des cellules calcéine-positives et annexine-V-négatives; cadran supérieur droit: cellules calcéine- et annexine-V- positives, cadran supérieur gauche: cellules calcéine-négatives et annexine-V-positives. Dans chaque cadran est indiqué le pourcentage de chaque population cellulaire. Nombre de cellules comptées: 10.000.

C: Histogrammes superposés (un seul paramètre) des hématies marquées à la calcéine-AM. En abscisses: intensité de la fluorescence verte de la calcéine en échelle logarithmique; en ordonnées: nombre relatif de cellules. Nombre de cellules comptées: 10.000. Ces résultats sont ceux d'une expérimentation représentative sur trois réalisées.

D: Histogramme de l'évolution du contenu d'ATP des hématies non-traitées (U) et traitées par le Ca²⁺-ionophore (I₃ et I₂₀). Les données représentent la moyenne ± SD de trois expérimentations.

2.1.5.5. Le test à la calcéine-AM est un marqueur du vieillissement des hématies

En vue de vérifier si le test de la calcéine-AM pouvait être un marqueur du vieillissement physiologique des hématies circulantes, nous avons isolé par ultracentrifugation en gradient de densité auto-formé de Percoll les sous-populations d'hématies jeunes et âgées en appliquant le procédé de Lutz *et al.* (1992) modifié par Bratosin *et al.* (1995). Dans ces conditions, le pourcentage des cellules isolées est de l'ordre de 1.0 ± 0.2 % pour les deux populations, valeurs similaires à celles obtenues par Sorette *et al.* (1991) et par Bratosin *et al.* (1995). Comme le montre la figure 38A, la fluorescence de la calcéine des hématies âgées est plus faible comparée à

celle des hématies jeunes, révélatrice d'une diminution de l'activité estérasique. Parallèlement, nous avons observé une bonne corrélation avec la teneur des cellules en ATP qui est plus faible dans le cas des cellules âgées par rapport aux cellules jeunes (Fig. 38 B).

Ces résultats démontrent que le test à la calcéine-AM peut être utilisé comme marqueur du vieillissement physiologique des hématies.

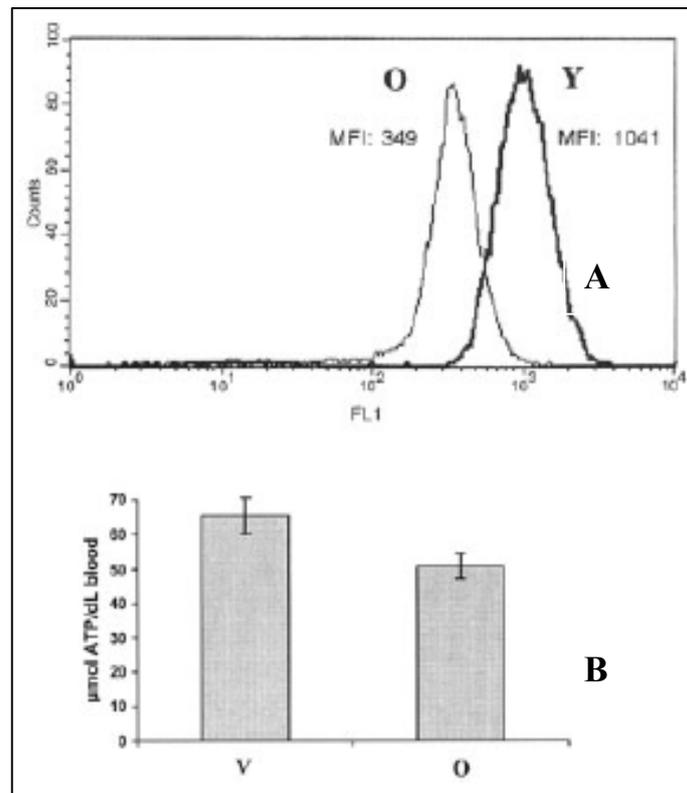


Figure 38 – **A**: Histogramme de l'activité estérasique des érythrocytes jeunes (Y) et âgés (O) isolés par ultracentrifugation en gradient auto-formé de Percoll selon Lutz *et al.* (1992) et modifié par Bratosin *et al.* (1995). Les valeurs représentent les means de fluorescence (MFI). En abscisses: intensité de la fluorescence en échelle logarithmique (FL1). En ordonnées: nombre relatif de cellules. Nombre de cellules comptées: 10.000. Les résultats proviennent d'une expérimentation représentative de quatre réalisées. **B**: Evolution du contenu en ATP des hématies jeunes (Y) et âgées (O). Les valeurs en ordonnées représentent la moyenne \pm SD de trois expérimentations.

Conclusions

En conclusion, nous pouvons affirmer que le test à la calcéine-AM pourrait être le « test absolu » de viabilité des hématies en raison de sa simplicité et de sa reproductibilité. D'autre part, nous avons démontré que la diminution de l'activité estérasique était un événement précoce qui précédait l'externalisation de la phosphatidylsérine. Le test de la calcéine-AM est donc, de ce point de vue, beaucoup plus annonciateur d'une souffrance cellulaire que le test à l'annexine-V. En dernier lieu, le test à la calcéine-AM sera très précieux dans la recherche de nouveaux milieux de prélèvement et de stockage des hématies destinées à la transfusion.

2.1.6. Mesure de l'érythrophagocytose

2.1.6.1. Principe : La méthode consiste à marquer les hématies par la PKH-26, un fluorochrome rouge à l'excitation 551 nm et les caractéristiques de l'émission (567 nm) compatibles avec des systèmes de détection de rhodamine ou de phycoérythrine. Il est stable et n'a aucun effet secondaire toxique sur les cellules qui maintiennent leur activité biologique et proliférative. Ce composé se fixe, à l'aide de sa chaîne hydrophobe de 26 atomes de carbone, instantanément et irréversiblement dans la couche lipidique des hématies. Après incubation de ces dernières en présence de macrophages, elles sont aisément détectées par cytofluorimétrie en flux si ces derniers les ont phagocytées.

2.1.6.2. Mode opératoire :

Isolement des macrophages péritonéaux de souris : L'animal est sacrifié par anesthésie. Après badigeonnage avec de l'éthanol à 90°, l'abdomen est incisé en vue de dégager le péritoine qui est ensuite lavé avec du PBS. Le lavage péritonéal est centrifugé à la température du laboratoire (350 x g ; 5 min), puis le sédiment cellulaire est suspendu dans du milieu DMEM et la suspension cellulaire obtenue est répartie (500µl/puit contenant $2-4 \times 10^{5-6}$ cellules) dans des plaques à puits en polystyrène. La suspension cellulaire est ensuite incubée pendant 1 h à 37°C sous atmosphère contenant 5% CO₂. Après élimination des cellules non-adhérentes par plusieurs lavages successifs avec du DMEM froid, on incube pendant 3h à 37°C sous 5% CO₂ en milieu DMEM complet (DMEM contenant 20% de sérum de veau fœtal et supplémenté avec 1 g p. 1000 de glutamine). La couche des macrophages adhérents et activés est prête à pour les tests de phagocytose.

Marquage des hématies à la PKH-26 : Les hématies sont lavées trois fois avec du tampon PBS de pH 7,4 pour bien éliminer les protéines, puis 50 µl de sédiment érythrocytaire sont suspendus dans 1ml de "diluant C" contenu dans le kit de marquage. Parallèlement, on prépare une solution de PKH-26 2µM dans le "diluant C" et on y ajoute la suspension érythrocytaire. La suspension est soigneusement mélangée par pipetages successifs. Après 4 min d'incubation à la température du laboratoire, la réaction est stoppée en ajoutant 2 ml du sérum de veau fœtal (un volume égal à l'échantillon), puis après une incubation d'une minute, on ajoute 4 ml de milieu DMEM complet. Après centrifugation (5 min, 2.000 g, 25°C), on transfère les cellules dans un tube à centrifuger et on lave le sédiment 3 fois avec 10 ml de milieu DMEM complet.

Le marquage à la PKH-26 doit être effectué dans du matériel en polypropylène ou en verre afin d'éviter son adsorption sur les parois de tubes en polystyrène. L'uniformité du marquage à PKH-26 est vérifiée par cytométrie en flux (histogrammes FL2) en analysant une suspension en PBS des hématies ainsi marquées.

Phagocytose : Sur la couche des macrophages adhérents, on ajoute 1,5 ml DMEM, 150µl de sérum homologue (ou un mélange de sérum homologue et de sérum humain O⁺) et 2 µl de sédiment d'hématies-PKH-26 pour chaque puit (plaque à puits en polystyrène NUNCLONTM) de 16 mm. Après 1 à 2 h d'incubation à 37°C sous atmosphère de 5% CO₂, les érythrocytes non-adhérés sont éliminés par 3 ou 4 lavages successifs avec 500µl DMEM/puit. On lyse ensuite les hématies adhérentes non-phagocytées par incubation avec 500µl d'une solution hypotonique (140mM NH₄Cl, 17mM Tris) pendant 5 min à 37°C. Après la lyse, les macrophages sont lavés avec du DMEM et on incube l'échantillon avec une solution de lidocaïne dans du PBS (4 mg de lidocaïne/ml PBS pH 7,4 +5 mM EDTA) sur glace, pendant 15 à 30 min et, par pipetages successifs, on détache les macrophages. Après centrifugation (5 min, 350 x g, 4°C), le sédiment ainsi obtenu est lavé avec du tampon PBS de pH 7,4. Les macrophages sont ensuite traités par 1ml d'éthanol à 70% pendant 20 min à la température du laboratoire pour éliminer la PKH-26 qui se trouve dans la membrane des hématies attachées et lysées dans l'étape antérieure. De cette manière, on réalise aussi une fixation des macrophages. Ceux-ci sont repris, après lavage avec du tampon PBS, dans 1ml de PBS et l'analyse par cytofluorimétrie se fait sur au moins 5.000 macrophages, dans le système FL1/FL2 (autofluorescence des macrophages versus fluorescence rouge des hématies marquées à la PKH-26). On obtient de cette manière des histogrammes dans

lesquels on distingue clairement deux territoires, correspondant l'un (R1) à l'autofluorescence des macrophages non phagocytiques et l'autre (R2) à la fluorescence des macrophages ayant phagocyté des hématies marquées à la PKH 26.

Parallèlement, on analyse, comme témoins, des macrophages qui n'ont pas phagocyté mais qui ont néanmoins été traités de la même manière que les macrophages qui ont phagocytés. On obtient ainsi la valeur de l'autofluorescence des macrophages qui, déduite des valeurs expérimentales, fournit de cette façon la valeur de la fluorescence liée à la PKH et le mean de fluorescence réel lié à la phagocytose.

Un second témoin de « bonne conduite » de la phagocytose est obtenu par incubation des macrophages avec des hématies désialylées enzymatiquement par incubation (37°C, 1h dans un bain-marie sous agitation constante) en présence de neuraminidase de *Vibrio cholerae* (0,015 U). Dans ce cas, la désialylation doit se faire après le marquage à la PKH-26 car une désialylation préalable empêcherait la fixation du fluorochrome.

2.1.7. Détermination du pH intracellulaire

Principe : Nous avons appliqué avec succès une technique qui avait été mise au point par ses auteurs (Franck *et al.*, 1996 ; Ozkan *et al.*, 2002) pour l'étude de cellules nucléées et dont le principe est le suivant : BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5,6 carboxyfluorescéine acétoxyméthyl ester) est clivé par les estérases des cellules vivantes et l'intensité de la fluorescence est pH dépendante. Pour compenser la variabilité d'incorporation du fluorochrome et d'activation des estérases, on calcule le rapport R des fluorescences à 520nm (verte) et à 620nm (rouge). Pour la mesure du pH intracellulaire, on établit une courbe étalon, en incubant les cellules dans des tampons phosphate de pH variés et en présence de nigéricine qui permet d'égaliser les pH des milieux intérieur et extérieur. Dans la figure 39 de la page 91 sont précisées les formules de BCECF-AM et de la nigéricine.

Mode opératoire : Les réactifs utilisés sont les suivants :

- Solution de nigéricine 1mM dans l'éthanol absolu (5mg/6,89 ml) qui peut être conservée plusieurs semaines à 4 °C
- Solution stock 1mM de 2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5,6 carboxyfluorescéine, acétoxyméthyl ester (BCECF-AM) dans le DMSO

- Tampons phosphate de pH variants de pH 6,0 à pH 7,6 et obtenus en mélangeant le tampons A et B.

Tampon A : KH_2PO_4 135 mM + NaCl 20 mM

Tampon B : K_2HPO_4 110 mM + NaCl 20 mM

Tracé des courbes- étalons :

1 - 10^7 d'hématies en suspension dans 1ml de tampon PBS de pH 7,4 sont incubées avec $5\mu\text{l}$ de solution de BCECF-AM (Concentration finale : $5\mu\text{M}$) pendant 60 min à 37°C et à l'obscurité.

2 - A $100\mu\text{l}$ de cette suspension sont ajoutés $900\mu\text{l}$ de tampon phosphate à différents pH dans lequel on a préalablement introduit $10\mu\text{l}$ de la solution de nigéricine.

3 - La suspension est incubée à 37°C pendant 30 min et la mesure du pH cytoplasmique est effectuée par cytofluorimétrie en flux dans le mode FL1 pour la fluorescence rouge et dans le mode FL2 pour la fluorescence verte.

Le comptage porte sur 10.000 hématies traitées. Le programme CellQuest de l'ordinateur calcule ensuite les « means » de fluorescence qui, en se reportant à la courbe étalon, permet d'obtenir les valeurs du pH intracellulaire.

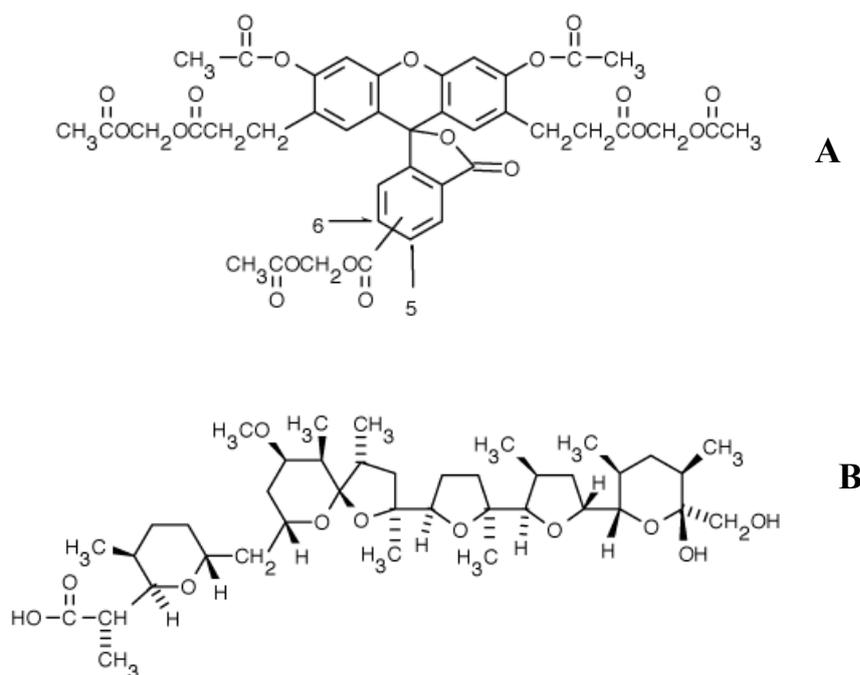


Figure 39 – Formules chimiques du 2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5-(and-6)-carboxyfluoresceine acetoxy méthyl ester (BCECF-AM) (A) et de la nigéricine (B).

2.1.8. Recherche de signaux d'antiphagocytose. "Test CD 47"

Récemment, la démonstration a été apportée que l' "Integrin-Associated Protein" ou IAP (CD47) présente dans les membranes des cellules nucléées empêchait la phagocytose de ces dernières en agissant comme transducteur de signal dans le contrôle du flux des cations qui traversent les membranes des cellules et dans les interactions chimiotactiques et adhésives des leucocytes avec les cellules endothéliales (Concept du « Eat me, don't eat me) (voir revue de Grimsley *et al.*, 2003).

Nous avons mis au point un dosage de ce marqueur par cytofluorimétrie en utilisant un anticorps monoclonal anti-CD47 marqué à la phycoérythrine. Ce test est rapide et d'application simple. Il est un excellent marqueur prédictif de l'érythrophagocytose qui s'ajoute au "test Annexine-V" d'externalisation de la phosphatidylsérine. Il nous apparaît comme un critère incontournable lié à la clairance des hématies transfusées.

Protocole expérimental : A 50µl de suspension d'érythrocytes (10^7 cellules/ml) dans un tampon PBS de pH 7.4 sont ajoutés 50µl de tampon d'incubation (tampon PBS de pH 7,4 contenant 0,1% de nitrate de sodium et 1% de sérum albumine humaine) et 10µl de sérum anti-CD-47. Après 45 minutes d'incubation, à 37°C et à l'obscurité, les cellules sont lavées 2 fois avec 1 ml de tampon PBS contenant 0,1% de nitrate de sodium, puis sont reprises dans 300µl du même tampon. Les mesures sont effectuées par analyse cytofluorimétrique en flux dans le mode FL2 porté en abscisses, les ordonnées correspondant au nombre relatif de cellules comptées.

2.2. Méthodes biochimiques

2.2.1. Dosage de l'ATP

Principe : Nous avons utilisé les troupes SIGMA de dosage de l'ATP qui nous ont été fournies par le Centre de Transfusion Sanguine de Lille. Dans le protocole, l'enzyme, la phosphokinase de l'acide phosphoglycérique (PGK), est utilisé pour catalyser la réaction suivante :



Dans un second temps, le 1,3-diphosphoglycérate est transformé en glycéraldéhyde-3-phosphate en présence de glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPD), un enzyme à NADH :



L'oxydation du NADH en NAD⁺ provoque une diminution de l'absorbance à 340 nm qui, mesurée, permet de déterminer la quantité d'ATP présente dans le milieu. Celle-ci est exprimée en µg d'ATP/dL sang.

Mode opératoire : Les dosages d'ATP ont été effectués sur des lysats réalisés sur des volumes définis d'hématies et effectués suivant la méthode de Gahmberg et Hakomori (1973) décrite à la page 70.

2.2.2. Dosage de l'hémoglobine

Principe : L'hémoglobine a été dosée dans les milieux d'incubation par spectrophotométrie à 410 nm (bande de Soret) (Fig. 40 ci-dessous).

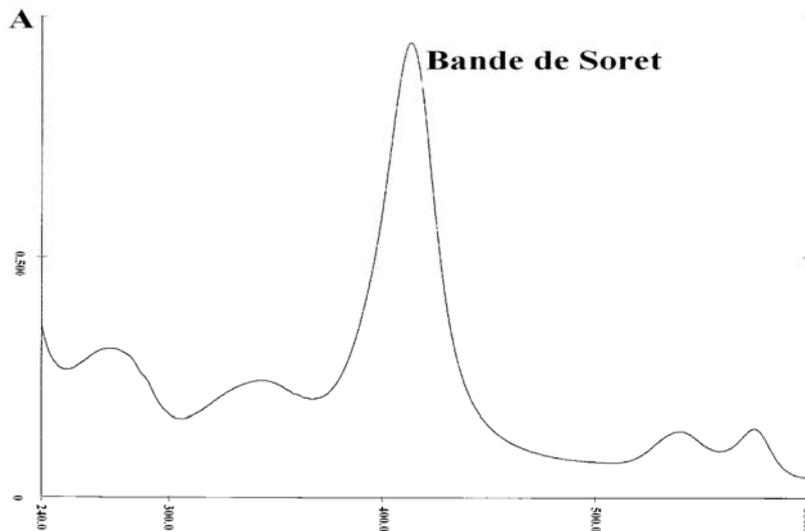


Figure 40 – Spectre d'absorbance de l'hémoglobine à différentes longueurs d'onde. En abscisses : longueurs d'onde en nanomètres ; en ordonnées : absorbances (A).

Ce procédé simple, rapide et très sensible remplace la méthode lourde, longue et peu sensible de Drabkin. Les valeurs obtenues sont rapportées à une courbe étalon obtenue en utilisant des solutions aqueuses d'hémoglobine humaine pure de concentration croissante de 0 à 0,175 mg/ml.

II - TRAVAUX DE RECHERCHES FONDAMENTALE

L'ACTIVITE DE LA β -D-GALACTOSIDASE EST-ELLE UN MARQUEUR UNIVERSEL DE SENESCENCE ?

Introduction

En 1995, un nouveau marqueur de sénescence a été découvert par Dimri *et al.* suggérant que les cellules sénescents expriment un type spécifique la β -galactosidase avec un pH optimal de 6,0, nommé « Senescence Associated β -Galactosidase » (SA- β -Gal) (Dimri *et al.*, 1995) et mis en évidence et confirmé par plusieurs auteurs dans les cellules mésothéliales (Thomas *et al.*, 1997) ; Xu *et al.*, 1997 ; Brenner *et al.*, 1998), dans les cellules embryonnaires du hamster syrien qui expriment la télomèrase après 20 à 30 cycles de multiplication de la population (Carman *et al.*, 1998), dans les cellules épithéliales de surface de l'ovaire humain (HOSE 6-3) immortalisées par le virus oncogène du papillome humaine E6 et E7 – HPV E6 et E7 (Litaker *et al.*, 1998), dans les fibroblastes en culture à partir d'ulcère veineux (Mendez *et al.*, 1998), dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (van der Loo *et al.*, 1998) et dans les fibroblastes immortels humains non-tumoraux (Vogt *et al.*, 1998 ; Yegorov *et al.*, 1998).

Les β -galactosidases sont impliquées dans l'élimination des résidus de galactose des glycoprotéines, des sphingolipides et du sulfate keratan. Elles sont donc naturellement exprimées dans une grande variété de tissus. L'enzyme est présent dans le compartiment lysosomal et possède un pH optimal de 4.0–4.5. La découverte de SA- β -Gal, mesurée à pH 6.0, a suggéré que l'enzyme est distinct des isoenzymes connues de β -galactosidase (Dimri *et al.*, 1995).

En utilisant une méthode histochimique fondée sur l'emploi du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) qui donne une coloration bleue aux cellules positives, il a été montré que les fibroblastes sénescents ont exprimé cet enzyme, tandis que les fibroblastes jeunes n'ont pas d'activité enzymatique détectable. Des cellules SA- β -Gal positives ont été également observées dans des sections de peau des personnes âgées. Les conclusions tirées sont que la SA- β -Gal représente un marqueur simple et spécifique des cellules sénescents (Dimri *et al.*, 1995). Une variété d'études ont donc employé cette méthode dans les systèmes *in vitro* où il y a une corrélation générale entre l'activité enzymatique et le début de la sénescence (Going *et al.*, 2002). Les méthodes biochimiques, comme par exemple HPLC utilisée par Krisna *et al.*, (1999), peuvent détecter la β -galactosidase avec une sensibilité

beaucoup plus grande que les méthodes histochimiques, mais elles ont le désavantage de ne plus pouvoir localiser avec précision le compartiment cellulaire concerné.

Quelques études ont suggéré que les cellules SA- β -Gal s'accumulent avec l'âge dans le foie (Paradis *et al.*, 2001) et dans les cellules tubulaires rénales (Ding *et al.*, 2001) et que les cellules endothéliales sénescents sont présentes dans les plaques athérosclérotiques (Vasile *et al.*, 2001). Dans leurs études, Going *et al.* (2002) ont constaté que le niveau de la SA- β -Gal changeait dans les différents compartiments anatomiques de la région gastro-intestinale supérieure (GI), avec des niveaux plus élevés dans le duodénum et plus bas dans l'oesophage. Ils ont également constaté que les secteurs prolifératifs ont montré moins d'activité que les cellules non-prolifératives dans le duodénum et la mucoité gastrique. Dans des cellules néoplasiques comme l'adénocarcinome invasif, ils ont signalé une diminution de l'activité, mais pas de modifications d'activité dans dysplasie et métaplasie intestinale. Il n'y avait aucun rapport entre l'âge du patient et l'activité de l'enzyme qui indiquerait que les cellules sénescents ne s'accumulent pas pendant le vieillissement normal dans ces tissus et ils ont également trouvé une activité SA- β -Gal forte dans les populations de cellules prolifératives d'épithélium dysplasique, montrant ainsi clairement qu'il n'y avait aucune corrélation absolue entre SA- β -Gal et sénescence, au moins dans cette situation. Ils ont donc conclu que SA- β -Gal ne pouvait pas être considéré comme un marqueur spécifique de la sénescence *in vivo*, mais que son expression pourrait être reliée plutôt au type de cellule et à son état de quiescence et/ou de différenciation (Going *et al.*, 2002).

Les mélanocytes, les cellules sébacées et les cellules des glandes endocrines expriment une activité β -galactosidasique à pH 6, indépendante de la sénescence ou de l'âge. Devarakonda *et al.* (1995) en développant une technique d'HPLC très sensible grâce à laquelle ils peuvent mesurer l'activité β -galactosidasique même dans les cellules X-Gal-négatives, ont détecté une activité SA- β -Gal dans les cellules cancéreuses. Dans tous les matériels biologiques étudiés (lignés cellulaires cancéreuses du poumon A549, carcinome du colon Caco2-TC7, leucémie promyélocytaire HL 60, hépatome HepG2, homogénat du foie humain) l'activité β -galactosidasique à pH 4,5 a été plus importante que l'activité mesurée à pH 6. Ce test n'est pas universel car il reste négatif dans certaines cellules comme les carcinomes, les fibrosarcomes (Dimri *et al.*, 1995) ou les cellules cutanées (Severino *et al.*, 2000) et Yegorov *et al.*, (1988) ont conclu que l'activité élevée de l'enzyme à pH 6 dans les cellules prolifératives à long terme peut être considéré comme une manifestation d'un catabolisme augmenté et peut-être d'une mort cellulaire prochaine. Ils ne sont donc pas

d'accord avec l'idée que la β -galactosidase mesurée à pH6 soit un marqueur exclusif de la sénescence.

Différentes recherches ont démontré qu'il existait trois formes de l'enzyme : la forme lysosomale, le marqueur SA- β -Gal et une forme qui est active à pH neutre (Kuo *et al.*, 1978). Les deux premières formes présentent une forte affinité vis-à-vis du substrat indigogénique en conduisant à des composés de couleur turquoise. La seule méthode qui permette de différencier les deux formes est le pH optimal (Devarakonda *et al.*, 1999). En effet, Kuo et Wells (1978) et Heyworth *et al.*, (1981) ont rapporté le fait que les changements pH-dépendants de l'activité β -galactosidasique sont dus à l'interconversion du même enzyme d'une forme à l'autre (polymérique, dimérique ou monomérique). Cette observation pourrait expliquer pourquoi V_{max} et K_m mesurées par Devarakonda *et al.*, (1999) sont différentes à pH 4 et à pH 6. En outre, avec le temps, la β -galactosidase peut s'accumuler pendant la sénescence mais, dans les étapes initiales, elle est indétectable à pH 6 probablement à cause de la conversion de l'enzyme dans une forme moins active. Dans les étapes tardives, avec la maturation des cellules, l'activité β -galactosidasique mesurée à n'importe quel pH va augmenter. Dans ce cas, pourquoi choisir l'activité mesurée à pH 6 plutôt qu'à un autre pH proche de celle optimal comme « marqueur de sénescence » ?

Kurz et ses collaborateurs, (2000) ont conclu que l'activité SA- β -Gal était en fait due à la β -galactosidase lysosomale et que la spécificité apparente de cellules sénescents d'exprimer SA- β -Gal résultait de l'activité résiduelle de l'enzyme une fois mesurées à un pH suboptimal dans les cellules qui ont accumulé plus d'enzyme à la suite de l'augmentation de la masse lysosomale (Kurz *et al.*, 2000). En effet, il est connu depuis plusieurs années que les cellules sénescents contiennent des compartiments lysosomaux plus importants et que la lipofuscin (le "colorant de vieillissement") est un produit lysosomal qui s'accumule avec l'âge *in vitro* et *in vivo* (Katz *et al.*, 1984 ; Sohal *et al.*, 1989). Going *et al.*(2002) ont trouvé des activités plus élevées à pH 4,0 qu'à pH 6,0, concluant qu'ils avaient mesuré plutôt la β -galactosidase acide lysosomale que l'activité « sénescence-associée ». En outre, une variété d'études réalisées *in vitro* ont uniformément prouvé que SA- β -Gal est induit pendant la quiescence et/ou la différenciation cellulaires réversibles (Yegorov *et al.*, 1998 ; Krishna *et al.*, 1999 ; Severino *et al.*, 2000 ; Mouton *et al.*, 2000) et que cette activité est plus élevée à pH 4,0 qu'à pH 6,0 (Yegorov *et al.*, 1998). En effet, l'article original de Dimri a montré l'induction provisoire du SA- β -Gal pendant la quiescence des fibroblastes dont l'activité était perdue lors de l'entrée dans le cycle cellulaire (Dimri *et al.*, 1995). Ainsi, SA- β -Gal semble refléter l'expression de la β -galactosidase lysosomale plutôt que celle d'un enzyme spécifique

induit seulement pendant la sénescence. Selon Coates *et al.* (2002), même dans les systèmes de culture de tissus la SA- β -Gal peut à peine être considérée comme un marqueur spécifique de sénescence. Les études de Going *et al.*, 2002 et de Lorimore *et al.*, 2001 indiquent que la β -galactosidase acide est exprimée dans une variété de tissus normaux et peut être induite dans certaines situations, indiquant que ce marqueur doit être employé avec précaution *in vivo*.

En conclusion, bien que l'identification spécifique de la sénescence cellulaire soit un but à atteindre pour les pathologistes, il n'y a jusqu'ici aucun marqueur simple qui soit spécifique des cellules sénescents. Le concept de SA- β -Gal comme marqueur de sénescence semble être compromis en raison de l'expression endogène de l'enzyme lysosomal aux différents niveaux par divers types cellulaires et à son induction pendant la quiescence et la différenciation cellulaire (Coates, 2002).

Matériel et méthodes

1. Préparation du matériel biologique

1.1. Induction de la sénescence accélérée des hématies

La sénescence accélérée des hématies a été induite soit par incubation à 37°C en présence ou en absence (témoin) de Ca²⁺, en présence ou en absence d'un calcium ionophore.

1.1.1. Incubation en milieu HEPES dépourvu de Ca²⁺. Le milieu d'incubation était le suivant : à 1 ml de tampon HEPES (100mM HEPES, 140mM NaCl ajusté à pH 7,4 avec NaOH) on ajoute 4 μ l de solution aqueuse à 30% d'albumine bovine, 10 μ l pénicilline (10.000 UI)/streptomycine 10 μ g par ml, 1,6 μ l de gentamicine à la concentration de 50mg/ml. Le mélange a été filtré sur un filtre Acrodisc Syringe Filter de 0,2 μ m. Les érythrocytes ont été ajoutés avec un hématoците de 20% afin d'obtenir une quantité suffisante de membranes pour le dosage biochimique de la β -galactosidase. Le mélange a été incubé à 37°C pendant des temps variant de 2h à 48h, dans des plaques à 12 puits NUNCLON™ (Nunc A/S, Roskilde, DK).

1.1.2. Incubation en milieu HEPES calcique.

Le milieu calcique utilisé est le tampon fourni par PharMingen dont la composition est la suivante : HEPES/NaOH 0,1M de pH 7,4 ; NaCl 1,4 M et CaCl₂ 25mM. Pour l'utilisation, la solution stock est diluée au dixième avec de l'eau distillée (la solution obtenue sera appelée

« tampon HEPES »). Pour l'incubation, à 1 ml du tampon précédent, ont été ajoutées les mêmes quantités de sérum albumine, de gentamicine, de pénicilline/ streptomycine et d'érythrocytes que précédemment. Le mélange a ensuite été incubé à 37°C pendant de temps variant de 2 h à 48 h.

1.1.3. En présence de l'ionophore calcique A 23187. Trois solutions ont été utilisées :

- Solution de l'ionophore A 23178 à la concentration de 7.66 mM en DMSO (1µl de solution contient 4µg d'ionophore). Cette solution représente la solution stock.

- Dilution (1 : 20) de la solution précédente dans l'eau distillée. Cette solution constitue la "solution de travail". Elle est renouvelée pour chaque expérience.

- L'incubation est réalisée suivant le protocole décrit, sur 1 ml de suspension d'hématies en tampon HEPES calcique additionnée de 1µl de la "solution de travail". La concentration finale de l'ionophore est 0,5µM. La réaction a été stoppée avec 2,5 mM EDTA dans le tampon PBS de pH 7,4. En vue d'obtenir une quantité suffisante des membranes pour le dosage biochimique, l'hématocrite a été de 20%.

1.1.4. Incubation en présence de céramides.

Les hématies ont été incubées en présence d'hexanoïlcéramide (C₆ céramide). Le mode opératoire que nous avons appliqué est le suivant. Les céramides sont dissoutes à raison de 5 mg dans 200 µl d'éthanol et 800 µl de tampon PBS de pH 7,4 ou dans le milieu de culture cellulaire DMEM, constituant ainsi la solution stock. Le milieu d'incubation des hématies est le tampon PBS à pH 7,4 auquel on ajoute 4µl de solution aqueuse à 30% de sérum d'albumine bovine par ml, 10µl d'un mélange de pénicilline (10.000 UI) et de streptomycine (10.000 µg par ml) et 1,6µl de gentamicine à la concentration de 50mg/ml. Le mélange est filtré sur Acrodisc Syringe Filter de 0,2µm (Pall Gelman Laboratory, Michigan, USA).

Les hématies ont été incubées (4x10⁹ cellules /ml) dans le milieu décrit ci-dessus en présence ou en absence de 25 µM (soit 4µl de solution stock) de C₆-céramides. Les incubations ont été effectuées à 37°C sous atmosphère de CO₂ (5%) pendant des temps variant de 30 min à 2h dans des plaques à 12 puits NUNCLON™ (Nunc A/S, Roskilde, DK).

1.1.5. Incubation en présence de peroxyde d'hydrogène

Le milieu d'incubation est le même que celui qui est décrit au paragraphe 1.1.1., sauf que le tampon HEPES a été remplacé par le tampon phosphate PBS de pH 7,4. La quantité

des érythrocytes ajoutés à 1ml de solution a été de 200 μ l de sédiment (4×10^9 hématies). Le mélange a été incubé à 37°C pendant des temps variant de 30 minutes à 24 heures en présence et en absence de 2mM H₂O₂, dans des plaques à 12 puits NUNCLON™ (Nunc A/S, Roskilde, DK).

1.1.6. Vieillessement induit par incubation des hématies dans le plasma

Les hématies ont été incubées dans leur plasma pendant des temps variant de 24 à 72 heures, sans déleucocytation, à 37°C et sous atmosphère à 5% de CO₂.

1.2. Désialylation "in vitro" des hématies

Protocole :

100 μ l de suspension d'érythrocytes en tampon PBS de pH 7,4, avec un hématocrite de 10% ont été incubés en présence de 0,015 UI de neuraminidase (E.C.3.2.1.18) de *Vibrio cholerae*. Après 1 heure d'incubation dans un bain-marie à 37°C et sous agitation constante, les érythrocytes ont été lavés deux fois avec le tampon PBS, puis centrifugés (1500 rpm, 4°C, 5 min).

2. Méthodologies biochimiques

2.1. Dosage des protéines membranaires

Les protéines membranaires ont été dosées par la méthode de Lowry modifiée en utilisant la sérum albumine bovine comme standard. Brièvement, 55-70 μ g de protéines membranaires (10 μ l) ont été incubés pendant 1,15 h avec 200 μ l NaOH (1N). On ajoute ensuite 2 ml de réactif A, on agit et on laisse 10 minutes à température ambiante. On ajoute ensuite le réactif B. Après 30 minutes d'incubation à la température ambiante, on détermine l'absorbance à 750 nm.

Réactif A : On mélange 50 ml de Na₂CO₃ (2%) + 1 ml de réactive A1

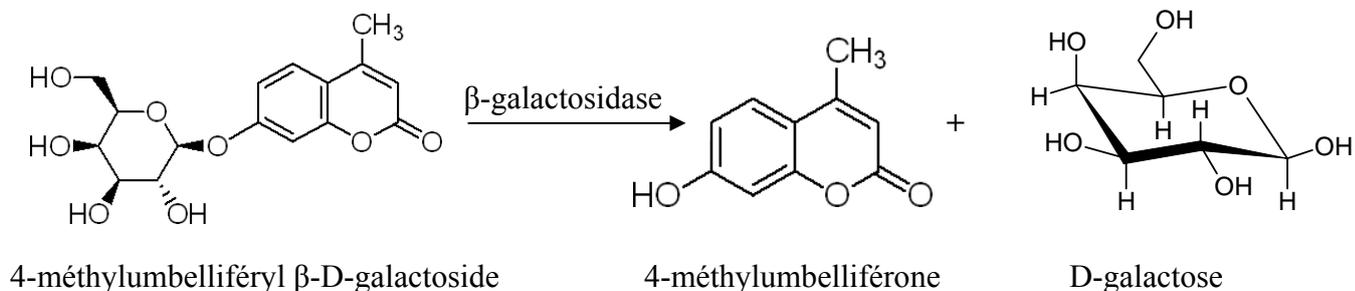
Réactif A1 : 1 vol de CuSO₄, 5H₂O (1%) + 1 vol de tartrate double de Na et K (2%)

Réactif B : Réactif de Folin-Ciocalteu (Merck, Germany) dilué au demi avec d'eau distillé

2.2. Mesure de l'activité β -galactosidasique

2.2.1. Méthode fluorimétrique de dosage de l'activité β -galactosidasique

Principe : Le substrat méthylumbelliféryl-galactoside libre, en présence d'une β -galactosidase, de la méthylumbellifénone qui peut être dosée par spectrofluorimétrie (excitation : 390 nm ; émission : 450 nm).



Réactifs:

- 1- Réactif "MUF" : Solution aqueuse de méthylumbelliférylglycoside 1mM dissoute dans la diméthylformamide (40 mg MUF/4ml DMF). Avant d'être utilisé, le substrat a été filtré sur un Acrodisc Syringe Filter 0.22 μ m.
- 2- Solution de citrate 0,1M/phosphate disodique 0,2M
- 3- Tampon STOP : glycine / NaOH 0,2M et 0,125M NaCl à pH 10,75

Protocole:

- Un mélange de 25 μ l de tampon citrate/phosphate, 150 μ l de membranes (0,6 à 1,0 mg protéines) et 175 μ l de réactif MUF sont incubés à l'abri de la lumière, à la température physiologique de 37°C, sous agitation, pendant 3 heures, à la manière de Goi *et al.* (2000).
- La réaction est arrêtée par l'addition du 750 μ l tampon glycine/NaOH (pH final : 10).
- Après ultracentrifugation (18.000rpm, 4°C, 20 minutes) pour éliminer les membranes, la lecture de la fluorescence du surnageant est effectuée dans des plaques noires NUNCLON™ avec un fluorimètre Microplate Fluorescence Reader FLx800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) équipé d'un logiciel KC Junior.

Les conditions de la lecture sont les suivantes : excitation: 485 nm; émission: 528 nm; sensibilité: 55 à 80. L'activité enzymatique a été calculée en utilisant une courbe étalon de 4-méthylumbellifénone (4-MU). Une unité enzymatique est équivalente à 1nM de substrat converti en produit, pendant 1h à 37°C. La courbe étalon a été construite en utilisant des

concentrations croissantes de 20 à 100 $\mu\text{mol/l}$ en tampon glycine/NaOH (pH 10,75). La teneur en protéines a été déterminée et l'activité enzymatique est exprimée en mU/g protéines. La précision analytique de la méthode a été déterminée et exprimé comme coefficient de variation.

2.2.2. Méthode cytochimique

Le "kit" détecte cytochimiquement et de manière spécifique l'activité β -galactosidasique.

Principe :

Le substrat chromogénique utilisé est le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) qui, en présence d'une β -galactosidase, donne une coloration bleue liée à la formation de 5-bromo-4-chloro-3-indol (Dimri *et al.*, 1995) (Fig. 41).

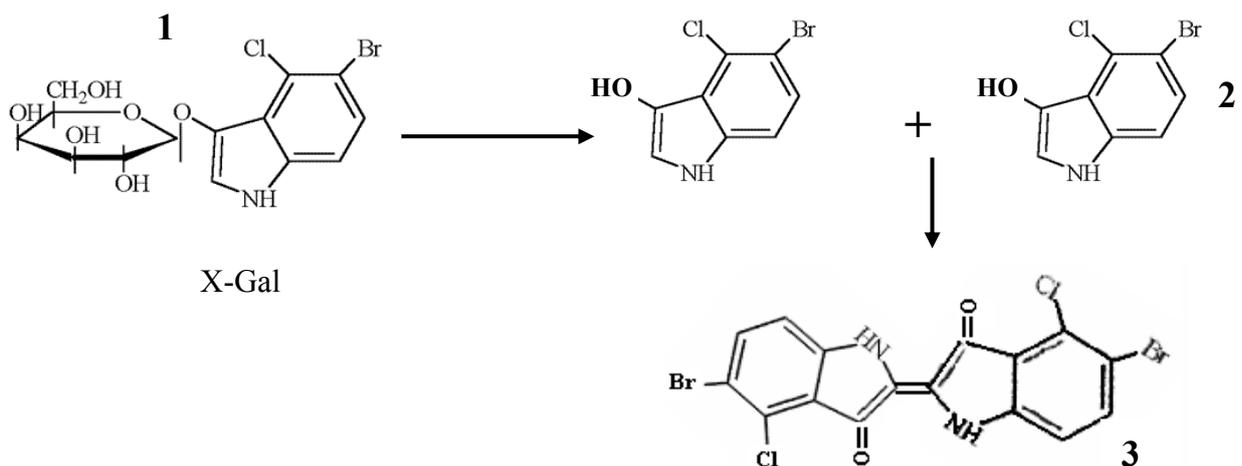


Figure 41 : Le clivage de la liaison glycosidique du substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) (1) conduit à la formation d'indole incolore 5-bromo-4-chloro-indolyl (2) dont l'oxydation non enzymatique et la dimérisation se produisent en présence d'ions ferriques et ferreux avec pour résultat la production de 5,5'-di-bromo-4,4'-dichloro-indigo, un composé stable, insoluble et bleu foncé (3) (Holt et Sadler, 1958). Ce transfert d'un électron est facilité par les accepteurs d'électrons et le potentiel redox (Cotson et Holt, 1958) comme les ions ferriques et ferreux (Lojda, 1970).

Réactifs :

Les réactifs suivants sont contenus dans une trousse (kit) fournie par la Société OZYME :

- Solution de fixation contenant 20% de formaldéhyde et 2% de glutaraldéhyde en tampon PBS
- Solution de coloration de pH 6 contenant 400mM d'acide citrique/phosphate de sodium, 1,5M de NaCl, 20mM de MgCl_2

- Pour préparer la solution de X-Gal on dissout 20mg de X-Gal dans 1 ml de diméthylformamide 49,16 mM. Seuls des tubes en polypropylène ou en verre doivent être utilisés à l'exclusion des tubes en polystyrène. L'excès de solution de X-Gal peut être gardé à -20°C , à l'abri de la lumière, pendant 1 mois
- Solution A de ferrocyanure de potassium 500 mM
- Solution B de ferricyanure de potassium 500 mM

Protocole:

Les cellules ont été lavées avec le tampon PBS de pH 7,4. Puis, 5×10^6 cellules ont été fixées pendant 3 à 5 minutes à la température du laboratoire avec un mélange de 2% formaldéhyde/0,2% glutaraldéhyde dans PBS (la solution de fixation diluée au dixième avec de l'eau distillée).

Après 2 lavages successifs, les hématies ont été incubées à 37°C pendant la nuit avec 1ml de la solution de coloration fraîche (1mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside / 40 mM d'une solution-tampon acide citrique/ et phosphate de sodium à pH 6 ou 4,4 / 5mM de ferricyanure de potassium / 5mM de ferrocyanure de potassium / de 150 mM de NaCl / 2mM de MgCl_2) comme décrit par Dimri *et al.*, (1995). Pour détecter l'influence du mélange ferricyanure/ferrocyanure de potassium et l'artefact éventuel de la coloration avec X-Gal sur les hématies, nous l'avons remplacé par les mêmes quantités de tampon citrate/phosphate.

La réaction est développée dans des plaques NUNCLON™ (Nunc A/S, Roskilde, DK) à 6 puits (35 mm). Après une incubation à 37°C pendant 15 heures, les cellules sont observées au microscope Leica DM IRB/E, grossissement 200 x. Les photographies ont été prises avec un appareil PENTAX Z70 (Asahi, Optical Co) et Fuji 200ASA film. Pour le stockage à long terme, la solution de coloration est éliminée et les cellules, resuspendues dans une solution aqueuse de glycérol à 70 p. cent, sont conservées à 4°C .

3. Résultats

3.1. Mise au point de la méthode fluorimétrique de mesure

L'activité de la β -galactosidase érythrocytaire a été déterminée par la mesure de la quantité de 4-méthylumbelliférone libérée par le clivage du 4-méthylumbelliféryl β -D-galactoside.

Pour chaque analyse réalisée en triple exemplaire, nous avons établi une courbe étalon de référence en utilisant des solutions de 4-méthylumbelliférone pure à des concentrations variant de 0 à 200 μM . La lecture de la fluorescence des solutions est effectuée à différentes sensibilités du fluorimètre (de 50 à 80).

Au-delà d'une concentration de 60 μM la courbe étalon de dosage arrive à un plateau et nous avons choisi de travailler à une concentration inférieure de manière à nous maintenir dans la partie ascendante et linéaire de la courbe de fluorescence.

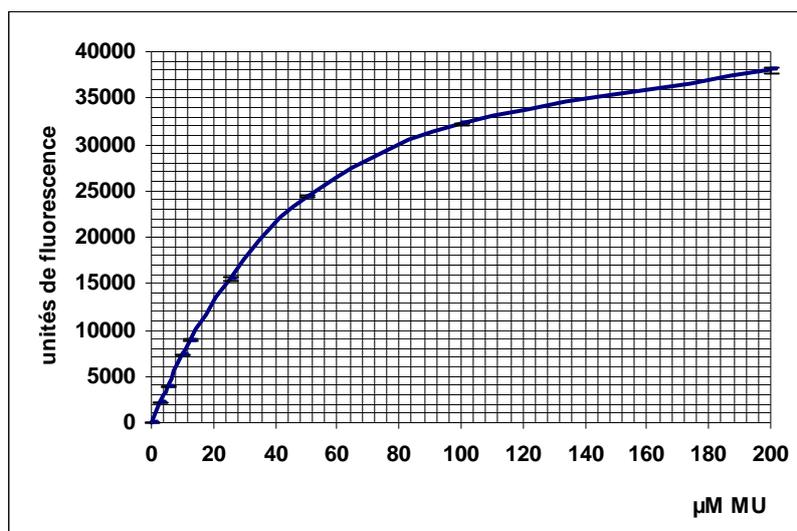


Figure 42 - Courbe étalon de dosage de la 4-méthylumbelliférone réalisée à une sensibilité 50. En abscisses : concentration des solutions de 4-méthylumbelliférone. En ordonnées : unités de fluorescence.

3.2. Détermination du pH optimal de l'enzyme

En utilisant le protocole expérimental décrit plus haut, nous avons étudié la quantité optimale de protéines à utiliser pour étudier l'activité enzymatique *in vitro* et *in vivo* ainsi que le pH optimal de l'enzyme. Les expérimentations sont faites en triplicate et, pour chaque échantillon, 3 lectures au fluorimètre ont été réalisées. Les écarts standard sont représentés dans les figures. Le pH optimal d'action de la β -galactosidase érythrocytaire humaine est de 4,3 comme le montre la figure 43 de la page 105. Ce résultat est en faveur de l'origine lysosomiale de l'enzyme.

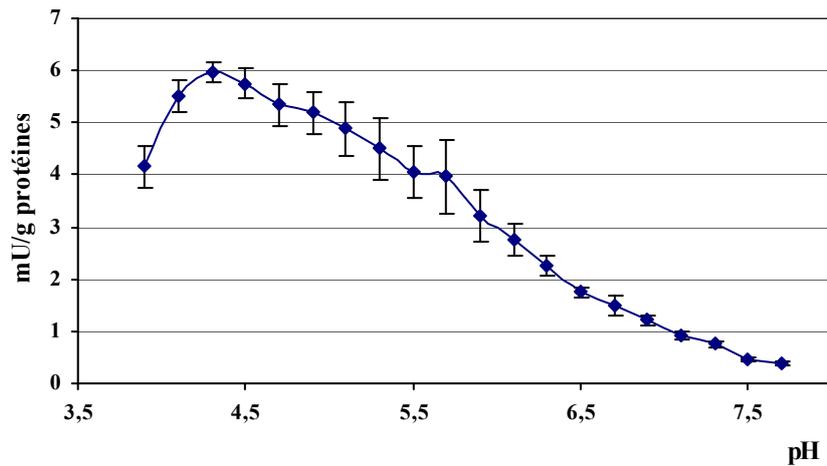


Figure 43 – Effet du pH sur l'activité de la β -galactosidase érythrocytaire.

3.3. Effet de la concentration en protéines membranaire des milieux d'incubation

L'effet de la concentration en enzyme sur l'activité β -galactosidasique a été étudié en utilisant des concentrations croissantes de membranes érythrocytaire et en rapportant les résultats à la quantité de MU libéré déterminé conformément au paragraphe 3.1. Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par la figure ci-dessous qui montre une linéarité du tracé de la courbe jusqu'à une concentration de 1mg de protéines dans le milieu réactionnel. Nous avons donc choisi une quantité de $0,8 \pm 10\%$ mg de protéines pour la suite de nos expérimentations.

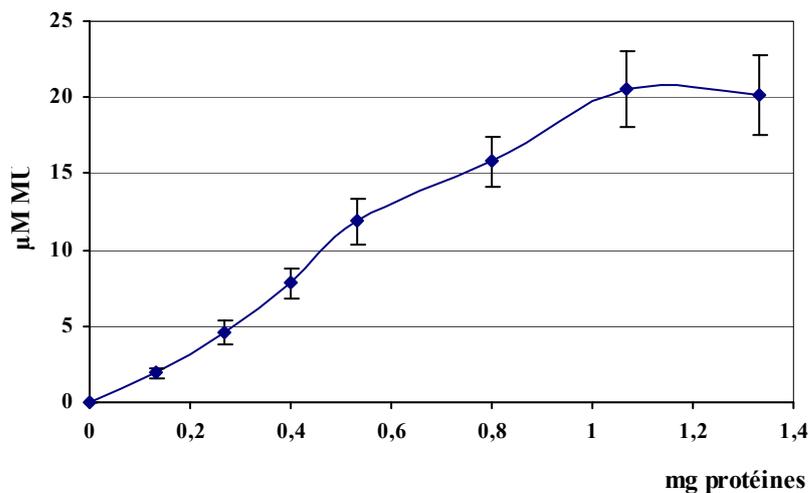


Figure 44 – Influence de la concentration en protéines sur l'activité β -galactosidasique érythrocytaire.

3.4. Sénescence érythrocytaire et activité β -galactosidasique

En vue de répondre à la question de savoir si la sénescence des hématies est marquée par une augmentation de l'activité β -galactosidasique de la cellule et de vérifier notre hypothèse selon laquelle une activation de la β -galactosidase membranaire de l'hématie était chargée d'éliminer progressivement le β -galactose des glycoconjuguées membranaires après une désialylation préalable au cours du vieillissement de la cellule, nous avons orienté nos recherches dans deux directions qui ont concerné, l'une, l'étude des variations de l'activité de l'enzyme au cours du vieillissement physiologique ou du vieillissement induit des hématies.

3.4.1. Variations au cours du vieillissement physiologique

Nous avons appliqué aux hématies isolées de sang hépariné par la méthode de Lutz *et al.* (1992) décrite au paragraphe 1.3. du chapitre Matériels et Méthodes, à la fois, la méthode cytochimique et la méthode "biochimique" de dosage de l'activité β -galactosidasique.

Comme la montre la figure 45, la méthode cytochimique n'a pas révélé de modifications de cette activité aussi bien à pH 4,3 qu'à pH 6.

Parallèlement, en vue de confirmer ces résultats, nous avons déterminé l'activité β -galactosidasique par "voie biochimique" en appliquant la méthode fluorimétrique du "MUF". Les résultats illustrés par la figure 45 montrent que le vieillissement physiologique des hématies s'accompagne d'une diminution drastique de l'activité de cet enzyme.

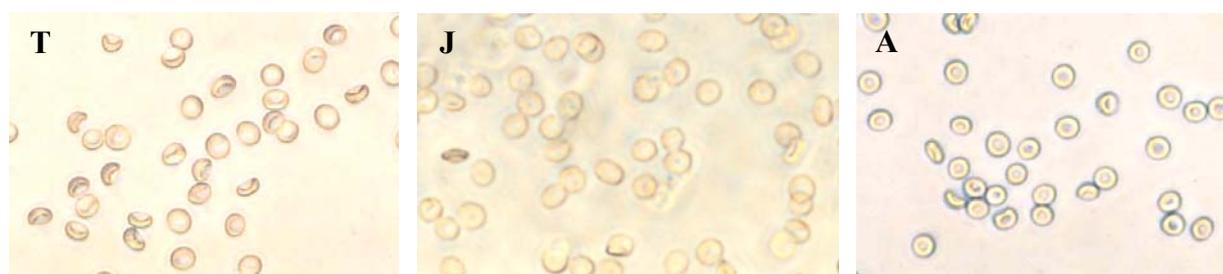


Figure 45 - Application de la méthode cytochimique à pH 4,3 sur les hématies isolées par centrifugation en gradient de densité de Percoll. T : hématies témoins, J et A : hématies jeunes et âgées, respectivement.

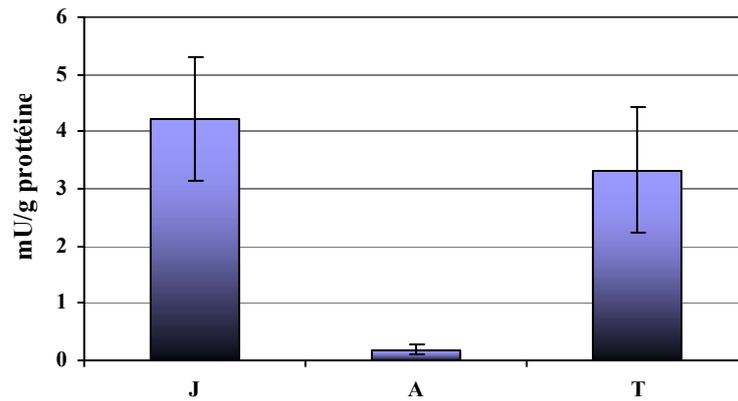


Figure 46 - Activité exprimé en mU/g protéines comparée de la β -galactosidase au cours du vieillissement physiologique. Les données représentent le moyen de quatre expériences indépendantes. J et A : hématies jeunes et âgées, T : hématies témoins recueillies sur héparine.

En vue de corrélérer ces résultats avec les variations de marqueurs d'apoptose, nous avons parallèlement étudié l'externalisation de la phosphatidylsérine et les variations de l'ATP et du pH intracellulaire.

Tableau VIII - Activité comparée (en p. cent) de la β -galactosidase, de la réactivité avec l'annexine-V, du taux d'ATP et le pH intracellulaire des populations d'hématies isolées par centrifugation en gradient de densité de Percoll par la méthode de Lutz *et al.* (1992) (Moyenne de 4 expériences).

	<i>Populations d'hématies</i>		
	<i>Jeunes</i>	<i>Agées</i>	<i>Totales</i>
Activité β-galactosidasique	126,7 \pm 15	5,7 \pm 2,9	100
Hématies Annexine V- positives (en %)	3,6 \pm 2	5,4 \pm 2	3,2 \pm 2
ATP (μmol/dl)	60,2 \pm 5,2	47,1 \pm 3,7	50,6 \pm 3,2
pH intracellulaire	8,15 \pm 3%	7,37 \pm 6%	7,45 \pm 6%

L'analyse de ces résultats montre que le pourcentage de diminutions de l'activité de l'enzyme au cours du vieillissement est plus important que pour l'ATP ou le pH intracellulaire. La diminution rapide de l'activité β -galactosidasique et la faible exposition de

la phosphatidylsérine suggèrent que ces deux événements *in vivo* ne sont pas connectés, mais peuvent être suffisants pour déclencher la mort cellulaire.

Ces résultats peuvent s'expliquer de deux manières. D'une part, l'observation faite par plusieurs auteurs que, d'une manière générale, les activités des glycohydrolases décroissent avec le vieillissement des hématies (Bartosz, 1991 ; Shinozuka, 1994) et, plus récemment, la démonstration que les enzymes plus fermement associées à la membrane, comme l' α -D-glucosidase (Goi *et al.*, 2000) et la sialidase acide ne montrent pas statistiquement de différences significatives entre les érythrocytes des sujets jeunes et âgés, alors que le niveau de la β -D-glucuronidase, qui est faiblement associé à la membrane, est nettement plus bas. Ceci peut être expliqué (Goi *et al.*, 2005) par une perte prématurée de la forme faiblement associée de l'enzyme. Les résultats que nous avons obtenus sont exprimés dans le Tableau VIII.

Un autre aspect intéressant concerne le pH intracellulaire (pHi) qui passent de 8,5 chez les hématies jeunes à 7,37 chez les hématies âgées.. Plusieurs études ont, en effet, rapporté l'existence d'un lien entre pHi et apoptose. Des variations de pHi et notamment une acidification intracellulaire sont souvent des événements précédant ou accompagnant l'apoptose. C'est ainsi que le pHi des cellules HL60 en apoptose diminue de 0,2 à 0,3 unité de pH (Barry et Eastman, 1992) et que celui d'une lignée cellulaire de lymphocytes T (CTLL-2) diminue de 7,50 à 7,00 (Rebollo *et al.*, 1995). Sur des cellules Jurkat (lymphoblastes) entrant en apoptose, l'utilisation d'une base faible (empêchant la diminution du pH intracellulaire) inhibe la mort cellulaire (Gottlieb *et al.*, 1996). Ces études ont aussi permis de montrer l'existence d'un lien entre le pHi et l'activité de dégradation de l'ADN par la DNAase II lors de l'apoptose (Barry et Eastman, 1992; Perez-Sala *et al.*, 1995). Néanmoins, même si tous les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés, il est clair que le pHi joue un rôle dans l'apoptose cellulaire. En effet, dans les cellules CHO et Jurkat, la surexpression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, entraîne une inhibition de l'acidification et de l'apoptose (Meisenholder *et al.*, 1996; Reynolds *et al.*, 1996). Sur une lignée de cellules sanguines, il a pu être montré qu'une alcalinisation intracellulaire était responsable de l'induction de l'apoptose par le changement de conformation et l'activation de Bax qui est une molécule pro-apoptotique (Belaud-Rotureau *et al.*, 2000).

En conclusion, au cours du vieillissement physiologique des hématies, l'activité β -galactosidasique diminue au même titre que le pH intracellulaire et que, en conséquence nous

pouvons émettre l'hypothèse que ces diminutions peuvent être considérées comme des marqueurs de sénescence.

3.4.2. Variation de l'activité de la β -galactosidase au cours du vieillissement induit par les ions Ca^{2+}

3.4.2.1. Effet du calcium et du calcium associé à un ionophore

Méthode cytochimique

Nous avons étudié les effets du vieillissement des hématies induit par les ions Ca^{2+} sur l'activité β -galactosidasique en associant les deux méthodes, cytochimique et biochimique.

En incubant les cellules selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.1.2. pendant des temps variant de 30 minutes à 24 heures et en appliquant ensuite la méthode cytochimique à pH 4,3 et 6 de caractérisation de l'enzyme, nous avons obtenus, comme le montre la figure 47 (p. 110), une très nette coloration bleu de la membrane érythrocytaire qui pouvait conduire à la conclusion que l'activité β -galactosidasique membranaire était augmenté chez les hématies artificiellement vieilles par les ions Ca^{2+} . Malheureusement, nous avons obtenu la même coloration bleue intense en l'absence du substrat X- Gal. Il s'agit donc, en réalité, d'un artefact dont nous n'avons pu établir le mécanisme et qu'il convient de signaler. Des résultats identiques ont été obtenus à pH 6.

Méthode biochimique

L'application de la méthode biochimique que nous avons mise au point (cf. p. 101) a entièrement confirmé la nature artéfactuelle des résultats apportés par la méthode histochimique. En effet, la mesure de l'activité de la β -galactosidase dans les membranes des populations d'hématies natives, d'une part, et incubées en présence d'ions Ca^{2+} 2,5 mM (dans les conditions décrites au paragraphe 1.1.2. et 1.1.3. du Chapitre Matériel et Méthodes (p. 98 et 99) en présence et en absence de 0,5 μ M ionophore A23187), d'autre part, a fourni des résultats comparables à ceux qu'a apportés le vieillissement physiologique.

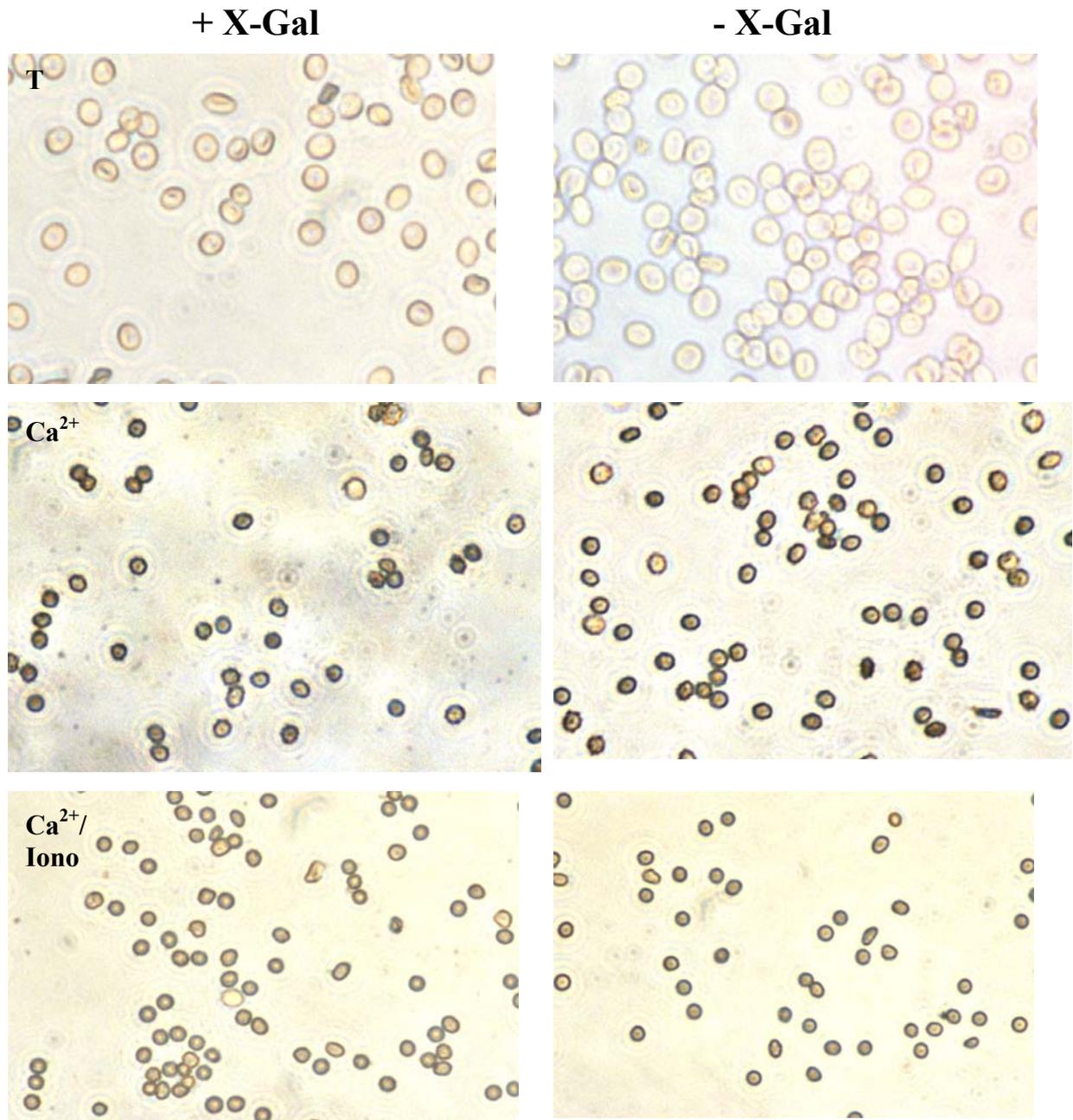


Figure 47 – Détection cytochimique de l'activité β -galactosidasique à pH 4,3 des membranes d'hématies traitées par les ions Ca^{2+} , en absence (Ca^{2+}) et en présence (Ca^{2+} Iono) d'ionophore A23187 (0,5 μM) après une incubation de 24 heures en tampon HEPES. La réaction cytochimique a été effectuée en présence (+ X-Gal) et en absence (-X-Gal) du substrat X-Gal.

En effet, comme dans le cas de ce dernier, on observe une diminution spectaculaire de l'activité enzymatique comme le montre la figure 48. Celle-ci est amplifiée par l'ionophore.

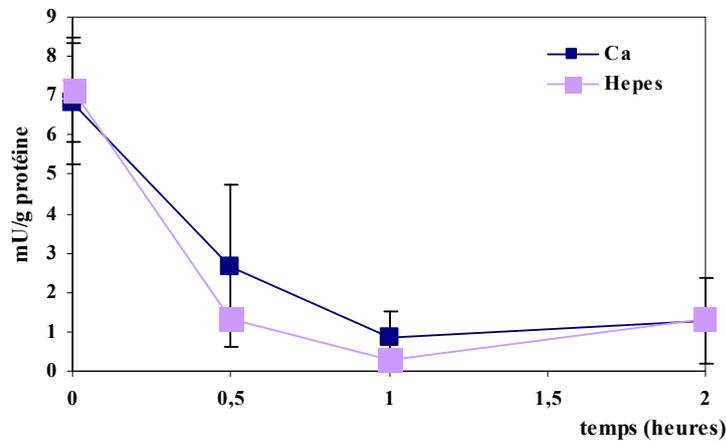


Figure 48 – Cinétique de l'activité β -galactosidasique des hématies incubées à 37°C pendant 30 minutes à 2 h dans les tampons HEPES et HEPES calcique. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences différentes.

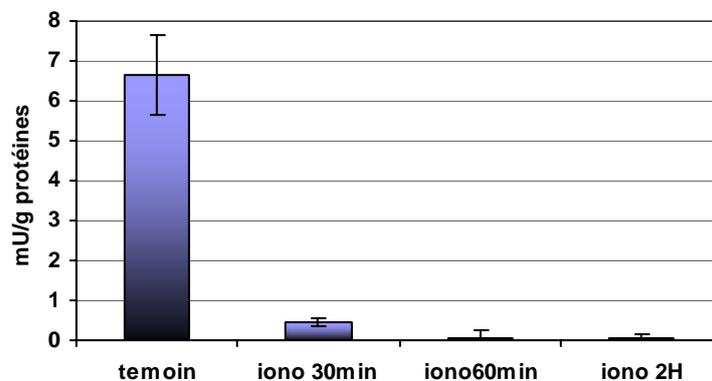


Figure 49 - Cinétique d'activité β -galactosidasique dans le tampon HEPES calcique 2,5mM en présence de 0,5 μ M d'ionophore A23187. Les données représentent la moyenne de quatre expériences indépendantes.

D'autre part, comme nous l'avons observé antérieurement (cf. p. 112) nous assistons à un abaissement à 6,5 de la valeur du pH au terme de 24 heures d'incubation, après une augmentation transitoire à une valeur de 8 au tout début de l'incubation. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que au début de l'exposition aux ions Ca^{2+} , la calpaïne augmente l'hydrolyse de l'ATP et l'activité de la pompe à Ca^{2+} (Wang *et al.*, 1988) ce qui permet l'élimination intracellulaire des ions calciques, donc l'augmentation temporaire du pH. A des

temps d'expositions plus longs, la pompe à Ca^{2+} est dégradée, accompagnée de la perte de son activité (Salamino *et al.*, 1994). Le Ca^{2+} intracellulaire augmente, donc le pHi baisse. La pompe à Ca^{2+} est capable, après expositions préalable des hématies *in vitro* aux ions calciques et ensuite en présence d'ATP, de normaliser le contenu intracellulaire de calcium et, en conséquence de maintenir la forme biconcave de la cellule (Szasz *et al.*, 1978).

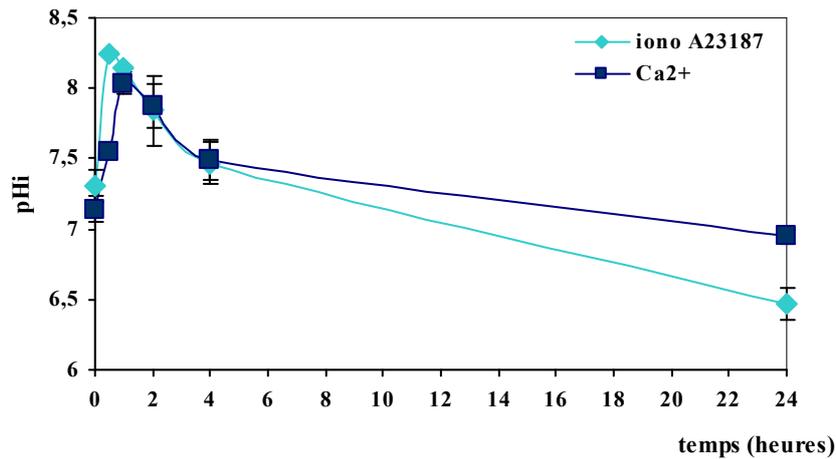


Figure 50 - Variations du pH intracellulaire dans les hématies incubées en présence de Ca^{2+} 2,5 mM et en présence et en absence d'ionophore A23187 0,5 μM .

3.4.2.2. Céramides et β -galactosidase

En partant des résultats de Mouton et Venable (2000) selon lesquels la C6-céramide induit l'expression d'une β -galactosidase acide dans les fibroblastes diploïdes humains Wi-38 dérivés des poumons fœtaux, nous avons étudié la capacité du même inducteur de sénescence chez les hématies humaines. D'après les recherches de ces auteurs, l'induction de l'expression de la β -galactosidase est spécifique du céramide C6. Comme le montre la figure 51, contrairement aux résultats attendus, nous avons observé une baisse considérable de l'activité enzymatique sous l'action des céramides dont les raisons pourraient être les suivantes :

1. Les mécanismes d'induction de sénescence sont complètement différents dans les deux types cellulaires.
2. La β -galactosidase n'est pas un marqueur universel de la sénescence

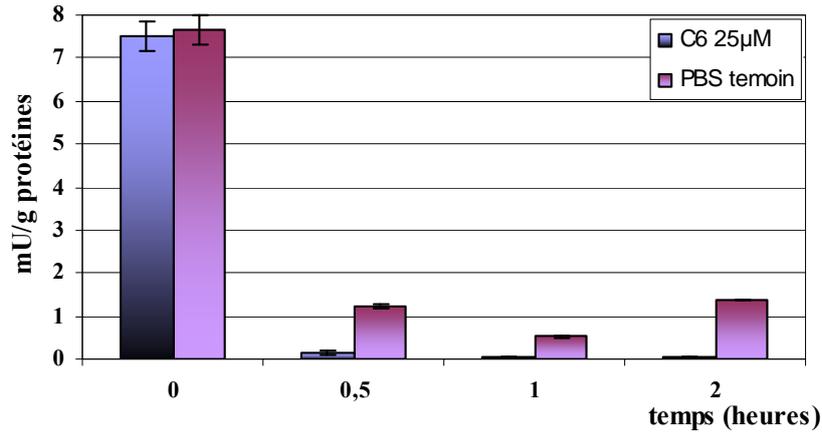


Figure 51 – Activité β-galactosidasique des hématies préalablement incubées à 37⁰C, pendant des temps variables, en présence et en absence de céramide C6

3.4.2.3. Peroxyde d'hydrogène et β-galactosidase

Nous sommes parti des résultats sur des cellules HDFs (Human diploid fibroblasts) du syndrome Werner (WS) exposé à H₂O₂ comme stress subcytotoxique, appelée dans ce cas stress-induced premature senescence (SIPS) (de Magalhaes *et al.*, 2004). Ces cellules donnent une activité SA-β-Gal mais sans que la concentration en peroxyde d'hydrogène a une influence directe. Des autres types cellulaires par exemple les cellules HeLa révèlent une activité SA-β-Gal en présence de H₂O₂ (Ling *et al.*, 2006).

La concentration de 2mM a été choisi par plusieurs auteurs pour étudier le stress oxydatif lié à la production d'ions superoxydes (ROS) dans les hématies (Amer *et al.*, 2004) et pour l'étude de la peroxydation des lipidides (Gieseg *et al.*, 2001). L'analyse cytofluorimétrique (fig. 52) démontre la formation de ROS amplifié par H₂O₂ dans les hématies incubées en tampon PBS et en absence ou en présence de peroxyde d'hydrogène. Le choc oxydatif se traduit en outre, par des modifications dramatiques de la morphologie sous l'action de H₂O₂ (fig. 53) avec, en particulier, la disparition de la forme discocytaire.

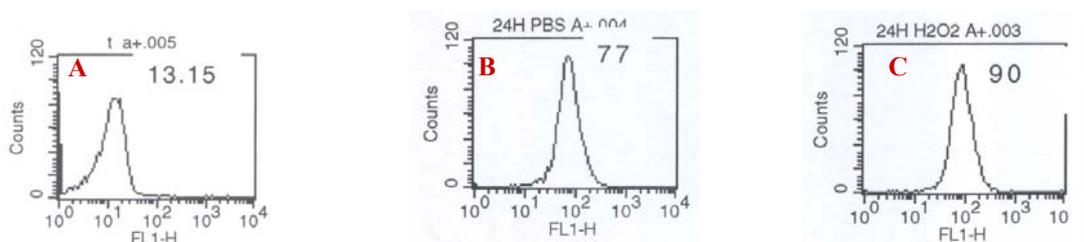


Figure 52 – Variations des ROS des hématies après 24 heures d'incubation en PBS (**B**) ; PBS avec 2mM H₂O₂ (**C**) à 37⁰C. **A** : témoin sang frais.

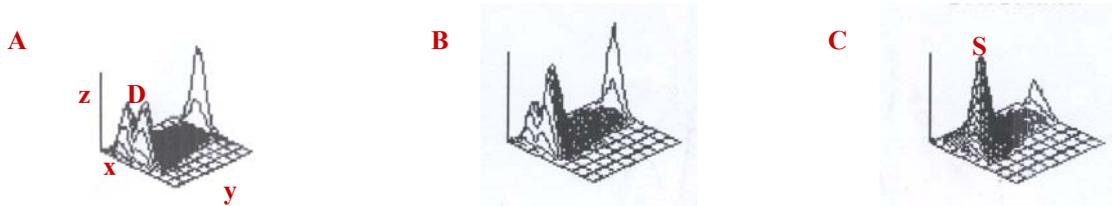


Figure 53 – Etude par cytométrie en flux dans le mode FSC(taille) / SSC(densité) des variations de la morphologie des hématies après 24 heures d’incubation à 37°C en tampon PBS (**B**) et en tampon PBS 2 mM H₂O₂ (**C**). **A** : témoin de sang frais. L’hématocrite des hématies incubées a été de 20%.

Dans les conditions expérimentales appliquées, l’externalisation de la phosphatidylsérine est très modérée confirmant ainsi le fait que ce phénomène est un marqueur tardif de l’apoptose. A l’opposé, comme le montre la figure 54, la diminution de l’activité β -galactosidase est spectaculaire apportant un argument supplémentaire à notre conclusion que la diminution de l’activité β -galactosidase de la membrane d’hématies est un marqueur de sa sénescence.

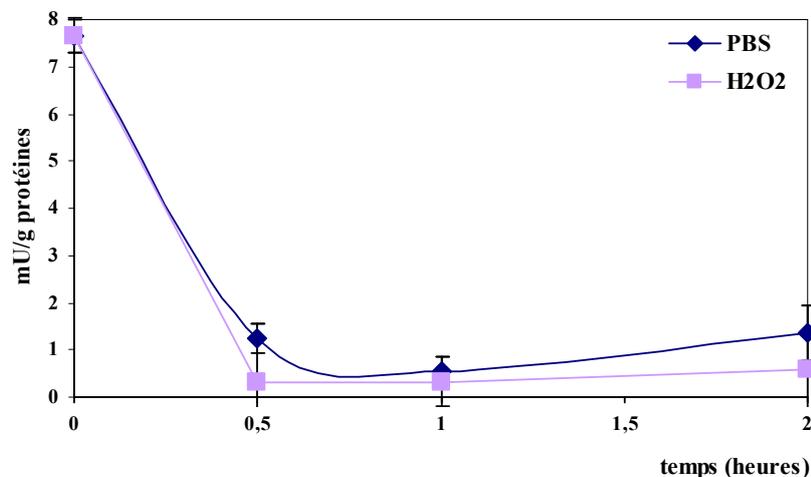


Figure 54 – Cinétique de l’activité β -galactosidase des hématies incubées en absence (PBS) et en présence de peroxyde d’hydrogène 2mM (H₂O₂) dans un tampon PBS de pH 7,4 pendant des temps variant de 0,5 à 2 heures.

3.4.2.4. Vieillesse induit par incubation des hématies dans le plasma et β -galactosidase

En vue de préparer des quantités importantes d’hématies sénescents dans des conditions physiologiques, nous avons mis au point au laboratoire, un procédé de production massive de ces cellules qui consiste à incuber les hématies à 37°C dans leur plasma sans déleucocytation préalable (Résultats non publié). Dans ces conditions, nous obtenons des

hématies qui présentent toutes les caractéristiques des hématies sénescents. Elles sont, en particulier, essentiellement représentées par des sphérocytes, seuls phagocytés. De telles hématies, nous ont fourni les résultats suivants dont le plus intéressant concerne l'activité β -galactosidase. En effet, au cours de ce vieillissement artificiel, nous avons observé une incontestable diminution de cette activité qui confirme donc le fait que, à l'inverse de ce que de nombreux auteurs ont décrit à propos de cellules nucléées, nous observons, non pas une augmentation, mais une diminution de l'activité β -galactosidase au cours de vieillissement de l'hématie.

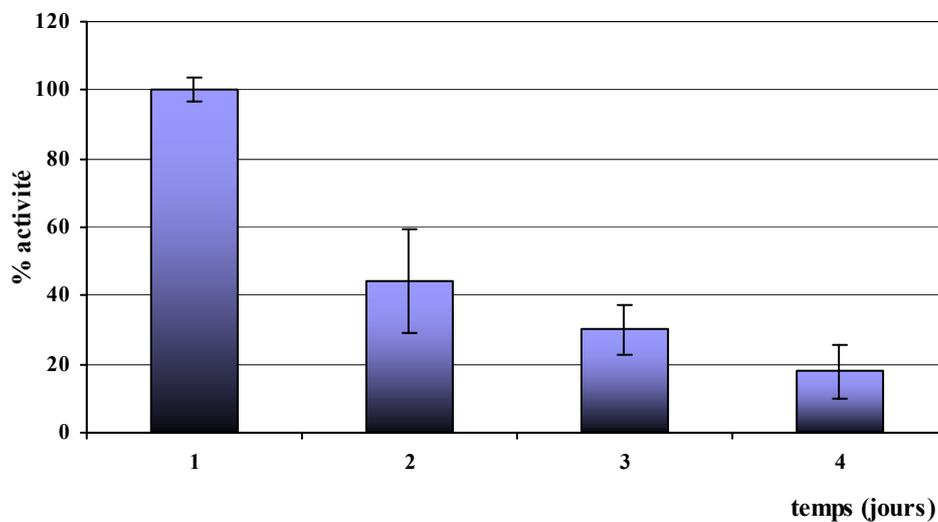


Figure 55 – Cinétique de l'activité β -galactosidase des hématies incubées dans leur plasma.

Dans ces conditions, le mystère entourant l'observation de Bratosin *et al.* (2001) reste entier. Rappelons, en effet, que l'utilisation de lectines a conduit ces auteurs à démontrer que les hématies se désialyleraient au cours de leur vieillissement physiologique, mais que cette désialylation s'accompagnait, non pas d'une augmentation des résidus de β -galactosyls terminaux, mais d'une diminution de ces résidus, impliquant, en principe, l'intervention d'une β -galactosidase sans pour autant, impliquer une augmentation de l'activité de cet enzyme.

Conclusions

De l'ensemble des résultats que nous avons acquis dans le domaine de la β -galactosidase membranaire de l'hématie humaine, nous pouvons tirer les deux conclusions suivantes :

1 – Le test cytochimique de Dimri *et al.* (1995) de détection de l'activité β -galactosidasique est certes valable pour l'étude de l'enzyme cytosolique, il n'est pas pour celle de l'enzyme membranaire érythrocytaire car il annonce d'une manière artefactuelle, une augmentation de son activité car,

2 – La mesure de cette dernière par la méthode biochimique fondée sur l'emploi de l'umbelliféryl- β -D-galactoside qui exclut tout artefact, démontre, au contraire, une diminution de l'activité de l'enzyme chez les hématies physiologiquement ou artificiellement vieilles. En conséquence, à l'inverse des résultats obtenus avec les cellules nucléées, la diminution de l'activité β -galactosidasique devient un marqueur de sénescence.

En conséquence, nous n'avons pas résolu l'énigme qui concerne le fait que la désialylation touchant le vieillissement physiologique des hématies humaines induise, non pas une augmentation, mais une diminution des résidus β -galactosyles terminaux. Le mystère reste donc entier.

III - TRAVAUX DE RECHERCHES APPLIQUES.

RECHERCHES DANS LE DOMAINE DE LA TRANSFUSION SANGUINE

Dès le début des recherches entreprises au laboratoire dans le domaine de la transfusion, il y a une dizaine d'années, par le Pr. Montreuil et le Dr. Bratosin, en collaboration étroite avec le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille (Directeur : Dr. Jean-Jacques Huart) et la Société MacoPharma de Tourcoing (Directeur : Dr. Francis Goudaliez), une stratégie avait été mise en place qui reposait sur trois principes.

1 – Définir de nouveaux critères de viabilité des hématies qui devaient s'ajouter aux critères classiques de l'époque (détermination du taux d'hémolyse ; dosage de l'ATP et du 2,3-DPG).

2 – Modifier la composition des milieux de prélèvement et de conservation des sangs destinés à la transfusion en appliquant systématiquement les critères précédents.

3 – Pour une raison d'éthique et compte tenu du caractère précieux des dons du sangs, il fut décidé de ne pas réaliser les études sur des poches grandeur nature fournies par le Centre de Transfusion, mais sur des poches de format réduit fabriquées par la Société MacoPharma. Dans ces conditions, les faibles volumes de sang nécessaires étaient recueillis au Centre de Transfusion de Lille sur milieu CPD anticoagulant avec l'accord des donneurs préalablement informés des buts poursuivis qui concernent l'amélioration de la qualité des sangs transfusés.

Nous exposerons successivement les résultats que nous avons obtenus, d'une part, dans la recherche des facteurs portant atteinte à la viabilité des hématies et, d'autre part, dans nos tentatives d'amélioration des milieux de conservation des hématies, puis des conditions de prélèvement des sangs.

I – RECHERCHE DES « STORAGE LESIONS » DES HEMATIES DESTINEES A LA TRANSFUSION

I.A. Préparation des poches de conservation des hématies

Les sangs sont prélevés par ponction classique dans les conditions suivantes : 450 ml de sang sont recueillis dans 63 ml d'une solution anticoagulante CPD (Citrates Phosphate Dextrose) de pH 5,5 dont la composition est la suivante :

Acide citrique	3,25 g
Citrate de sodium	26,30 g
Glucose	25,50 g
Phosphate monosodique	2,51 g
Eau distillée apyrogène q.s.p.	1.000 ml

Après un repos de 24 heures à 20°C, les suspensions sont centrifugées et le concentré globulaire obtenu, déleucocyté par passage sur filtre Leucoflex LST (Brevet MacoPharma), est introduit (hématocrite 60 p. cent) dans une solution dite de SAGM (Sodium Adénine Glucose Mannitol) de pH $5,1 \pm 0,3$ dont la composition est la suivante :

Chlorure de sodium	8,77 g
Adénine	0,169 g
Glucose (monohydrate)	9,00 g
Mannitol	5,25 g
Eau distillée apyrogène q.s.p.	1.000 ml

Les poches sont ensuite stockées à 4°C pendant 6 semaines au maximum.

L'ensemble de ces opérations sont illustrées par la figure 56 de la page suivante.

I.B. Etude de la viabilité des hématies

I.B.1. Préparation du biomatériau

La viabilité des hématies a été étudiée en appliquant l'ensemble des critères que nous avons décrits aux pages 54 à 73 à des poches qui nous ont été aimablement fournies par le Docteur Eric Smagghe, Directeur de l'Unité non thérapeutique du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille (CRTS) (dont l'appellation a été récemment changée en Etablissement Français du Sang ou EFS) et dont le Directeur Général est le Docteur Jean-Jacques Huart. Chaque échantillon fourni était accompagné d'une fiche de contrôle sanitaire (Certificat de conformité) (voir page 120). Ces poches étaient conservées par nos soins à 4°C et, de semaine en semaine et pendant 6 semaines, la loi autorisant ces conditions de stockage, nous avons appliqué aux hématies recueillies par simple centrifugation, les critères de viabilité mentionnés ci-après.

Les essais ont été effectués sur les sangs de 4 sujets différents et, comme les résultats obtenus ont été similaires, nous décrirons ceux que nous a fournis une seule expérimentation significative.

I.B.2. Application de critères de viabilité classiques

I.B.2.1. Test ATP. Comme le montre la courbe de la figure 57 (p. 121), l'ATP décroît progressivement, mais est encore présent chez l'hématie au terme de 6 semaines de stockage avec, toutefois, une réduction du tiers environ de la concentration initiale qui passe de 97 à 30 µg/dL.

TRANSFUSION FILTRATION

LEUCOFLEX LST

THE FLEXIBLE IN-LINE WHOLE BLOOD FILTERS



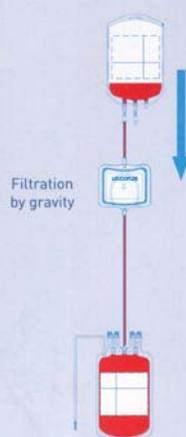
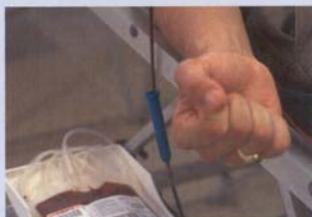
MacoPharma develops and manufactures leucodepletion systems to improve the quality and the safety of blood transfusion.

LEUCOFLEX LST1 and LEUCOFLEX LST2 are in-line filters for the leucodepletion of Whole Blood.

Leucodepletion improves the storage quality of red cells, minimises the risks of alloimmunisation, Febrile Non Haemolytic Transfusion Reactions, post operative infection, immunomodulation, viral contamination (CMV, HTLV...), bacterial contamination and potential white cell associated prion load.

PRINCIPLE

LEUCOFLEX LST1 and LST2 are integrated within the blood pack system. They are depth filters made from layers of polyester and polypropylene, allowing leucodepletion of Whole Blood.



PRINCIPLE

LEUCOFLEX LST1 and LST2 achieve over 4 log white cell reduction, with a haemoglobin loss below 6 g, whilst maintaining plasma quality.

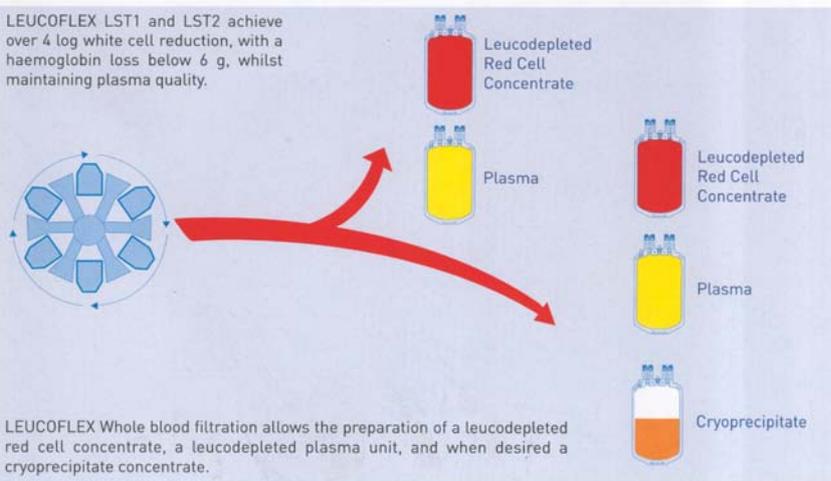


Figure 56 – Schéma et principe de la déleucocytation du sang par passage sur filtre Leucoflex LST (Brevet MacoPharma), est introduit (hématocrite 60 p. cent) dans la solution SAGM.



UNITE NON THERAPEUTIQUE
 EFS Nord de France
 21 rue Camille Guérin
 59012 Lille cedex
 Tel : 03.28.54.20.63
 Fax : 03.28.54.20.64

**CERTIFICAT DE CONFORMITE POUR FOURNITURE DE
 PRODUITS SANGUINS A USAGE NON THERAPEUTIQUE**

Destinataire : Monsieur MONTREUIL	1 Date d'envoi : 31 MARS 2004
	1
	1
	1

Les produits composant cet envoi ont été soumis aux différents tests de dépistage obligatoires selon les Bonnes Pratiques de Qualification du Don . Les recherches effectuées sont négatives pour :

- Recherche d'anticorps anti-VIH 1+2
- Recherche d'anticorps anti-VHC
- Recherche d'antigène HBs
- Recherche d'anticorps anti-Hbc
- Recherche d'anticorps anti-HTLV 1+2
- Recherche de la sérologie syphilitique

DON N° : 44040523864

Docteur Jean-Jacques HUART
 Directeur général

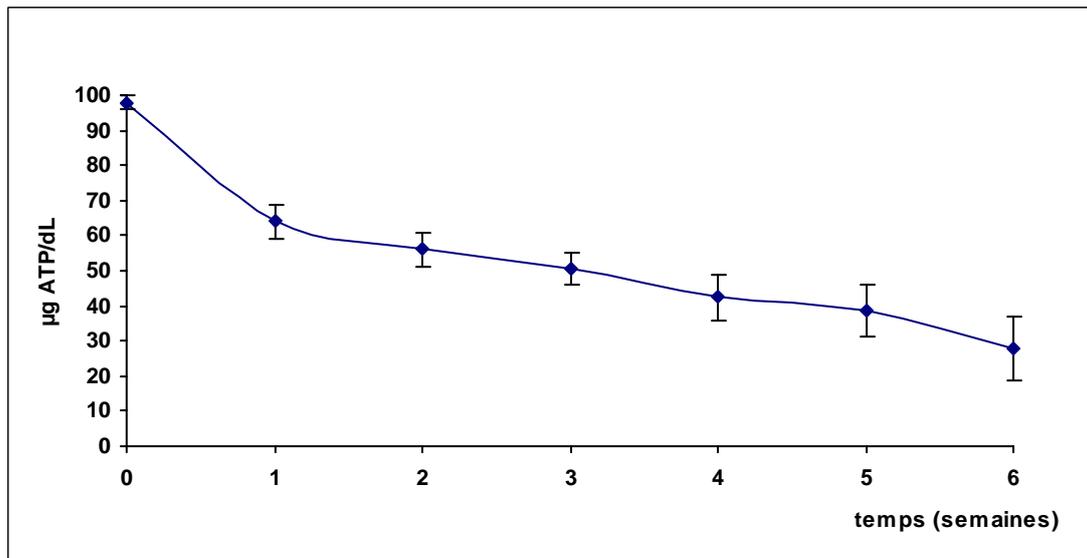


Figure 57 – Variation de la teneur en ATP des hématies au cours de leur conservation dans les conditions appliquées dans les centres de transfusion et décrites dans le texte. Les valeurs représentent la moyenne de 4 expérimentations différentes.

I.B.2.2. Mesure de l'hémolyse. Après 6 semaines de conservation, le taux d'hémolyse reste modéré puisqu'il n'excède pas 1% (Fig. 58 ci-dessous).

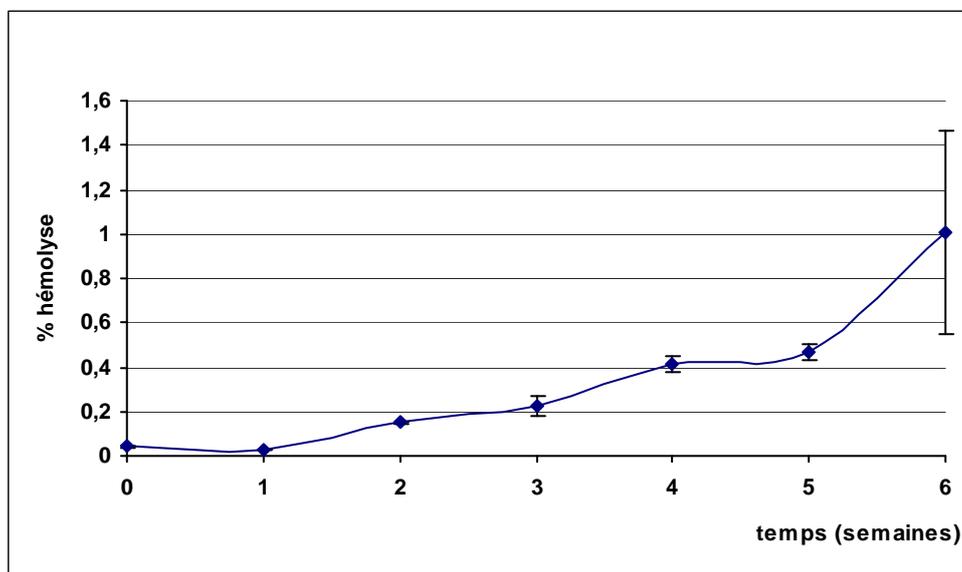


Figure 58 – Variation du taux d'hémolyse des hématies au cours de leur conservation dans les conditions appliquées dans les centres de transfusion et décrites dans le texte. Les valeurs représentent la moyenne de 4 expérimentations différentes.

I.B.3. Application des nouveaux critères de viabilité

I.B.3.1. Test de viabilité à la calcéine-AM.

La figure 59 montre que les hématies accusent une perte d'activité des estérases mais qu'elles demeurent néanmoins parfaitement viables.

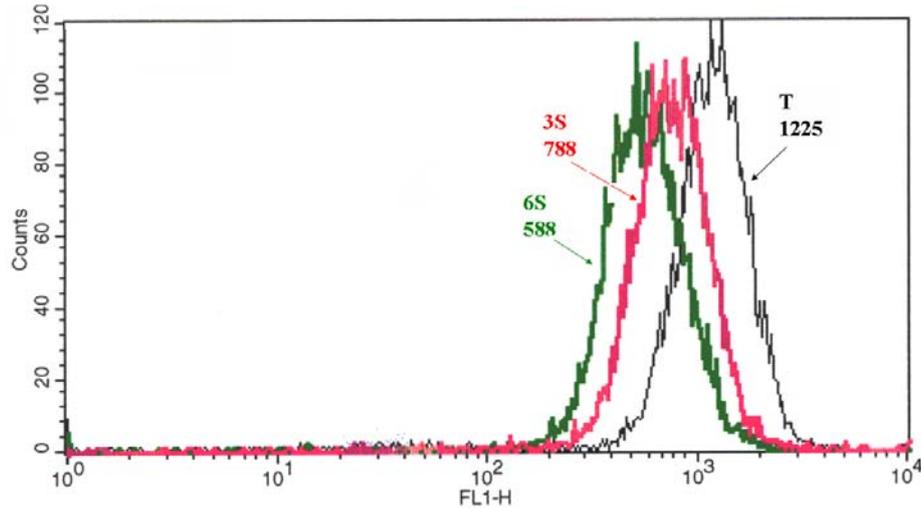


Figure 59 – Etude de la viabilité (test cytofluorimétrique dans le mode FL1 à la calcéine-AM) d'hématies conservées en milieu SAGM pendant 3 (3S) et 6 (6S) semaines. T : hématies témoins. Les nombres représentent les MFI (Mean of fluorescence intensity). M : zone des cellules mortes. En ordonnées : nombre relatif de cellules.

I.B.3.2. Recherche des radicaux superoxydes ROS

Comme le montre la figure 60, le stockage des hématies n'induit pas la formation de radicaux superoxydes particulièrement meurtriers pour les cellules, même au terme de 6 semaines de conservation.

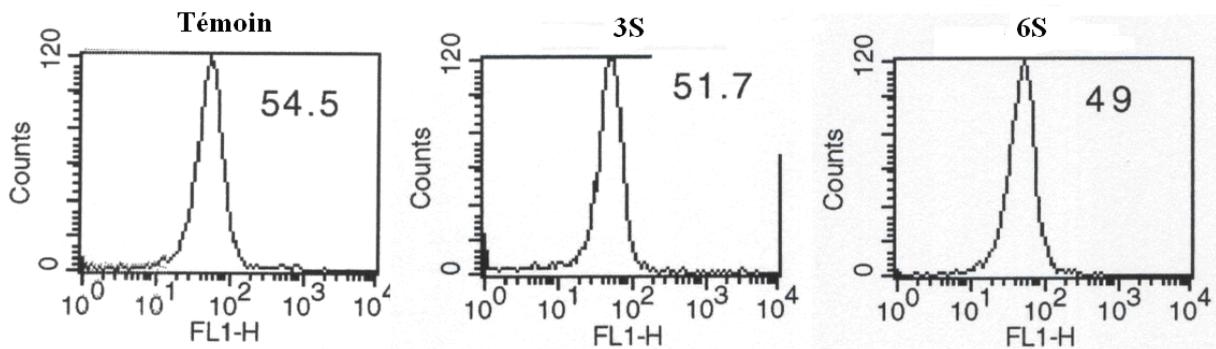


Figure 60 – Recherche des radicaux superoxydes (Reactive oxygen species ou ROS) par cytofluorimétrie en flux dans le mode FL1 chez les hématies conservées en milieu SAGM pendant 3 (3S) et 6 (6S) semaines. T : hématies témoins. Les nombres représentent les MFI (Mean of fluorescence intensity). En ordonnées : nombre relatifs de cellules.

I.B.3.3. Détermination du récepteur CD 47 d'antiphagocytose

La figure 61 montre qu'il n'y a aucune perte du récepteur CD 47 d'antiphagocytose présent dans les membranes des hématies stockées pendant 6 semaines.

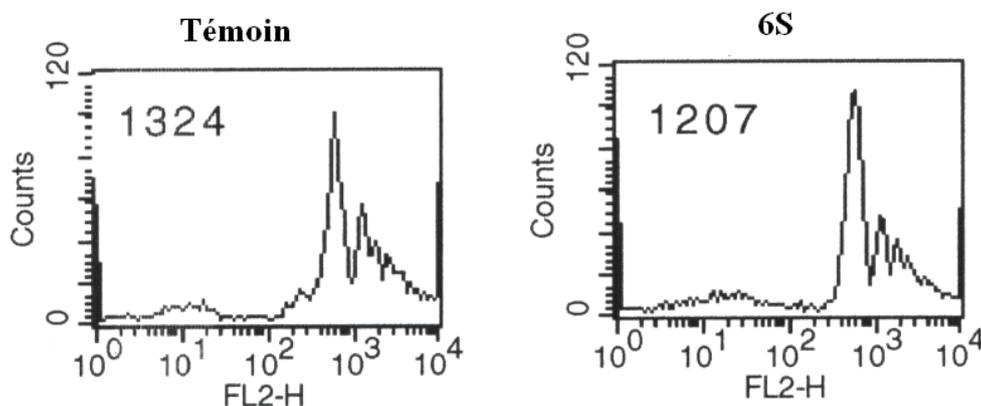


Figure 61 – Recherche par cytofluorimétrie dans le mode FL2 des récepteurs CD 47 d'antiphagocytose présents dans les membranes des hématies stockées pendant 6 semaines (6S). Les nombres représentent les MFI (mean fluorescence intensity). Témoin : hématies fraîches non traitées.

I.B.3.4. Test à l'annexine-V-FITC d'externalisation de la phosphatidylsérine

Comme le montre la figure 62, l'externalisation de la phosphatidylsérine reste discrète, n'excédant pas 3,89 et 6,56% des cellules au terme de 3 et 6 semaines de stockage respectivement, comparé à 3,66% chez les cellules témoins.

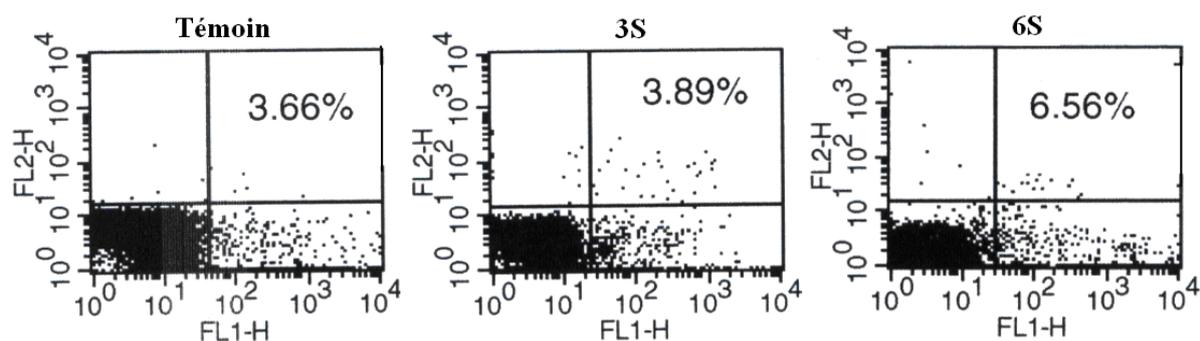


Figure 62 – Analyse par cytométrie en flux dans le mode FL1/FL2 de l'externalisation de la phosphatidylsérine (test de l'annexine-V-FITC) chez des hématies stockées en milieu SAGM pendant 3 semaines (3S) et 6 semaines (6S). Cadran inférieur droit : cellules annexine-V-positives ; cadran inférieur gauche : cellules annexine-V-négatives. Nombre de cellules comptées : 10.000. Témoin : hématies fraîches non-traitées.

I.B.3.5. Test « lectines » de désialylation

Au bout de 6 semaines de stockage comme le démontre la figure 63, l'analyse par cytofluorimétrie en flux des hématies marquées par les lectines-FITC spécifiques des acides sialiques (MAA et SNA) et des résidus de β -galactose terminaux (RCA) ne révèle pas de variations significatives des intensités de fluorescence qui aurait indiqué une désialylation des glycoconjugués membranaires.

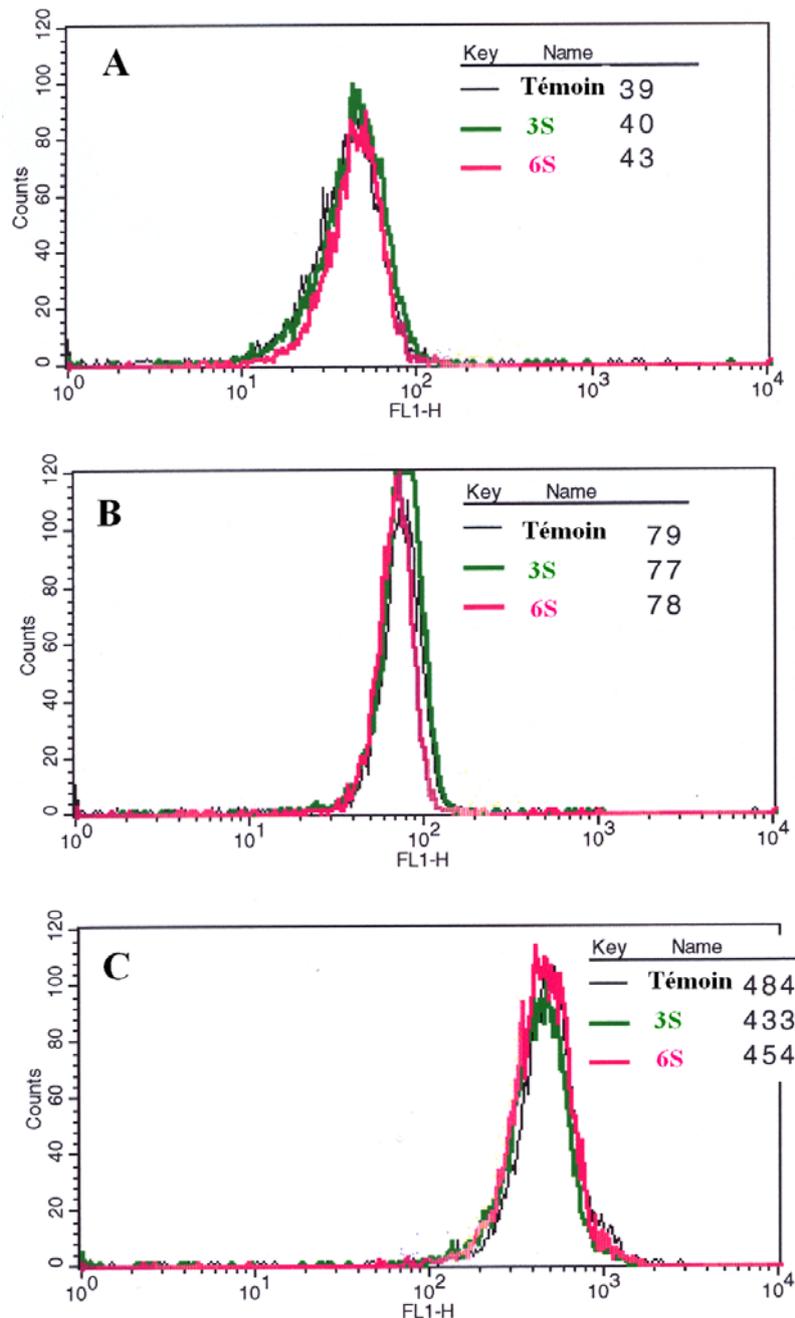


Figure 63 – Histogrammes cytofluorimétriques dans le mode FL1 de la fixation des lectines spécifiques des acides sialiques : MAA-FITC (A) et SNA-FITC (B) spécifiques des acides sialiques conjugués, respectivement, en position 3 et 6 des résidus de β -galactose et RCA-FITC (C), spécifique des résidus de β -galactose dévoilés par la désialylation. En ordonnées : nombre relatif de cellules. Les nombres représentent les intensités de fluorescence MFI.

I.B.3.6. « Test PKH 26 » de capture et de phagocytose des hématies

De l'analyse de l'ensemble des résultats précédents, il apparaît que, même au terme d'un stockage prolongé des hématies, celles-ci sont parfaitement viables puisqu'elles répondent à l'ensemble des critères de bonne santé précédemment décrits. En effet, au bout de 6 semaines de conservation des poches, tous les critères de viabilité étaient satisfaisants :

- Pas de désialylation démontrée par l'utilisation de lectines spécifiques, ni d'externalisation de résidus de β -galactose (marqueurs de capture par les macrophages) révélée par les lectines spécifiques.
- Faible proportion d'hématies annexine-positives (externalisation de la phosphatidylsérine marqueur de phagocytose) : 6,56% (hématies fraîches témoins : 3,66%).
- Test de viabilité à la calcéine inchangé.
- Pas de formation d'ions superoxydes meurtriers.
- Hémolyse modérée : 6%.
- ATP encore présent mais avec une réduction de 50%.

Néanmoins, l'application de la méthode à la PKH d'étude *in vitro* de la phagocytose a montré, à notre grand étonnement, que celle-ci était très importante et que les hématies étaient phagocytées. En effet, l'observation en microscopie optique et de fluorescence (Figure 64) montre que les hématies, au terme de 6 semaines de stockage, sont massivement capturées par les macrophages péritonéaux de souris. En outre, la figure 65 montre que les mêmes hématies sont phagocytées car elles sont visibles dans le cytoplasme même des macrophages. Ce phénomène est confirmé par l'analyse en cytofluorimétrie en flux (Fig. 66) qui montre une phagocytose massive par les macrophages.

En conclusion, des résultats précédents, nous pouvons conclure, une fois encore, que le dogme « désialylation, marqueur de capture et externalisation de la phosphatidylsérine, marqueur de phagocytose » est pris en défaut. Déjà, plusieurs auteurs l'avaient contesté comme, par exemple, Böse *et coll.* (2004) dans un article intitulé : « The phosphatidylsérine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal ». Une donnée plus importante encore issue de nos résultats montre que le dogme de « l'ATP, critère classique de bonne santé de l'hématie » est fortement ébranlé comme le soupçonnait Beutler qui écrivait dans l'article intitulé « Back to the future in RBC preservation » que nous avons antérieurement cité : « Although the popular misconception persists that it is the ATP level in cells that determines whether or not they survive, that is a far from reliable indicator of

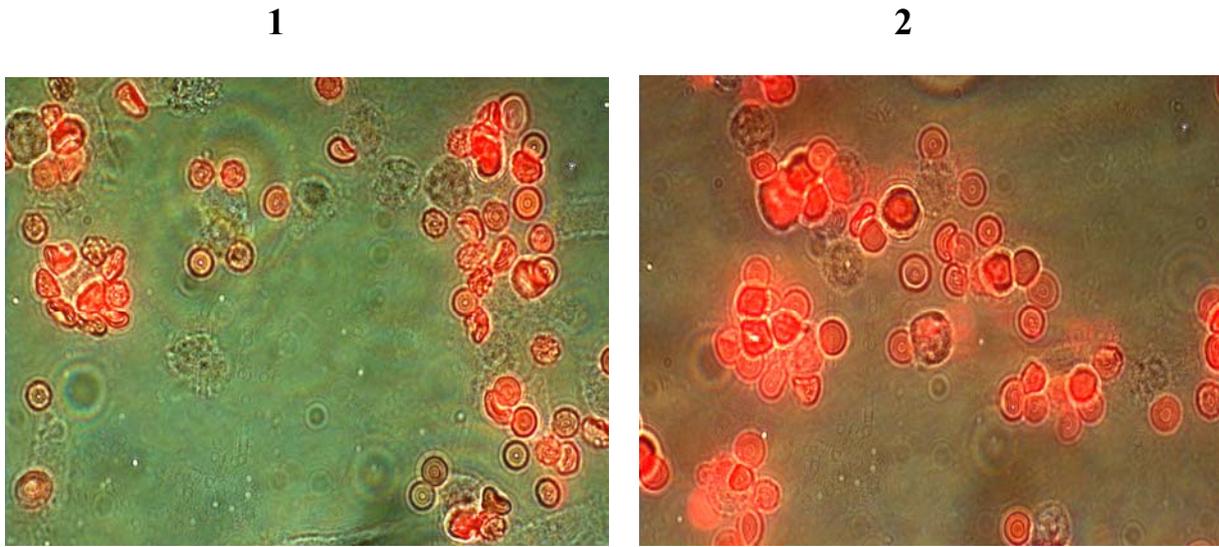


Figure 64 – Observation en microscopie de fluorescence de la capture d’hématies au terme de 6 semaines de stockage (1) et d’hématies désialylées enzymatiquement (2) servant de témoins.

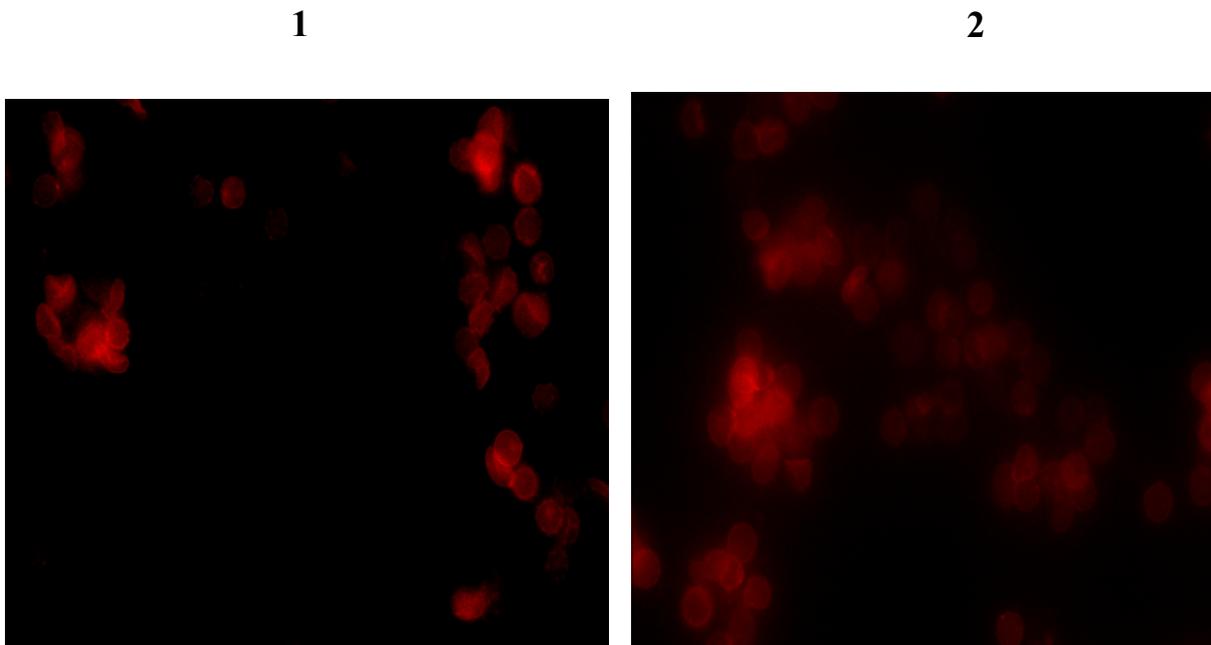


Figure 65 – Observation en microscopie de fluorescence (marquage des cellules par la PKH-26) de la phagocytose d’hématies au terme de 6 semaines de stockage (1) et d’hématies désialylées enzymatiquement (2) servant de témoins.

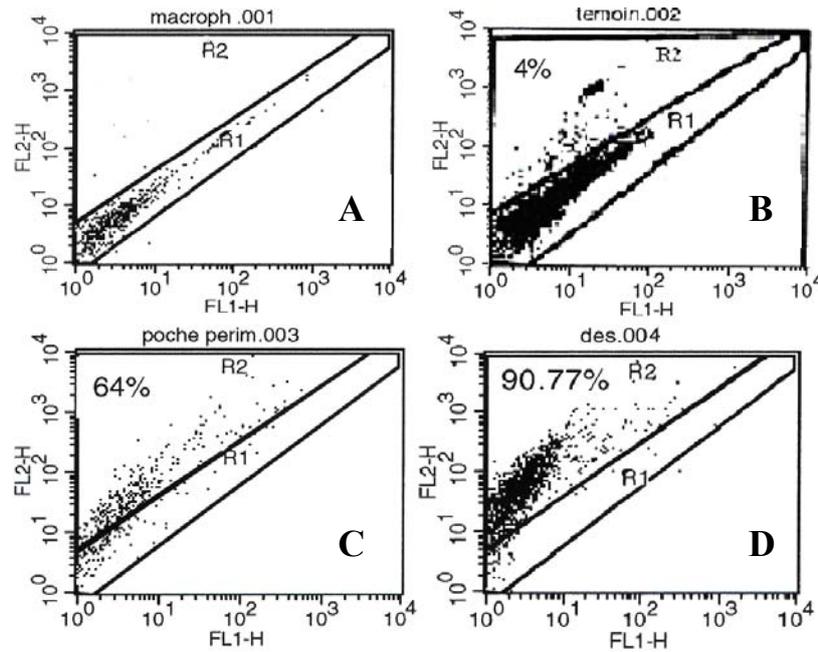


Figure 66 - Analyse cytofluorimétrique dans le système FL1/FL2 de la phagocytose des hématies marquées à la PKH 26. R₁ : zone des macrophages non-phagocytaires ; R₂ : zone des macrophages phagocytaires. **A** : Analyse des macrophages non-incubés en présence d'hématies. **B**, **C**, **D** : Incubation des macrophages en présence d'hématies fraîchement prélevées (**B**), d'hématies conservées pendant 6 semaines dans les conditions appliquées dans les centres de transfusion (**C**) et d'hématies désialylées enzymatiquement par la neuraminidase de *Vibrio cholerae* servant de témoins (**D**). Les nombres précisent les proportions de macrophages phagocytaires.

viability. It is true that RNCs with very low ATP levels cannot phosphorylate glucose and hence are fated to die, but high levels of ATP do not ensure survival of a stored RBC. »

I.B.3.7. Critères morphologiques. La solution de l'énigme.

L'énigme posée par ces résultats non-orthodoxes a été résolue par l'étude de la morphologie des hématies par cytométrie en flux dans le système « dot-plot » FSC/SSC (taille des cellules/densité des cellules) qui a révélé une diminution de la taille des hématies et une augmentation de leur densité, deux caractéristiques des hématies sénescents, ainsi que la disparition des discocytes (Fig. 67).

Ces résultats ont été entièrement confirmés par la microscopie de balayage qui montre (Fig. 72) que, dès la 3^{ème} semaine de stockage, la forme discocytaire des hématies a presque totalement disparu au profit de formes échinocytaires et surtout de formes sphérocytaires qui sont, comme nous l'avons déjà annoncé, les seules qui soient phagocytées. Au terme, de la 6^{ème} semaine, ce phénomène s'accroît et les sphérocytes lisses prédominent.

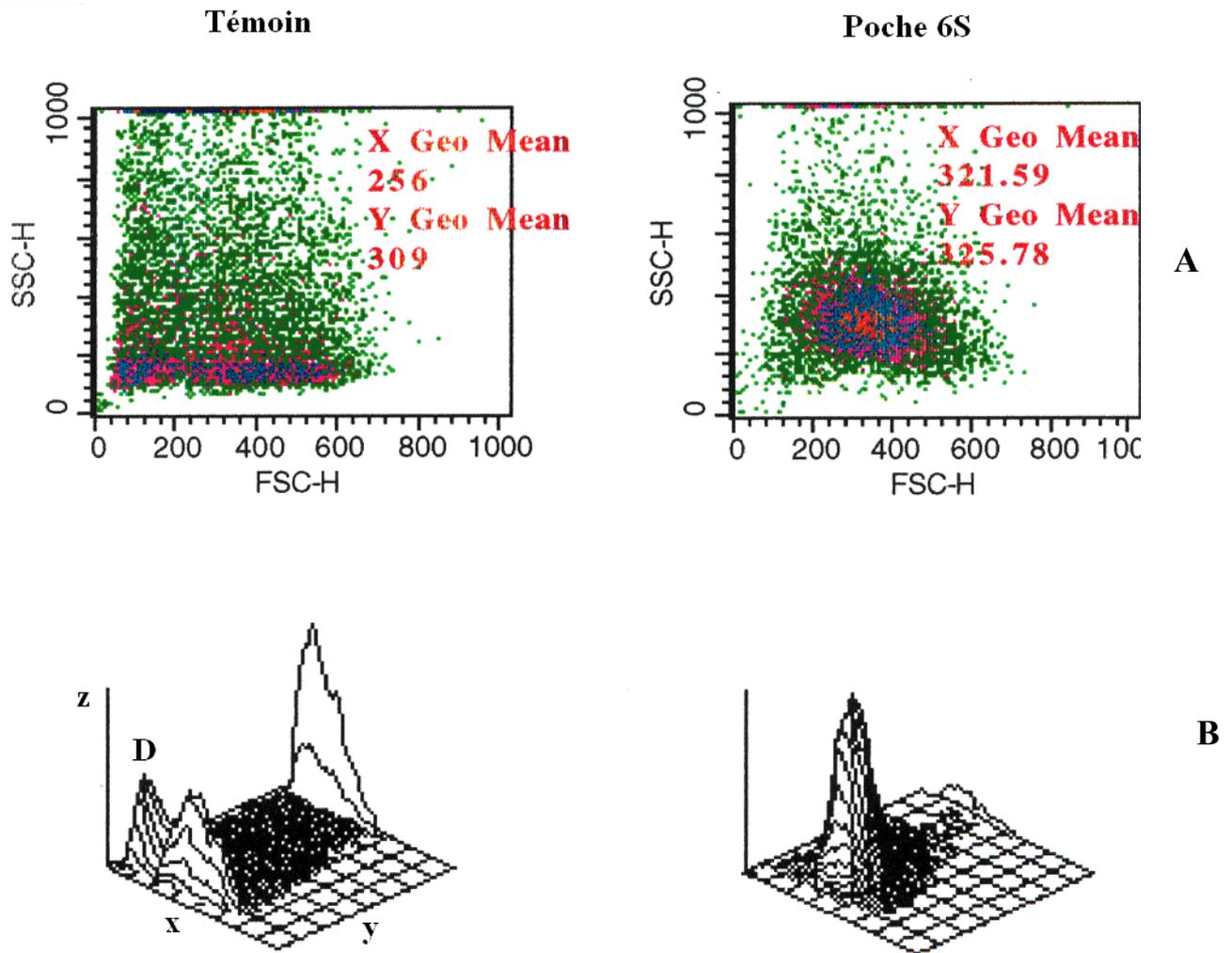


Figure 67 – Analyse bidimensionnelle (**A**) et tridimensionnelle (**B**) dans le mode FSC/SSC d’hématies fraîchement prélevées (T) et d’hématies stockées pendant 6 semaines (6S) dans les conditions du centre de transfusion. On observe clairement, dans ce dernier cas, l’existence d’une seule population et la disparition des discocytes. x : FSC ; y : SSC ; z : nombre relatif de cellules ; D : discocytes.

Ces résultats démontrent que, parmi l’ensemble des « critères de qualité » que nous avons décrits et qu’il convient d’appliquer, la microscopie électronique de balayage et le test de l’érythrophagocytose sont des critères absolus et incontournables.

I.C. Conclusions

Au regard de telles observations, la question se posait de savoir dans quelle direction orienter nos recherches pour identifier les marqueurs de phagocytose qui apparaissent à la surface des hématies sénescents et au cours de leur stockage dans les centres de transfusion.

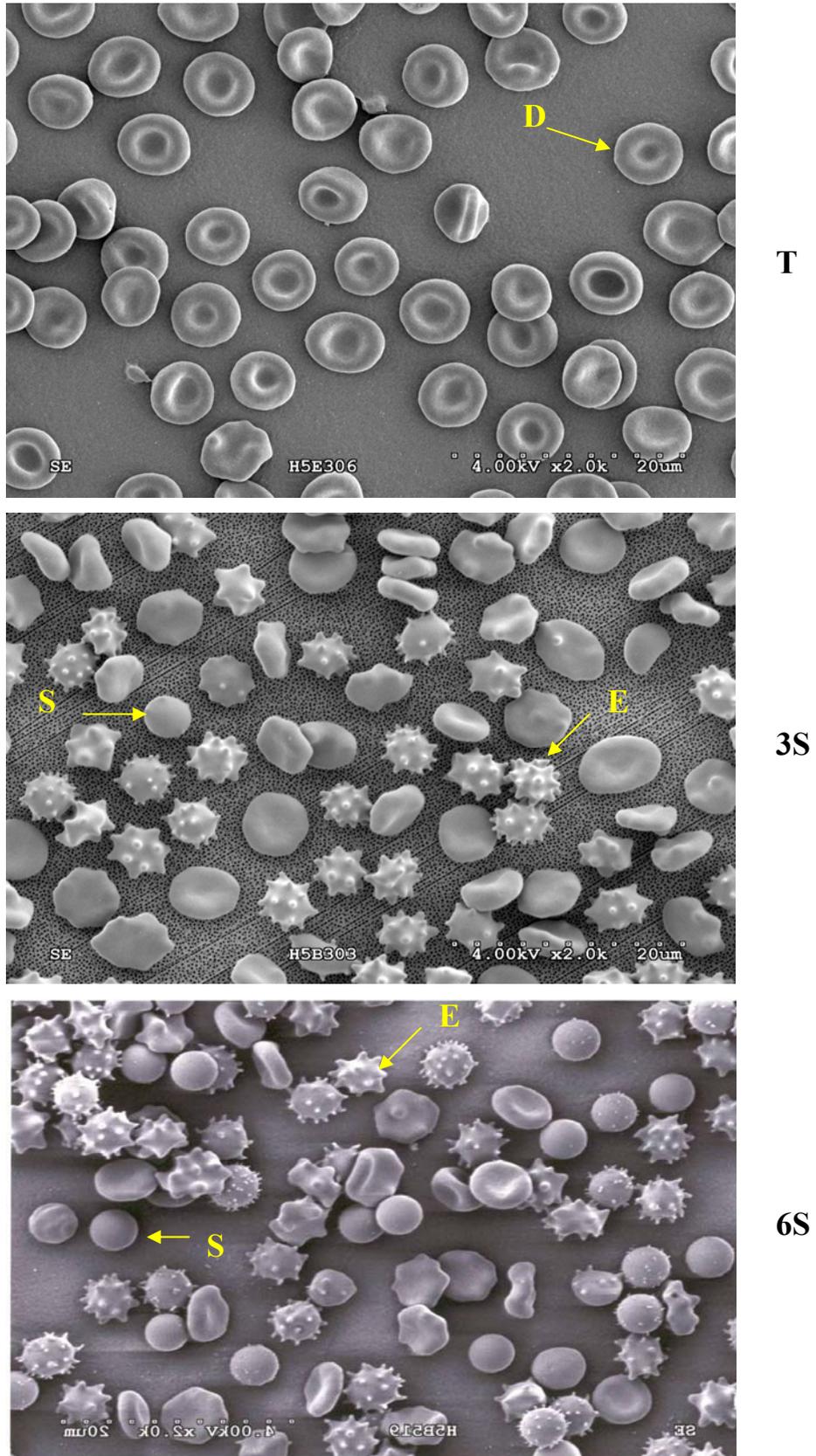


Figure 68 – Microscopie de balayage d'hématies fraîches non traitées (T) et d'hématies au terme de 3 (3S) et 6 (6S) semaines de stockage dans les conditions des centres de transfusion. D : discocytes ; E : échinocytes ; ES : échinocytes à spicules ; EL : échinocytes lisses.

L'hypothèse de travail à laquelle nous nous sommes arrêtée est que ces marqueurs sont liés à la glycation des protéines membranaires qui conduit, *via* le glyoxal et le méthylglyoxal et par un mécanisme décrit dans la figure 24 de la page 56, à la formation d'AGEs (Advanced Glycation End Products) suivant la terminologie anglo-saxonne. En effet, on sait depuis longtemps qu'il existe, dans les membranes des macrophages des récepteurs de ces AGEs qui induisent la phagocytose des cellules et des protéines circulantes « glyquées ». Nous pouvons, à cet égard, citer les deux articles ci-dessous qui sont démonstratifs :

- Vlassara H. *et al.*, in *J. Exp. Med.*, 166 (1987) 539-549 : Advanced glycosylation endproducts on erythrocyte cell surface induce receptor-mediated phagocytosis by macrophages. A model for turnover of aging cells.
- Ando K. *et al.*, in *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 258 (1999) 123-127 : Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation.

II – RECHERCHES SUR L'AMELIORATION DES MILIEUX DE PRELEVEMENT ET DE CONSERVATION DES HEMATIES

Nous fondant sur l'hypothèse que les symptômes de vieillissement et de pré-apoptose des hématies conservées en milieu SAGM que nous avons observés résultent de la glycation des protéines membranaires érythrocytaires, la question s'est posée de savoir si l'addition de glucose dans les milieux de prélèvement et de conservation des hématies – à une concentration qui est 10 fois celle du glucose sanguin – était réellement indispensable.

Pour répondre à cette question, deux séries d'expérimentations ont été menées qui ont concerné, la première, le milieu de conservation et, la seconde, le milieu de prélèvement.

II.A. Tentatives d'amélioration des milieux de conservation

En vue d'observer les effets des milieux de conservation eux-mêmes sur des hématies isolées de sangs héparinés et déleucocytés dans les conditions décrites à la page 111, nous les avons conservées dans des minipoches de 50 ml (4°C pendant des temps variant de 1 à 6 semaines) dans différents milieux décrits dans le Tableau IX et en respectant un hémocrite de 60%. L'application de l'ensemble des critères de viabilité que nous avons décrits aux pages 69 à 94 n'a révélé aucune différence significative qui aurait pu conduire à proposer une nouvelle composition « miracle » de milieu de conservation. Dans ces conditions, bien que

Tableau IX – Composition des milieux de conservation des hématies

Composant (g/litre)	SAG-M	PAGGS-M	SAG-M Modif lab	CGR 1	CGR 2
Adénine	0,169	0,194	0,262	0,268	0,268
Bicarbonate de sodium	-	-	-	1,2	1,2
Chlorure de magnésium	-	-	-	0,48	0,48
Chlorure de potassium	-	-	-	0,37	0,37
Chlorure de sodium	8,77	10	8,77	7	7
Dextrose	9	9,4	12,37	9	9
Guanosine	-	0,408	-	-	-
Mannitol	5,25	10	5,46	5,46	5,46
Phosphate disodique	-	1,432	-	2	-
Phosphate monosodique	2,51	1,255	-	-	2

SAG-M : Saline Adénine Glucose Mannitol, milieu de conservation commercial

PAGGS-M : Phosphate Adénine Guanosine Glucose Mannitol, milieu de conservation commercial

SAG-M lab : SAGM de composition modifiée en laboratoire

CGR : concentré de globules rouges

nous avons fourni un travail considérable qui a nécessité des centaines de mesures, nous n'avons pas jugé utile de donner une liste fastidieuse de résultats et de figures. Toutefois, nous exposerons en détail ceux que nous ont apportés des expérimentations destinées à répondre à la question : « L'addition de glucose dans les milieux de conservation est-elle indispensable ? ».

II.B. Amélioration des conditions de prélèvement des hématies : le prélèvement assisté par l'Automate MacoPharma ABC®

L'abandon de toute tentative immédiate d'amélioration des milieux de conservation a permis aux responsables concernés de la Société MacoPharma de prendre la décision de tourner les recherches vers l'amélioration des conditions de prélèvement des hématies qui soulevaient d'emblée la question de leur agressivité vis-à-vis de ces cellules, liée à la composition des milieux de prélèvement. En effet, au Centre Régional de Transfusion

Sanguine de Lille, 400 ml des sangs sont recueillis dans 80 ml d'une solution anticoagulante CPD (Citrates/Phosphate/Dextrose) de pH 5,5 dont la composition est donnée à la page 117.

Le pH acide auquel les hématies sont vraisemblablement très sensibles se justifie par le fait que la stérilisation des solutions entraînant, en pH neutre, le jaunissement de ces dernières en pH neutre. Toutefois, le pouvoir tampon du plasma ramène progressivement le pH du milieu à la neutralité. Cependant, la question suivante se pose : quid de la souffrance des hématies quand l'hématocrite, au début du prélèvement, est faible et que le pH n'est pas encore revenu à la neutralité ? Pour pallier cet inconvénient, la Société MacoPharma a imaginé et mis au point une machine automatique, brevetée sous le nom d'Automate MacoPharma ABC (Automat for Blood Collection) illustré dans la figure 69 (p. 133). Cette machine pilotée par ordinateur permet de prélever le sang à hématocrite constant lié au rapport constant anticoagulant/sang 1/7. Elle offre, en outre l'avantage d'éviter la formation de caillots potentiels ainsi que le colmatage des filtres de déleucocytation. Elle protège, en outre les fonctions des plaquettes (tests effectués par MacoPharma).

Dès la conception de l'appareil, des protocoles expérimentaux ont été mis en place au niveau des laboratoires qui ont mis en évidence les effets bénéfiques du système de prélèvement sur les hématies.

II.B.1. Simulation à l'échelle du laboratoire du « prélèvement assisté »

Dans l'attente de la mise en place, par les chercheurs de la Société MacoPharma, du protocole expérimental extrêmement lourd d'étude des effets du « prélèvement assisté », l'idée est venue au laboratoire d'observer rapidement, d'une manière comparative ces effets sur des hématies prélevées sur CPD selon le procédé classique actuel (hématocrite progressif) ou selon le "procédé MacoPharma" (hématocrite constant) en mimant les conditions de l'appareil.

Mode opératoire : Le protocole expérimental que nous avons suivi est illustré par la figure 70 (p. 134). Dans le cas de l'hématocrite progressif, nous avons ajouté à 3,5 ml de CPD des quantités de sang hépariné croissant de 0,25 à 2,5 ml. Dans le cas du "système MacoPharma" et pour observer un hématocrite constant, nous avons mélangé ensemble et progressivement sur une période de quelques minutes, 12 ml de sang hépariné et 2ml de CPD. Nous avons ensuite, après 16 heures d'incubation à 20°C, appliqué les critères de viabilité décrits plus haut.

TRANSFUSION MATERIEL

ABC AUTOMATE POUR LE PRELEVEMENT DE SANG



Chaque jour, des produits sanguins labiles sont détruits à cause de caillots ou d'un volume de sang prélevé insuffisant, résultant d'une anticoagulation inappropriée.

0,5% à 2,5% des dons de sang sont rejetés pour des problèmes de caillots.
0,2% à 1% des dons de sang sont rejetés à cause d'un volume de prélèvement insuffisant.

PRINCIPE DE L'ABC
MacoPharma ABC[®] est destiné au prélèvement automatique par gravité d'une unité de sang total. L'ajout proportionnel et continu de la solution anticoagulante au cours du prélèvement, maintient un ratio optimal anticoagulant / sang.

Ce concept innovant garantit la préservation des qualités des produits sanguins labiles.

Figure 69 – Schéma de la machine automatique, brevetée sous le nom d'Automate MacoPharma ABC (Automat for Blood Collection) qui permet de prélever le sang à hématocrite constant lié au rapport constant anticoagulant/sang 1/7.

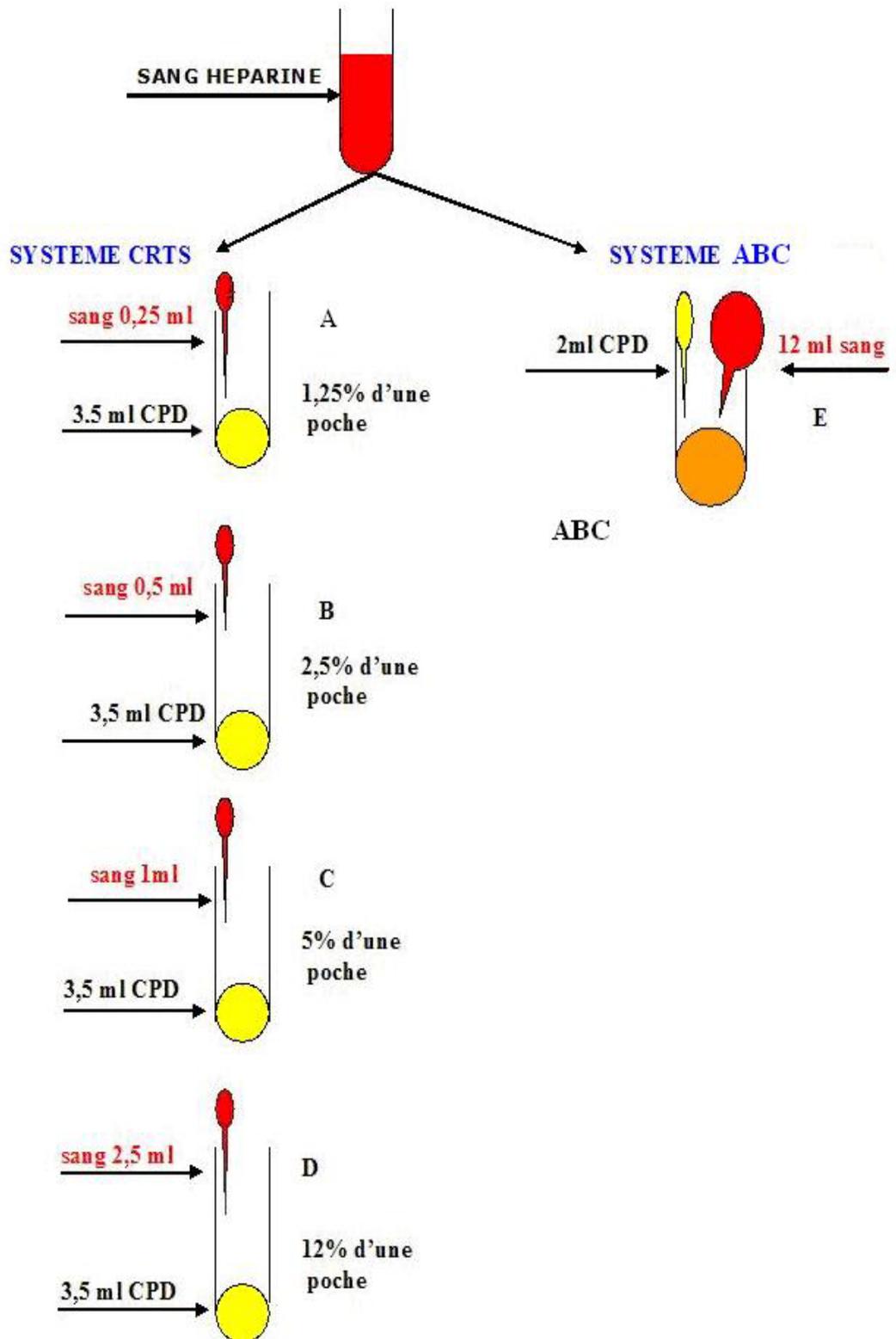


Figure 70 – Simulation à l'échelle du laboratoire d'un prélèvement de sang en milieu CPD selon le procédé classique (Système CRTS) à hématocrite progressif et le procédé « assisté » (Système MacoPharma ABC) à hématocrite constant.

Résultats. Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés par les figures 76 à 78 et peuvent se résumer de la manière suivante:

II.B.1.1. Variations de la morphologie des hématies

II. B.1.1.1. Méthode cytométrique du dot-plot FSC/SSC

Comme le montre le tableau ci-dessous, au terme de 48h de stockage en milieu CPD, les hématies recueillies en observant un hématoците progressif voient leur taille se réduire progressivement (diminution de X Geo Mean) et leur densité s'accroître (augmentation de Y Geo Mean). Ces variations s'amenuisent au fur et à mesure que se manifeste le pouvoir tampon du plasma. Au contraire, les valeurs de X et Y Geo Means ne varient pas chez les hématies recueillies suivant le "procédé MacoPharma".

Tableau X – Variation des valeurs de X-Geo Mean (taille des cellules) et de Y-Geo Mean (densité des cellules) donnés par la cytométrie en flux dans le mode FSC/SSC des hématies recueillies à l'échelle du laboratoire (voir Fig. 70) en milieu CPD à hématoците progressif CPD A à D et hématoците constant (ABC).

Milieux	X Geo Mean	Y Geo Mean
CPD1	174	339
CPD2	205	345
CPD3	231	342
CPD4	294	321
ABC	360	285
Témoin ^(a)	351	290

(a) Hématies fraîches non traitées.

II. B.1.1.2. Microscopie de balayage

L'observation en microscopie électronique de balayage illustre et confirme entièrement les données de la cytométrie. En effet, les figures 71 A à 71 D montrent que même après 5 minutes d'une brève incubation, la proportion de discocytes diminue dans la population d'érythrocytes, principalement dans la population A qui correspond aux premiers volumes de sang projetés dans le milieu CPD et qu'apparaissent des échinocytes et quelques sphéro-échinocytes. La diminution de la taille des cellules est, elle aussi, manifeste. Au contraire, dans le cas du prélèvement à hématoците constant, la morphologie des hématies est pratiquement inchangé (Figure 71 ABC).

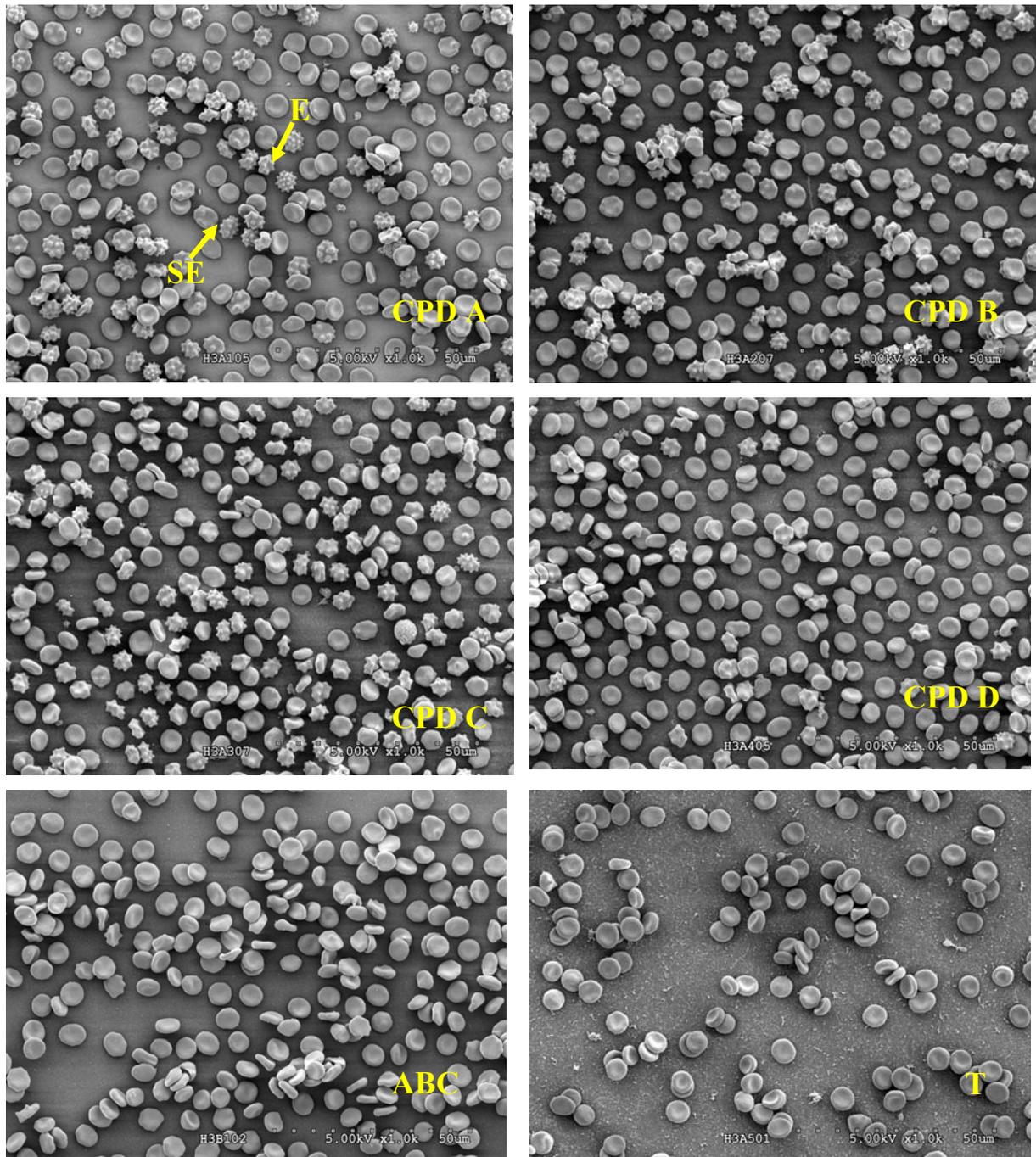


Figure 71 – Microscopie électronique de balayage d'hématies incubées pendant 5 minutes à 20°C dans 3,5 ml de milieu CPD à différents hémocrits obtenus en ajoutant à ce dernier 0,25 (CPD A), 0,50 (CPD B), 1 (CPD C) et 2,5 (CPD D) ml de sang hépariné et en hémocrite constant (Type ABC). T: hématies non traitées. E: échinocyte ; SE : sphéroéchinocytes.

II.B.1.2. Externalisation de la phosphatidylsérine (Test à l'annexine-V-FITC)

L'analyse de la figure 72 ci-dessous montre clairement l'effet néfaste du milieu CPD tant que le pouvoir tampon du milieu ne s'est pas exercé (figure D). Au contraire, recueillies selon le "procédé MacoPharma ABC", le taux d'hématies annexine V-positives est voisin de celui du témoin (T₀).

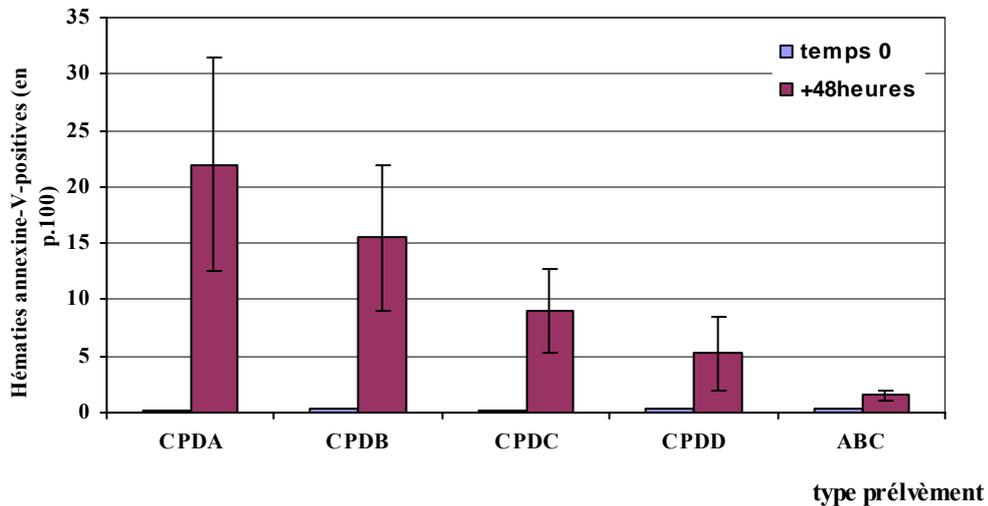


Figure 72 – Résultats de l'analyse par cytofluorimétrie dans le mode FL1 (en abscisses) / FL2 (en ordonnées) de l'externalisation de la phosphatidylsérine révélée par l'annexine-V-FITC. **CPD A-CPD D**: hématies maintenues en milieu CPD pendant 48 h à 20°C en hématocrite progressif (cf. fig. 70) et en hématocrite constant (ABC).

II.B.1.3. Test CD 47 d'antiphagocytose

La figure 78 démontre la fuite du CD47, inhibiteur de la phagocytose, des hématies présentes dans les milieux à hématocrite faible. La situation se rétablit au fur et à mesure que le pouvoir tampon du plasma s'affirme, mais la meilleure performance est, de nouveau, réalisée par les "hématies ABC" dont la valeur de mean de fluorescence est proche (2273) de celle du témoin non-traité (2520).

Conclusions. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus à l'échelle du laboratoire dans l'étude comparée de l'action du milieu CPD sur des hématies prélevées à hématocrite progressif (condition « universelles ») et à hématocrite constant (prélèvement assisté par automate) démontrent sans ambiguïté l'effet bénéfique sur les hématies du prélèvement assisté.

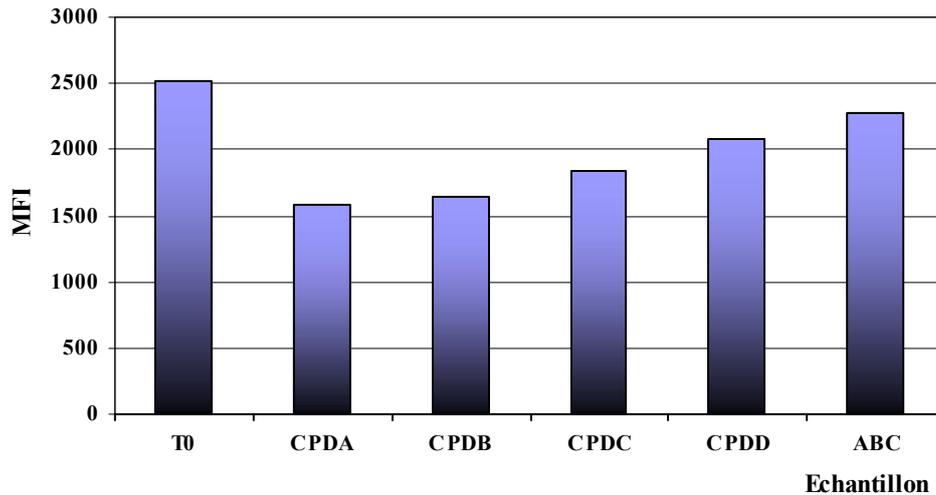


Figure 73 – Analyse cytofluorimétrique d’hématies traitées par un anticorps monoclonal anti-CD47 marqué à la phycoérythrine. Les hématies ont été maintenues pendant 48 heures à 20°C en milieu CPD en hématurie progressif (CPDA à CPDD) et en hématurie constante (ABC). MFI : mean de fluorescence. T₀ : hématies témoins non traitées.

Encore fallait-il confirmer ces résultats en expérimentant sur des prélèvements réalisés « grandeur nature » dans les conditions appliquées réellement dans les centres de transfusion.

II.B.2. Etude comparée de la viabilité d’hématies prélevées en milieu CPD par le "procédé classique" et par "ponction assistée" à l’aide de l’automate ABC, puis conservées en milieu SAGM

Afin d’étudier dans une première série d’expériences, les performances de l’automate ABC, les hématies ont été prélevées en milieu CPD, les unes, par le "procédé classique" et, les autres, à l’aide de l’automate MacoPharma ABC" (prélèvement assisté). Au terme d’une incubation à 20°C pendant 16 heures, elles ont été maintenues à 4°C en milieu SAGM et la série des tests de viabilité que nous avons mis au point au laboratoire leur a été appliquée chaque semaine et pendant 4 semaines. Les résultats n’ont pas été particulièrement démonstratifs en raison de la trop grande dilution par la masse globale des cellules des hématies contenues dans les premiers volumes des prélèvements en milieu CPD car ils sont identiques à ceux que nous avons décrits dans le chapitre II.B.1. (pages 132-138).

Pour cette raison, dans une seconde série d’expériences, il a été décidé d’étudier la destinée des 10 premiers pour cent d’hématies recueillies, les unes, suivant le procédé de "prélèvement classique" à hématurie progressif et, les autres, par le procédé de "prélèvement assisté" à hématurie constante.

II.B.2.1. Techniques de prélèvement

1 – Dans le type de "prélèvement classique", 90 ml de sang (groupe 0⁺) ont été introduits dans 12 ml de CPD. Au terme d'une heure de contact, les hématies ont été recueillies par centrifugation, reprises dans 24 ml de SAGM et stockées à 4⁰C pendant 4 semaines.

2 – Dans le cas du "prélèvement assisté», 40 ml de sang ont été progressivement mélangés à 63 ml de CPD. Les hématies ont ensuite été traitées comme décrit ci-dessus.

La série des tests ci-après a été appliquée hebdomadairement aux deux séries d'hématies pendant 4 semaines. Les résultats que nous avons obtenus ont été les suivants.

II.B.2.2. Résultats

II.B.2.2.1. Variation du pH du milieu de conservation SAGM.

Le tableau XI montre que le "prélèvement assisté" a maintenu le pH du milieu SAGM identique à celui du pH du plasma témoin : 7,26 pour le premier et 7,25 pour le second. Au terme de 4 semaines de stockage, le pH s'est abaissé à 6,56 en raison de la production d'acide lactique au cours du catabolisme en anaérobiose du glucose présent dans le milieu de conservation. Dans le cas du "prélèvement classique", le pH décroît à 6,6 dès la fin du prélèvement et diminue ensuite jusqu'à une valeur de 6,56 au cours du stockage.

Tableau XI – Variation du pH du milieu de conservation (SAGM) des hématies en fonction du procédé de prélèvement en CPD. CRTS: procédé "classique"; ABC : procédé "assisté".

Type de procédé	Jours						
	0 ^(*)	1	2	7	14	21	28
CRTS	6,58	6,5	6,55	6,47	6,32	6,47	6,29
ABC	7,26	7,05	7,21	7,02	6,68	6,74	6,56

^(*) pH du sang témoin hépariné non traité : 7,25

II.B.2.2.2. Variation du pH du cytosol des hématies.

Nous avons appliqué la méthode que nous avons mise au point au laboratoire de détermination du pH intracellulaire par cytofluorimétrie en flux à l'aide du "test BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5, 6 carboxyfluorescéine acétoxyméthyl ester)" (cf. p. 90). Le résultat que nous avons obtenu nous paraît d'une grande importance. En effet, alors que le pH interne des hématies isolées par "prélèvement assisté" se maintient à une valeur de 7,4 au

terme de 4 semaines de stockage, il tombe à une valeur de 6,9 chez les hématies obtenues par "prélèvement classique".

II.B.2.3. Etude de l'hémolyse

Nous avons étudié l'hémolyse des deux types d'hématies en mesurant les variations de l'absorbance à 412 nm (bande de Soret) au cours du stockage. Les résultats rapportés illustrés par la figure 74 montrent que l'hémolyse est plus importante dans le cas des hématies obtenues par "prélèvement classique" et qu'elle s'intensifie avec le temps, tandis qu'elle se stabilise à partir de la 2^{ème} semaine chez les hématies obtenues par "prélèvement assisté". Elle reste toutefois discrète et demeure à l'intérieur des normes européennes.

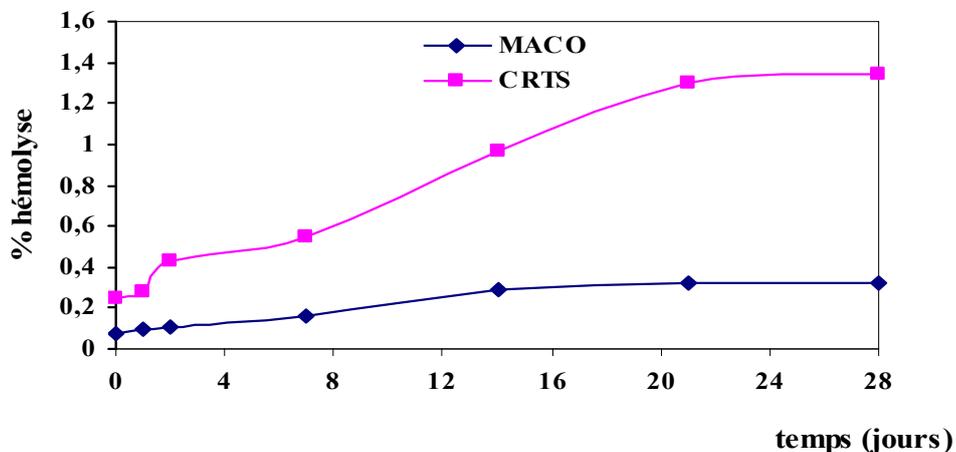


Figure 74 – Evolution du taux d'hémolyse des hématies en milieu SAGM en fonction du type de prélèvement dans le milieu CPD et de temps de conservation dans le milieu SAGM. CRTS : prélèvement classique ; Maco : prélèvement assisté par l'automate ABC.

II.B.2.4. Etude de la viabilité des hématies par le test de la calcéine-AM

Comme le montre la figure 75 de page suivante, le test de la calcéine-AM révèle que la viabilité des hématies est fortement altérée dans le cas de l'application du "procédé classique" de prélèvement en CPD. En effet, au terme de 2 et 4 semaines de conservation en milieu SAGM, 91 et 90,9% des hématies prélevées par le "procédé assisté" sont restées viables sur les 95% au départ. Au contraire, 53,8% seulement des hématies obtenues par le "prélèvement classique" sont restées viables au bout de 2 semaines. En outre, au terme de 4 semaines de stockage, 15% de ces dernières sont mortes, contre 6,7% dans le cas des hématies obtenues par "prélèvement assisté". D'autre part, l'examen des courbes de tendance (Fig. 76) montre que la diminution de la viabilité est plus importante dans le cas des hématies prélevées par le procédé classique (hématocrite progressif).

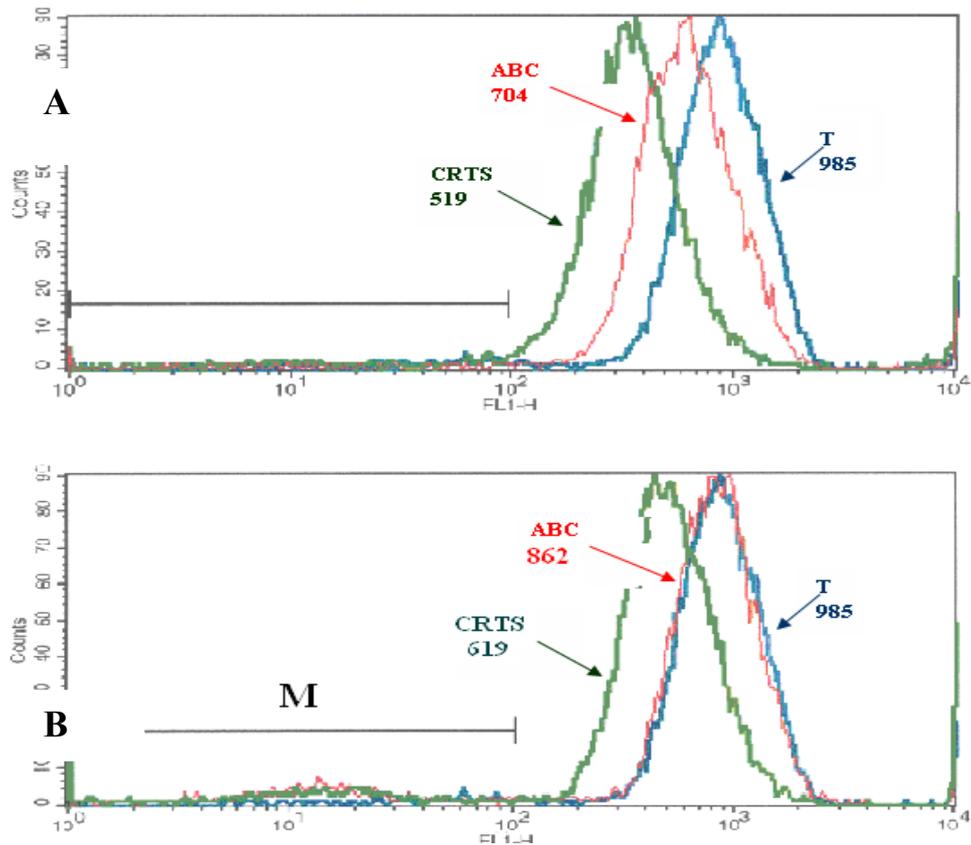


Figure 75 – Etude de la viabilité (test cytofluorimétrique à la calcéine-AM) d'hématies conservées en milieu SAGM pendant 2 (A) et 4 (B) semaines et prélevées en milieu CPD selon le procédé "classique" (courbes CRTS) ou "assisté" (courbes ABC). T: hématies témoins. %: pourcentage de cellules viables. La zone M correspond aux hématies mortes. Les nombres représentent les MFI (mean fluorescence intensity).

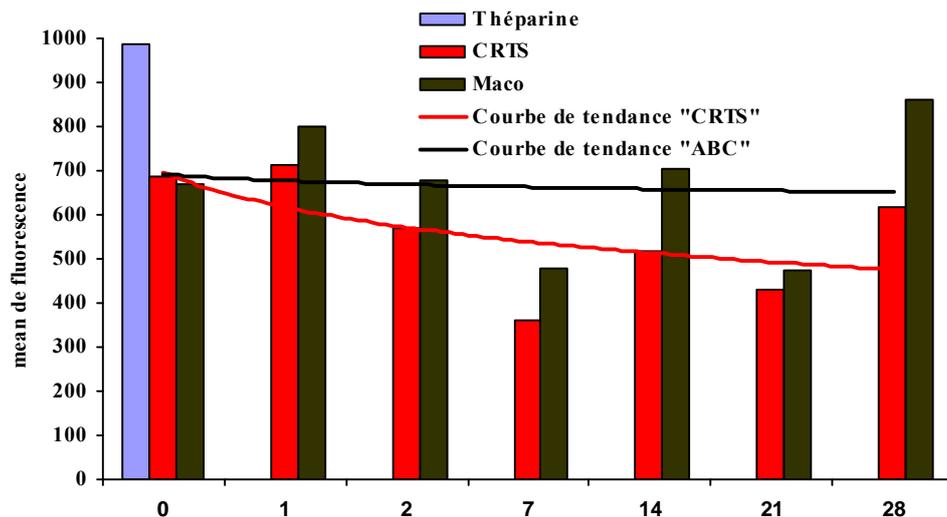


Figure 76 – Etude comparatif de la diminution de la viabilité des hématies conservées en milieu SAGM pendant 4 semaines et prélevées en milieu CPD selon le procédé "classique" (courbes CRTS) ou "assisté" (courbes ABC).

II.B.2.5. Mesure de l'externalisation de l phosphatidylsérine

L'application du test « Annexine-V-FITC », montre que, au terme de 4 semaines de stockage, le pourcentage d'hématies annexine-V-positives est moins important chez les hématies prélevées avec l'automate ABC : 3,52% versus 5,81%.

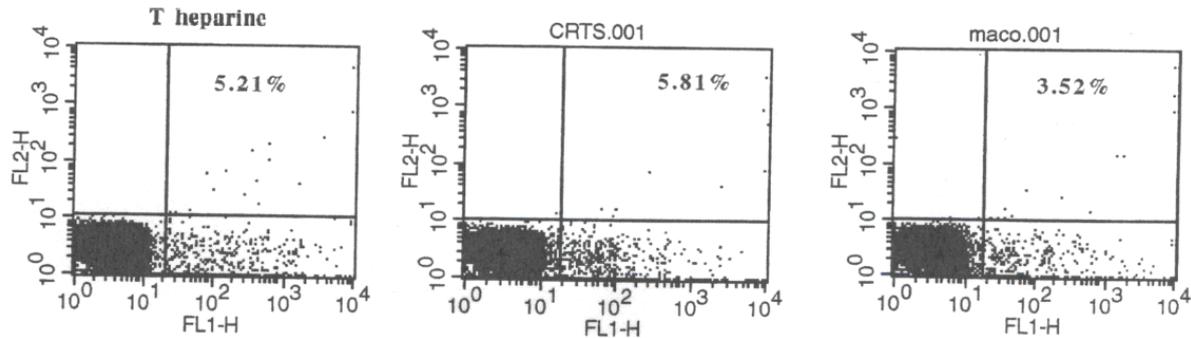


Figure 77 – Cytofluorimétrie dans le mode FL1 / FL2 d'hématies traitées par l'annexine V-FITC, prélevées en milieu CPD par le procédé "classique" (CRTS) ou "assisté" (ABC) et conservées en milieu SAGM 4 semaines. Cadran inférieur gauche: hématies annexine V-négatives. Cadran inférieur droit: hématies annexine-V-positives. %: pourcentage d'hématies annexine-V-positives. Nombre de cellules analysées: 10.000.

II.B.2.6. Mesure de la désialylation des hématies

L'application du « test lectines » utilisant la WGA (*Wheat germ agglutinin*) spécifique des acides sialiques et la RCA (*Ricinus communis agglutinin*) spécifique des résidus β -galactosyl terminaux montre (tableau XII ci-dessous) qu'il n'existe pas de différences entre les deux famille d'hématies et que, en toute état de cause, la désialylation reste, dans les 2 cas modérée.

Tableau XII – Nombre de sites de fixation ($\pm 10\%$) des lectines WGA et RCA portés par les hématies conservées pendant 2 semaines en milieu SAGM et selon le mode de prélèvement en milieu CPD: procédé "classique" (hématies CRTS) ou procédé "assisté" (hématies ABC)

Nature de la lectine	Nombre de sites de fixation	
	Hématies CRTS	Hématies ABC
WGA	11.300	14.600
RCA	35.000	33.700

II.B.2.7. Etude de la capture et de la phagocytose *in vitro* des hématies

La figure 78 montre clairement que, au terme de 2 semaines de conservation, le nombre d'hématies capturées, prélude à leur phagocytose, est nettement plus important dans le cas des hématies préparées par "prélèvement classique" (Fig. D) que dans celui des hématies préparées par "prélèvement assisté" (C). Il n'est donc pas étonnant, comme le montre la figure 79, que la phagocytose des premières soit plus importante que celle des secondes.

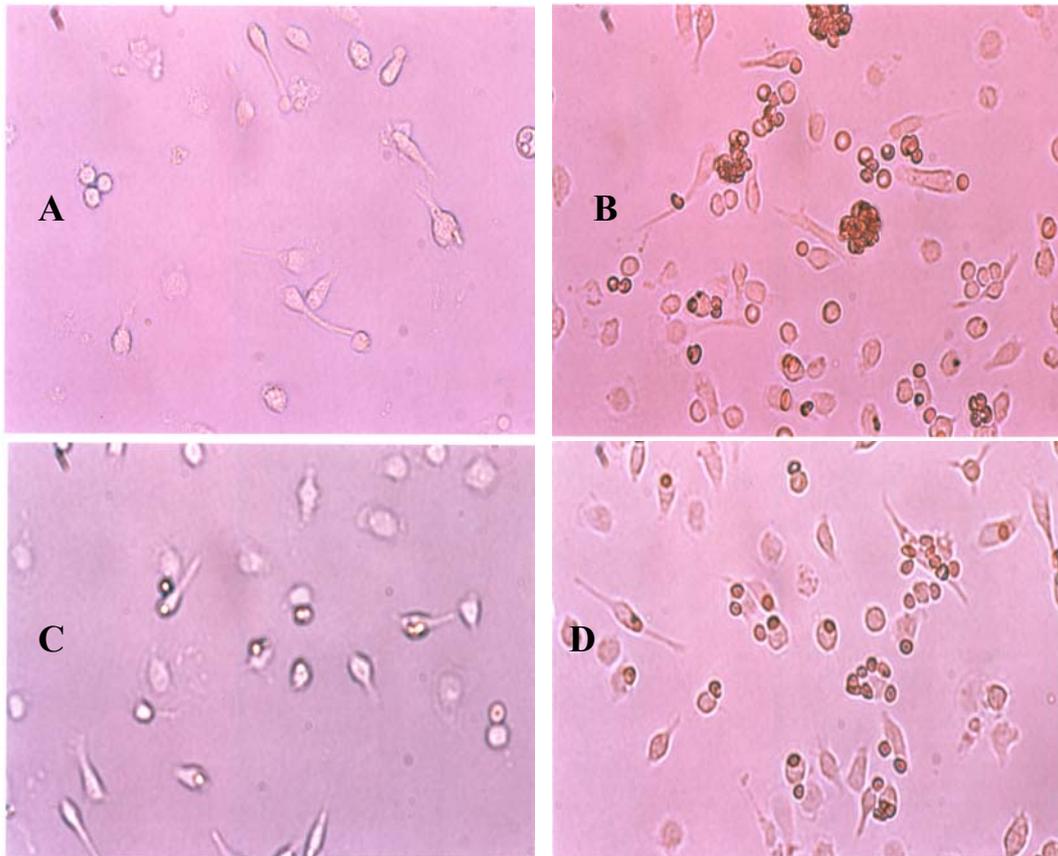


Figure 78 – Observation microscopique de la capture des hématies par des macrophages péritonéaux de souris réalisée dans les conditions décrites à la page 88. **A**: Macrophages seuls. **B**: Capture des hématies désialylées *in vitro* par une neuraminidase de *Vibrio cholerae* et utilisées comme témoins. **C** et **D**: Capture des hématies prélevées en milieu CPD par le procédé "assisté" (C) ou "classique" (D), puis conservées pendant 2 semaines en milieu SAGM.

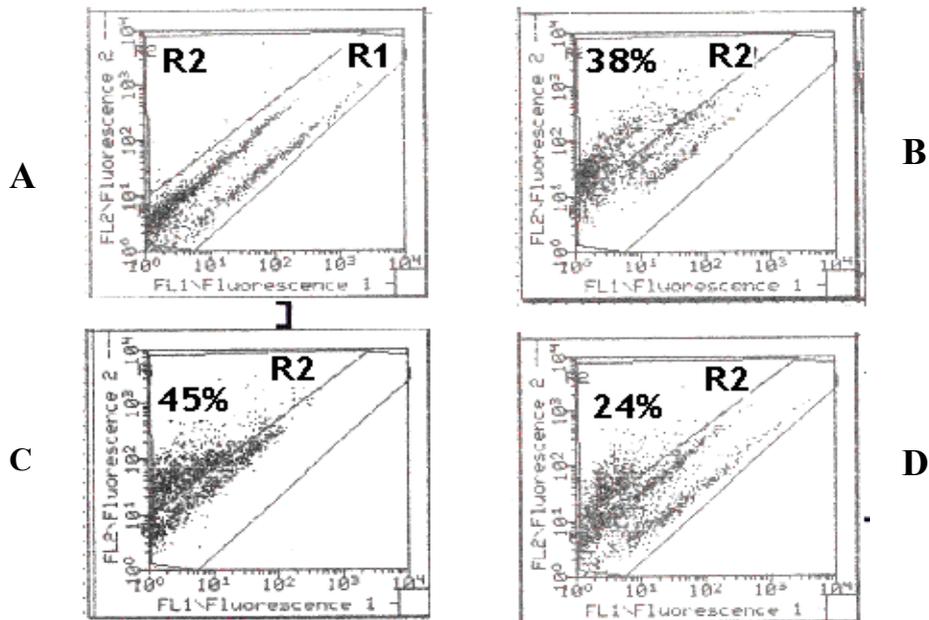


Figure 79 – Analyse en "dot-plot" dans le mode FL1 /FL2 de la phagocytose par des macrophages spléniques de souris d'hématies marquées par le fluorochrome PKH-26 (voir les détails techniques à la page 88) **A**: Macrophages seuls. **B**, **C** et **D**: Macrophages incubées en présence d'hématies désialylées *in vitro* par une neuraminidase de *Vibrio cholerae* (**B**) et d'hématies conservées pendant 2 semaines en milieu SAGM et préalablement prélevées en milieu CPD par le procédé "classique" (**C**) ou par le procédé "assisté" ABC (**D**). **R1**: Région des macrophages natifs. **R2**: Région des macrophages phagocytiques. % : pourcentages de macrophages phagocytiques. Ces résultats concernent une expérience significative choisie parmi trois manipulations effectuées.

Commentaire. Il convient de souligner à ce stade que les derniers résultats que nous avons présentés n'ont rien d'orthodoxes. En effet, ainsi que nous l'avons déjà souligné antérieurement, le dogme actuel concernant les mécanismes moléculaires de l'érythrophagocytose repose sur les modifications suivantes que subissent les membranes des cellules en apoptose et qui sont marquées par les étapes suivantes:

- 1 – Désialylation qui provoque la capture des cellules par une galactosectine membranaire des macrophages
- 2 – Externalisation de la phosphatidylsérine qui marque le signal de la phagocytose
- 3 – Disparition, de la membrane des hématies, d'un marqueur d'antiphagocytose ("don't eat me"), le CD 47.

Or, comme le montrent les résultats que nous avons obtenus, nous n'avons observé chez les hématies phagocytées, ni désialylation (test des lectines; p. 75), ni externalisation de la phosphatidylsérine (test de l'annexine V; p. 74), ni perte de CD 47 test à l'anticorps anti-CD 47 marqué à la phycoérythrine. La solution de cette énigme est venue de l'étude des

profondes modifications morphologiques que connaissent les hématies au cours de leur vieillissement, qu'il soit physiologique ou induit et que nous avons décrites aux pages 71 et 98. Rappelons simplement que leur taille diminue progressivement par l'émission de vésicules et que leur densité augmente. En outre, leur morphologie se modifie car elles passent progressivement de la forme discoïdale à des formes sphéroïdales de plus en plus déformées par des protubérances (échinocytes I, II et III), puis au stade de sphéroéchinocytes, hérissés de spicules, et enfin à celui de sphérocytes lisses, au stade terminal (smooth sphéro-échinocytes) (Fig. 21, p. 47). Seules ces deux dernières formes sont phagocytées.

Ces modifications morphologiques peuvent être révélées soit par cytométrie en flux, soit par microscopie électronique de balayage, techniques que nous avons appliquées aux deux catégories d'hématies.

II.B.2.8. Modifications morphologiques des hématies

II.B.1.8.1. Analyse par cytométrie en flux dans le système dot-plot FSC (variation de la taille des cellules) / SSC (variation de la densité des cellules).

Les cytogrammes tridimensionnels présentés dans la figure 80 et que nous avons effectués sur les deux lots d'hématies sont très démonstratifs des lésions profondes que connaissent dès le début du prélèvement les hématies prélevées suivant la méthode classique et qui se manifestent sur les cytogrammes par la disparition immédiate du « pic 1 » des sphérocytes. Au contraire, la forme discoïdale des hématies est maintenue au moins pendant 2 semaines dans le cas du « prélèvement assisté » par l'automate ABC.

II.B.1.8.2. Observation en microscopie électronique de balayage

Ces résultats ont été confirmés sans ambiguïté par les images obtenues en microscopie électronique de balayage au terme de 2 semaines de conservation en milieu SAGM. En effet, la figure 81 montre que peu de discocytes subsistent parmi les hématies isolées par le "prélèvement classique" et que les formes échinocytaires et sphéro-échinocytaires lisses et à spicules prédominent. Au contraire, ces deux dernières formes sont rares dans le cas des hématies isolées par le "procédé assisté" et qui ont, pour la plupart, gardé leur forme discocytaire.

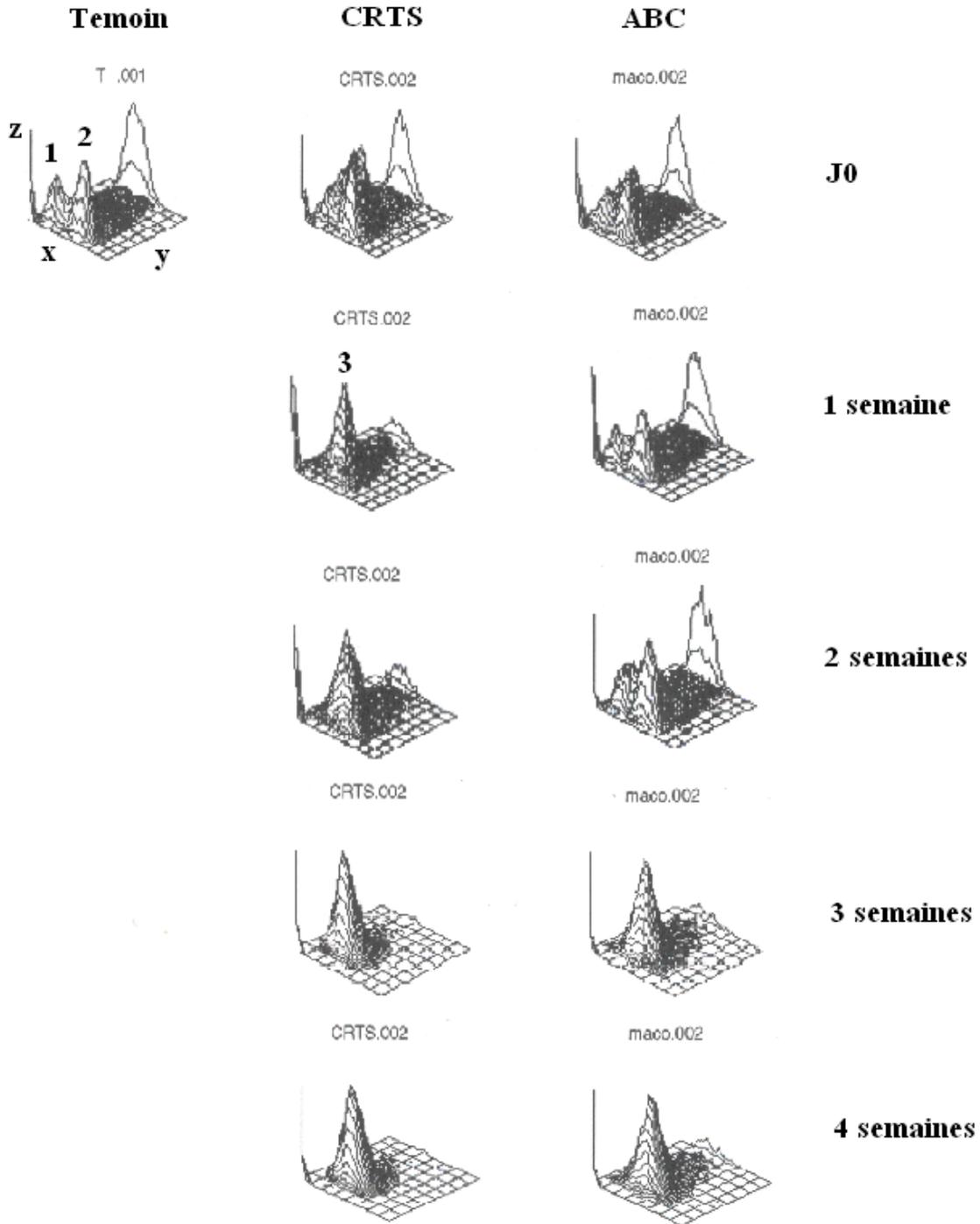


Figure 80 – Cytogrammes tridimensionnels dans le mode FSC (x) / SSC (y) des hématies conservées pendant des temps variables en milieu SAGM et suivant le type de prélèvement en milieu CPD (CRTS: méthode "classique"; ABC : prélèvement "assisté" par l'automate ABC). z: nombre de cellules. La forme et l'emplacement des pics par rapport à l'axe des abscisses varient selon que les hématies sont discocytaires (pics 1 et 2) ou échinocytaires (pic 3). Dans le cas des discocytes, leur emplacement varie suivant que le faisceau laser les "voit" de profil (pic 1) ou de face (pic 2). Nombre des cellules analysées: 10.000. Témoin : hématies non traitées recueillies sur héparine. J₀ : hématies recueillies dès la fin du prélèvement en CPD.

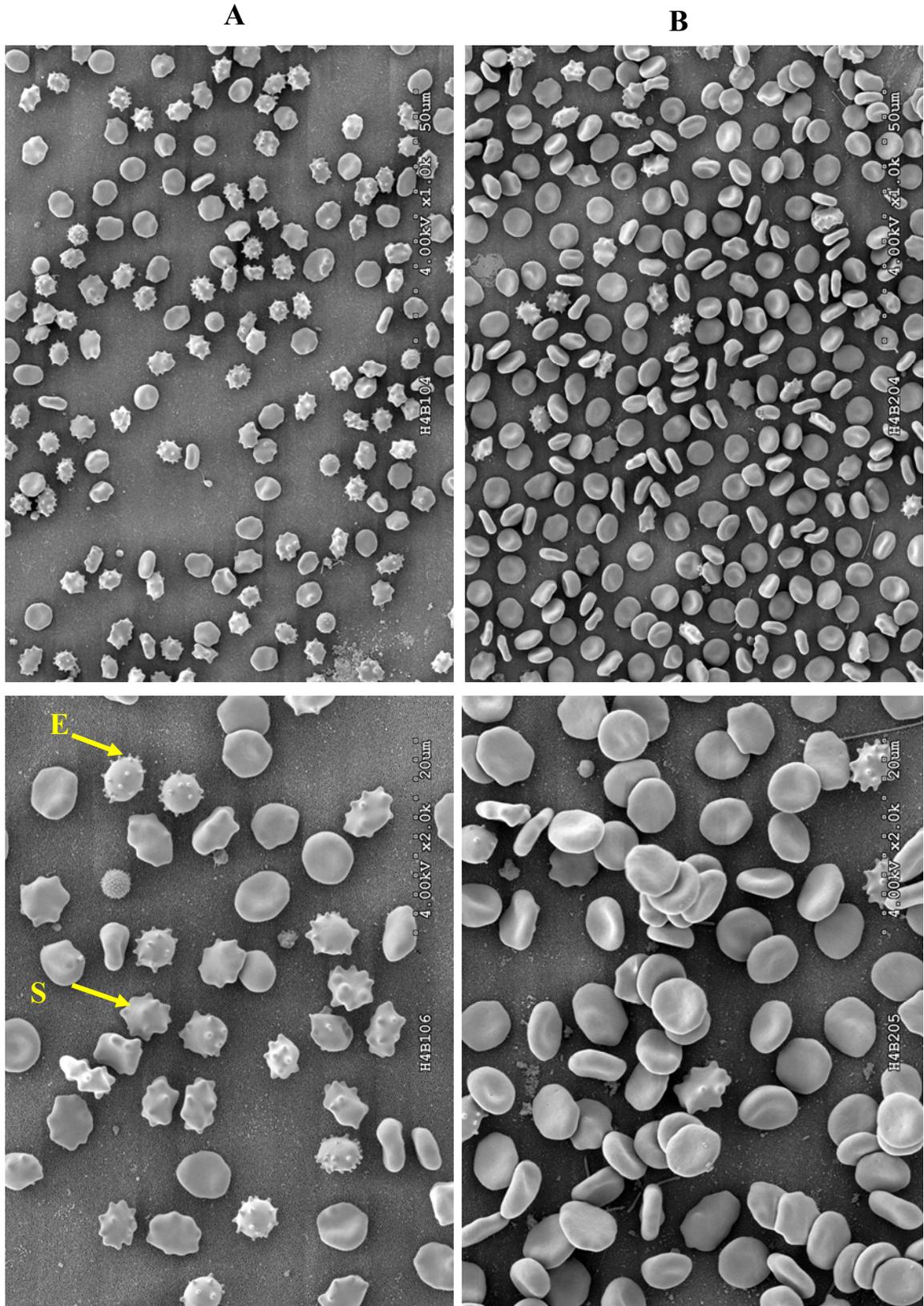


Figure 81 – Images de microscopie électronique de balayage des hématies conservées pendant 3 semaines en milieu SAGM, après prélèvement en milieu CPD selon la méthode « classique » (A) ou « assistée » (B). E : échinocytes ; S : sphéroéchinocytes avec spicules.

Le tableau XIII ci-dessous obtenu par comptage des différentes formes d'hématies effectués sur les photographies parachève cette démonstration.

Tableau XIII – Répartition des différents types d'hématies au terme de 2 semaines de conservation en milieu SAGM et suivant le mode de prélèvement en milieu CPD.

Types d'érythrocytes	Mode de prélèvement en milieu CPD	
	CRTS	Maco
Discocytes	5%	88-89%
Echinocytes	85%	10%
Sphérocytes	10%	1-2%

II.B.3. L'addition de glucose dans des milieux de conservation est-elle nécessaire ?

II.B.3.1. Introduction

A plusieurs reprises, au cours de l'exposé de nos résultats, l'occasion nous a été offerte de conclure que les marqueurs classiques de l'érythrophagocytose sont pris en défaut, en particulier, le dogme de la désialylation, marqueur de la capture des cellules et l'externalisation de la phosphatidylsérine, marqueur de leur phagocytose. Dans ces conditions, la question s'est posée de savoir dans quelle direction orienter nos recherches pour identifier les véritables marqueurs de l'érythrophagocytose.

Sur la base de résultats obtenu par différents auteurs, en particulier par Vlassara *et al.*, 1987 et Andes *et al.*, 1999 antérieurement cités (cf. p. 130), nous avons avancé l'hypothèse que les symptômes de vieillissement et de pré-apoptose des hématies conservées en milieu SAGM que nous avons observés résultaient de la glycation des protéines membranaires érythrocytaires et nous avons posé, en conséquence, la question de savoir si l'addition de glucose dans les milieux de prélèvement et de conservation des hématies – à une concentration qui est 10 fois celle du glucose sanguin – était indispensable.

Pour y répondre, nous avons réalisé les expérimentations décrites ci-dessous.

II.B.3.2. Mode opératoire

Biomatériel. Les hématies ont été prélevées en milieu CPD dans les conditions classiques et, après 16 heures de stockage à 20⁰C, elles ont été introduites, après déleucocytation, dans des poches contenant des milieux SAGM à teneur variable en glucose conformément au tableau XVI de la page suivante.

Tableau XIV – Composition des milieux expérimentaux de prélèvement et de stockage à 4°C pendant 6 semaines

	1	Poches	
		2	3
Solution anticoagulante	CPD	CPD	CPD
Solution de conservation	SAM ^(a)	SAG ₃ M	SAG ₉ M ^(*)

(a) : Milieu SAGM sans glucose ; (b) : milieux glucosés contenant, respectivement, 3 (G₃) et 9 (G₉) grammes de glucose par litre de milieu.

Chaque semaine et pendant 6 semaines, les critères de viabilité antérieurement décrits ont été appliqués et les résultats que nous avons obtenus se résument de la manière suivante :

II.B.3.3. Résultats

II.B.3.3.1. Test « lectines » de désialylation Au terme de 6 semaines de stockage, nous n'avons pas observé de désialylation significative au niveau des acides sialiques liés sur le galactose aussi bien en α -2,3 (lectine de *Maackia amurensis* : MAA) (Fig. 82A) qu'en α -2,6 (lectine de *Sambucus nigra* : SNA) (Fig. 82B). Nous pouvons donc, de manière indirecte, conclure à l'absence de résidus de β -galactose terminaux marqueurs de capture.

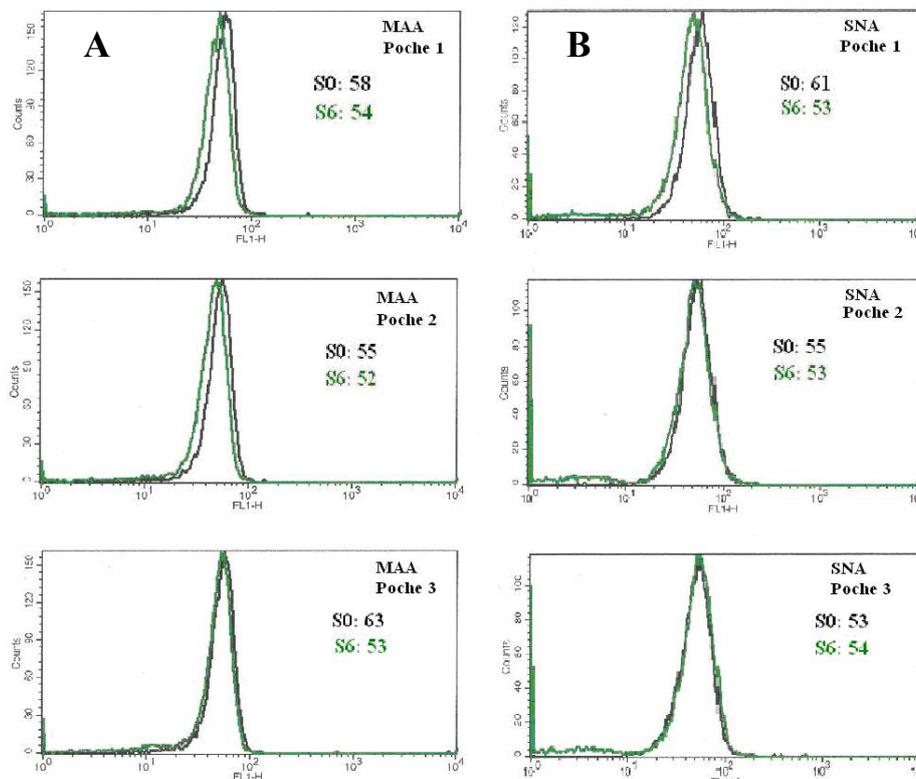


Figure 82 – Analyse par cytofluorimétrie des hématies marquées par des lectines-FITC après 6 semaines (S6) de stockage des poches 1, 2 et 3. S0 : jour du prélèvement. MAA et SNA : lectines spécifiques des acides sialiques liés, respectivement, en α -2,3 et en α -2,6 des résidus de galactose subterminaux. **A** : lectine de *Maackia amurensis* (MAA) ; **B** : lectine de *Sambucus nigra* (SNA).

II.B.3.3.2. Test « annexine-V » d'externalisation de la phosphatidylsérine. La figure 83 montre qu'une faible proportion d'hématies externalisent la phosphatidylsérine, marqueur de phagocytose quel que soit le milieu. Il convient, à cet égard, de noter que ce taux atteint 80-90% quand l'apoptose des hématies est expérimentalement induite par les ions Ca^{2+} (Bratosin *et al.*, 2002). D'autre part, l'externalisation de la phosphatidylsérine est un phénomène réversible, ce qui explique la diminution du taux d'externalisation au-delà de 5 semaines de stockage.

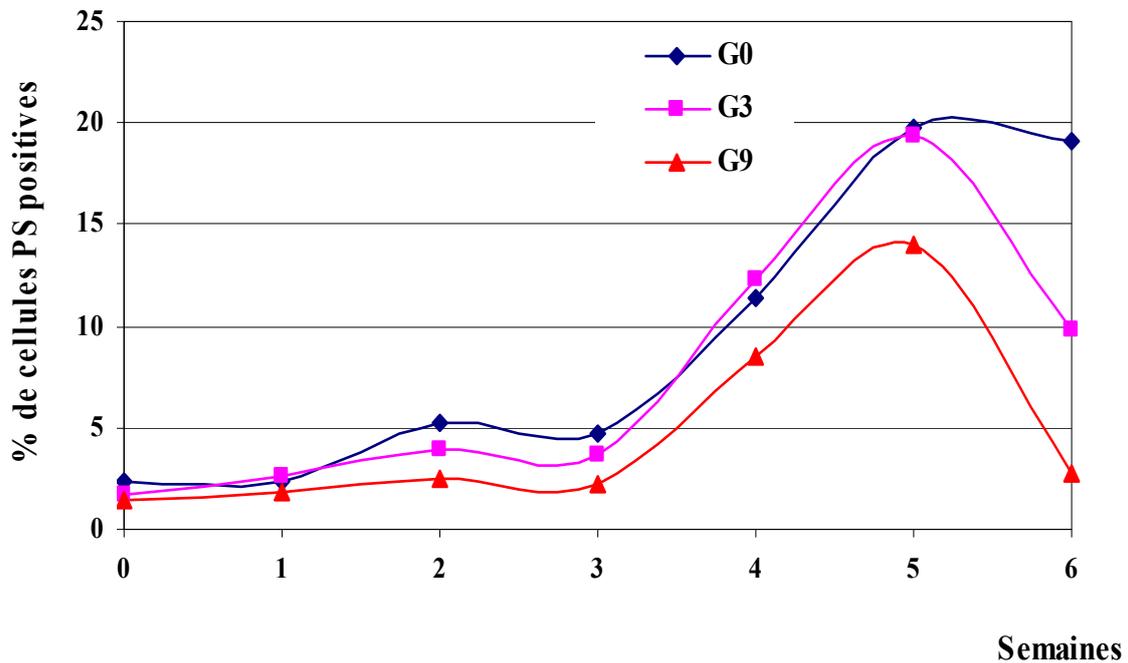


Figure 83 – Analyse par cytofluorimétrie en flux de l'externalisation de la phosphatidylsérine membranaire au cours du stockage des hématies. G₀: milieu sans glucose; G₃ et G₉: SAGM contenant 3 et 9 grammes de glucose par litre, respectivement.

II.B.3.3.3. Test « calcéine-AM » de viabilité. L'application du test de viabilité à la calcéine-AM montre (Figure 84) que les hématies, quel que soit le milieu, accusent, après 6 semaines de stockage, une perte de leur activité estérasique, mais demeurent néanmoins dans la zone des cellules viables.

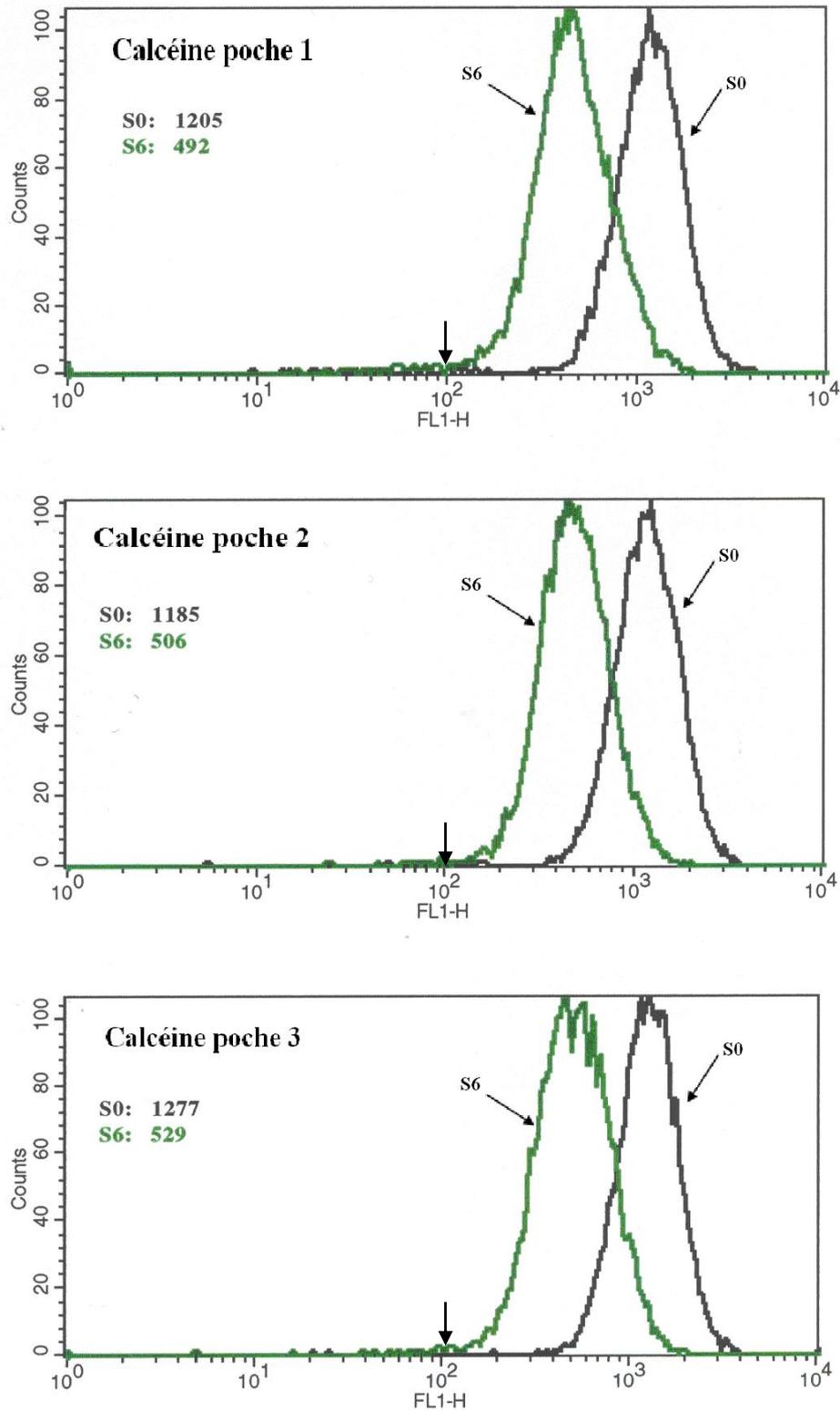


Figure 84 – Critère de viabilité (Test calcéine-AM) des hématies conservées pendant 6 semaines (S6) dans les poches 1, 2 et 3. S₀ : poche témoin du jour du prélèvement. La flèche indique la ligne de partage entre cellules viables et cellules mortes. En abscisses : intensité de fluorescence dans le mode FL1 ; en ordonnées : nombre relatif de cellules.

II.B.3.3.4. Détermination de l'hémolyse. Les courbes de la figure 85 montrent que, hormis dans les poches sans glucose, l'hémolyse reste négligeable (inférieure à 1,5%) au terme de 4 semaines de stockage et ne montre pas de différence significative entre les poches à 3 et 9 grammes de glucose par litre de milieu SAGM.

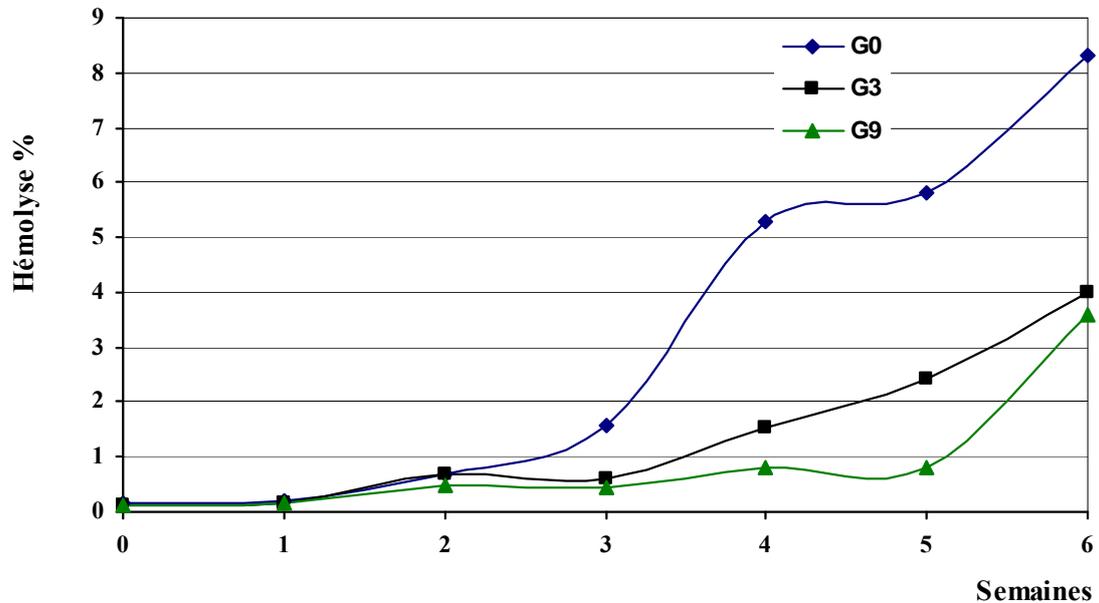


Figure 85 – Détermination du taux d'hémolyse dans les poches G₀, G₃ et G₉ de milieu SA(G)M contenant 0, 3 et 9 grammes de glucose, respectivement .

II.B.3.3.5. Dosage de l'ATP. Comme on pouvait le prévoir, les hématies pour lesquelles le glucose est la seule source d'énergie *via* la chaîne de la glycolyse (cf. p. 26) régénératrice d'ATP, la teneur en ce dernier varie avec la concentration en glucose du milieu de conservation (Fig. 86) et les résultats que nous avons obtenus suivent une suite logique : effondrement immédiat dans les poches sans glucose ; diminution de 50% après 5 à 6 semaines de stockage en milieu SAGM classique ; teneurs identiques pendant 2 semaines en milieux à 3 et à 9% de glucose, puis diminution importante (environ 75%) dans les poches à 3% de glucose dès la 3^{ème} semaine pour atteindre, à la 5^{ème} semaine, le niveau des poches sans glucose.

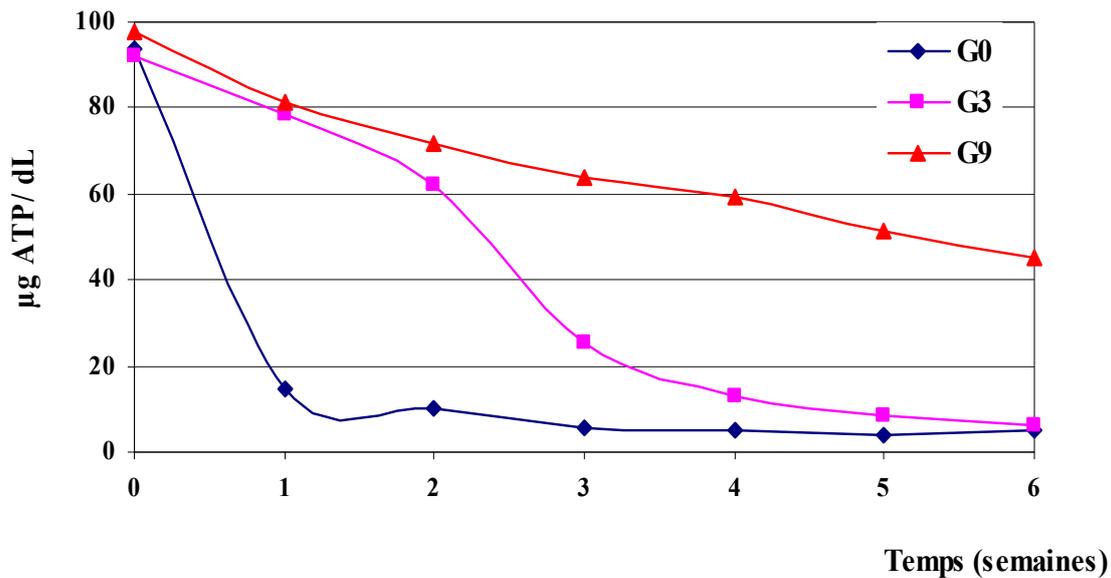


Figure 86 – Variation de la teneur en ATP au cours de stockage des hématies dans les poches G₀, G₃ et G₉ de milieu SA(G)M contenant 0, 3 et 9 grammes de glucose, respectivement

II.B.3.3.6. Variations morphologiques des hématies Comme nous l'avons démontré antérieurement, les critères incontournables et annonciateurs de la phagocytose sont les critères morphologiques qui reposent sur la cytométrie en flux (méthode du « dot-plot ») et, plus encore, sur la microscopie électronique de balayage.

Analyse « dot-plots » par cytométrie en flux.

Les histogrammes tridimensionnels fournis par l'analyse des populations d'hématies par cytométrie en flux dans le mode FSC/SSC, est révélatrice des modifications morphologiques que subissent les hématies au cours de leur stockage. Ils montrent, en effet,

- que « le profil à 2 pics » disparaît dès la première semaine de stockage des hématies en milieu non-glucosé témoignant de modifications profondes avec, en particulier, disparition des formes discocytaires ;
- qu'il se maintient pendant 4 semaines en milieu SAGM classique pour disparaître complètement au terme de 5 semaines de stockage dans les milieux à 3 et 9g de glucose par litre.

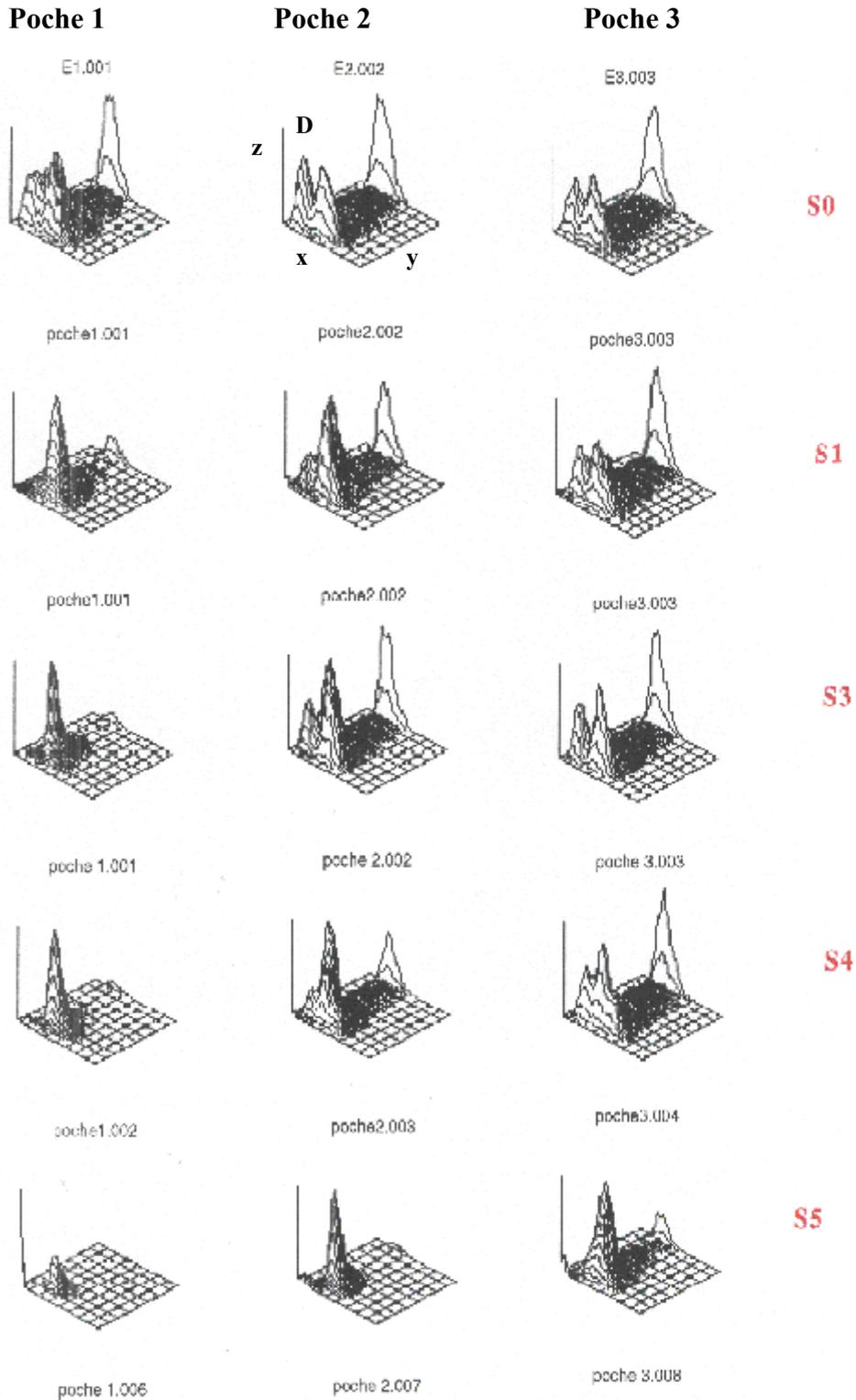


Figure 87 – Représentation tridimensionnelle des histogrammes obtenus par cytométrie en flux des hématies dans le mode FSC/SSC (« dot-plot ») au cours de 5 semaines de conservation (S0 : témoin du premier jour en milieu non-glucosé (Poche 1) et glucosé à 3% par litre (Poche 2) et 9% (Poche 3) par litre de milieu de conservation. x : taille des hématies ; y : densité des hématies ; z : nombre relatif de cellules ; D : zone des discocytes.

Microscopie électronique de balayage

La microscopie électronique de balayage confirme et précise les données de la « cytométrie dot-plot ». En effet, comme la montre la figure 88 :

- dès après 5 jours de stockage et quelle que soit la concentration du milieu en glucose, les hématies sont malmenées et une proportion importante d'échinocytes apparaissent ;
- cette proportion s'amplifie après 10 sjours de stockage (Fig. 89) et les premiers sphéroéchinocytes se montrent dans le milieu sans glucose, les milieux à 3 et 9g de glucose par litre conservant encore des discocytes ;
- enfin, comme le montre la figure 90, au terme de 5 semaines de stockage, la poche sans glucose et la poche à 3g de glucose par litre ne contiennent pratiquement plus que des sphéroéchinocytes, tandis que le milieu SAGM classique contient encore à coté de sphéroéchinocytes, des nombreux échinocytes et quelques rares formes discoïdales très malmenées.

II.B.3.4. Conclusion

La conclusion que nous pouvons tirer de cette étude est que l'addition de glucose dans les solutions de conservation des hématies à la concentration élevée de 9g par litre de milieu est indispensable à la survie des hématies. Toutefois, nous avons observé que les critères de viabilité de ces cellules sont respectés pour une concentration réduite à 3g par litre, mais pour une durée de stockage n'excédant pas 3 semaines. En effet, dans de telles conditions, on constate que le taux d'hémolyse n'est que de l'ordre de 1,5 p. cent, que la teneur en ATP est encore acceptable (25 μ g p. dl) et que l'observation de la morphologie des hématies montre l'absence de formes sphérocytaires phagocytibles. Il n'en reste pas moins qu'on ne peut concevoir la mise en œuvre de poches à concentration réduite dont la conservation ne pourrait excéder 3 semaines. En outre, il manque dans notre expérimentation l'étude de la clairance *in vivo* des hématies conservées dans de telles conditions.

L'addition du glucose dans les solutions de stockage des hématies est donc d'une absolue nécessité même si elle entraîne la glycation des cellules et, par voie de conséquence, leur clairance post-transfusionnelle.

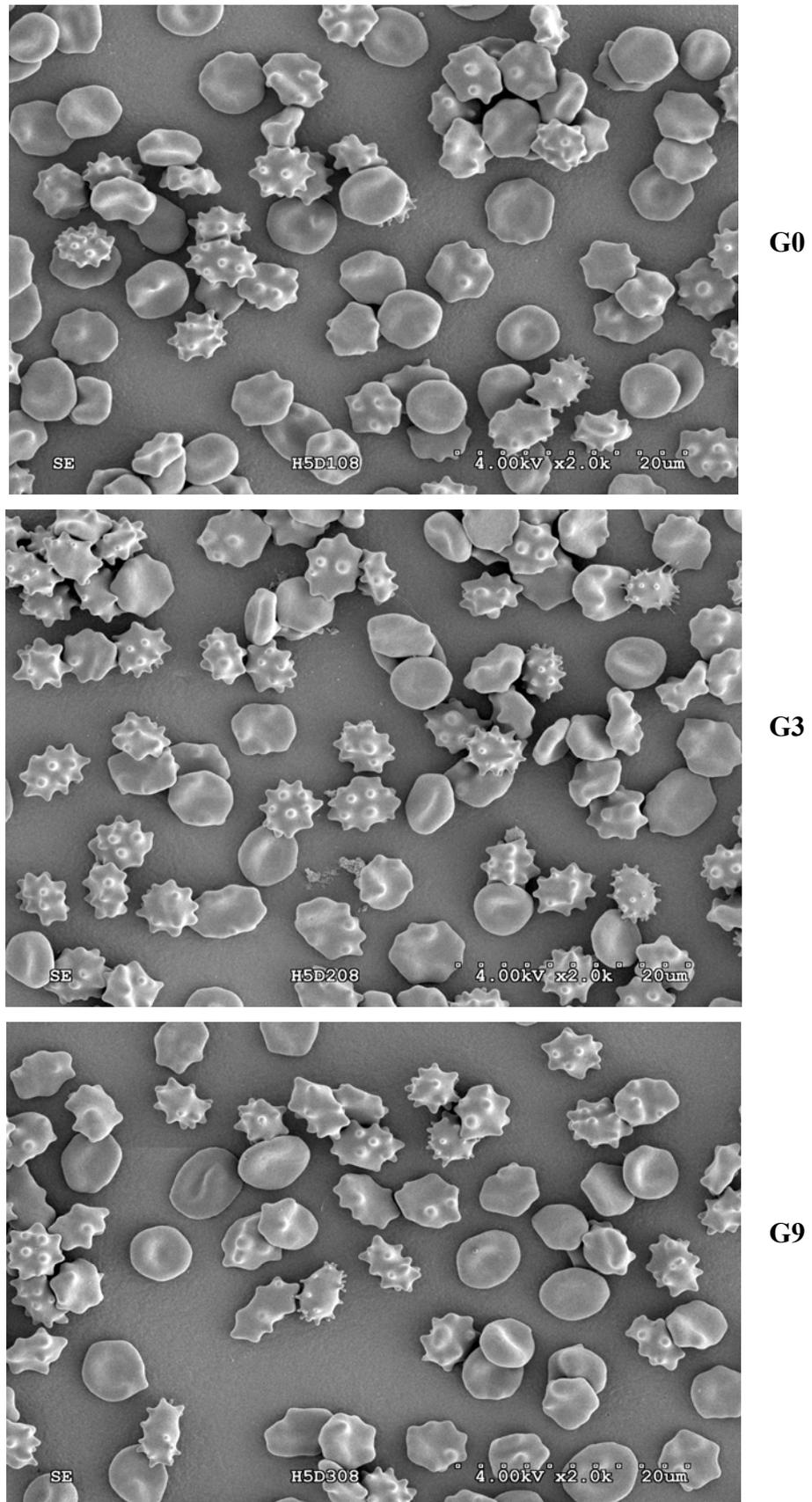


Figure 88 – Microscopie de balayage des hématies conservées en milieu non-glucosé (G₀) et en milieu SAGM à 3g (G₃) et à 9g (G₉) de glucose par litre pendant 5 jours.

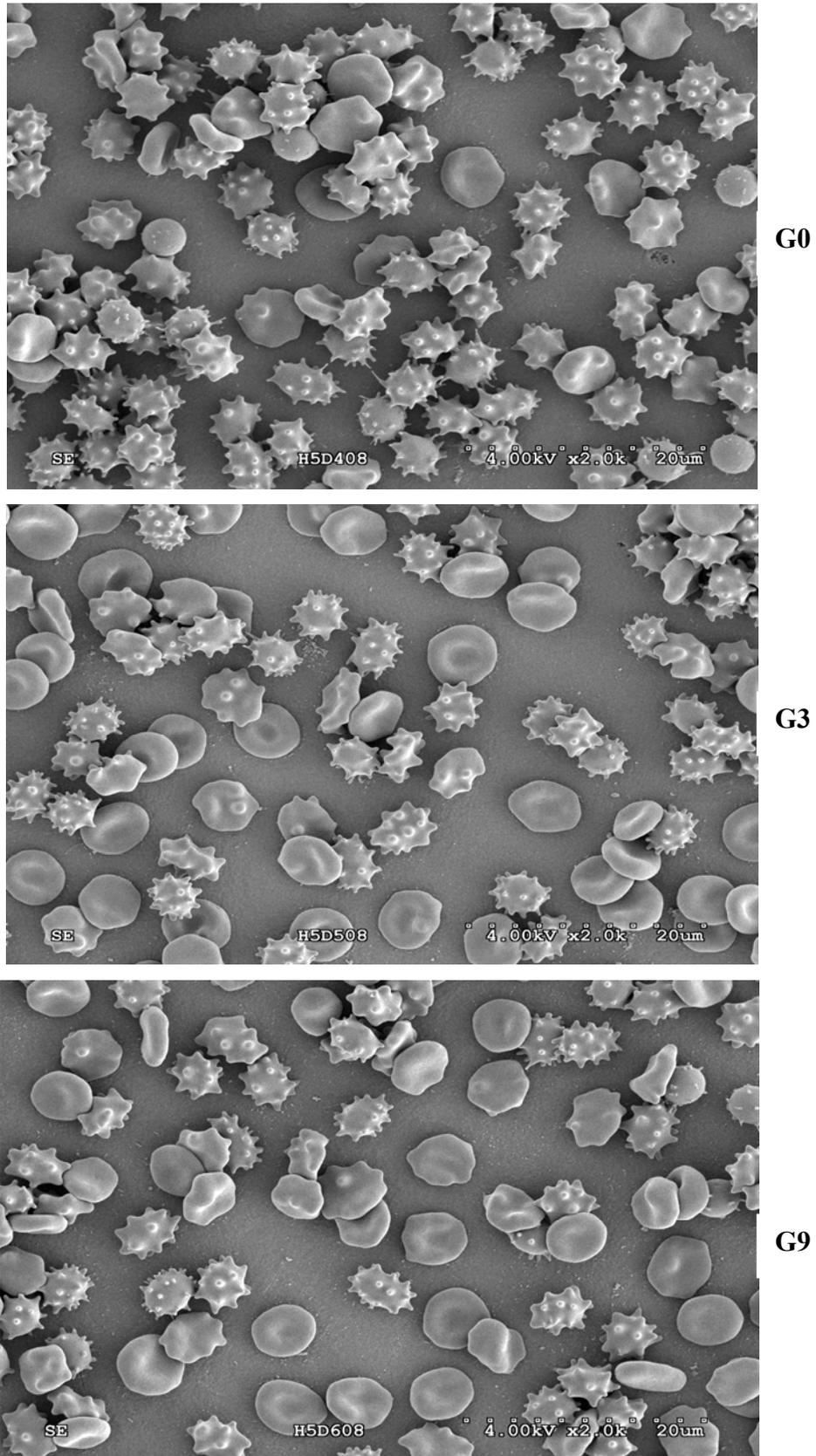


Figure 89 – Microscopie de balayage des hématies conservées en milieu non-glucosé (G_0) et en milieu SAGM à 3g (G_3) et à 9g (G_9) de glucose par litre pendant 10 jours.

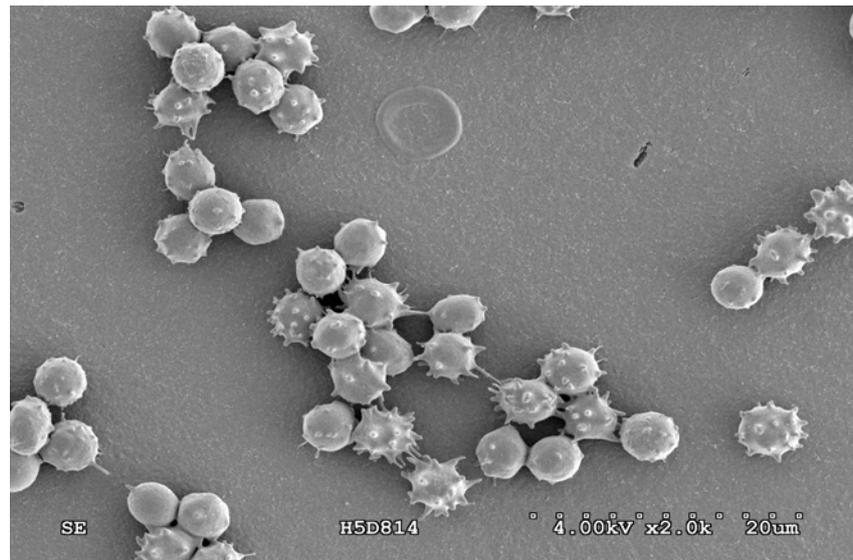
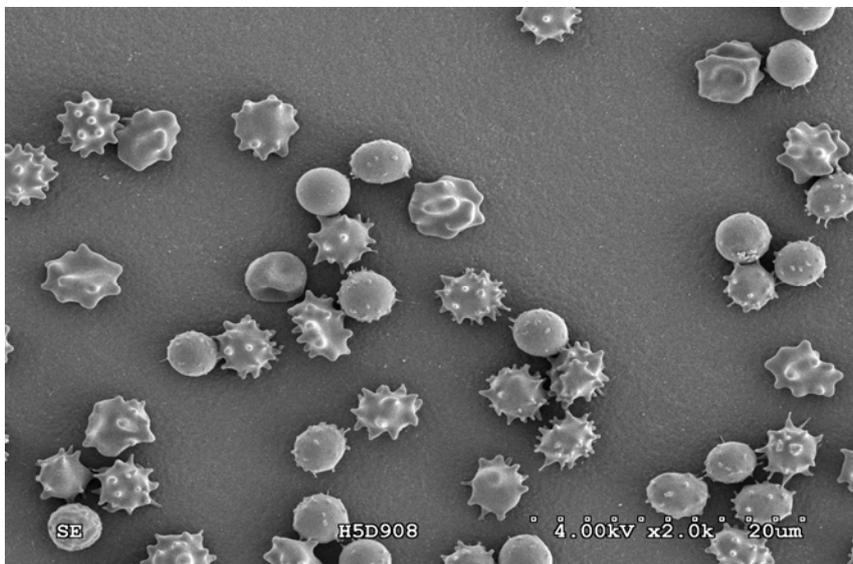
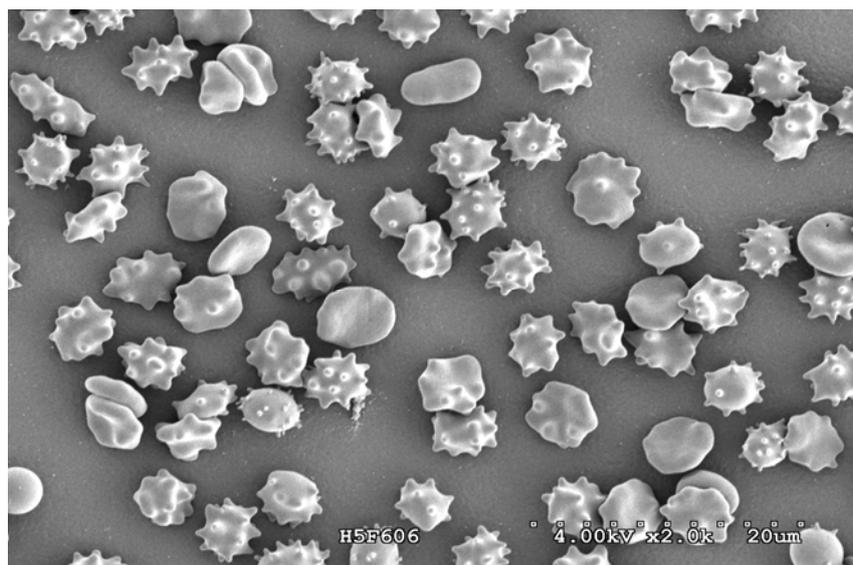
G₀G₃G₉

Figure 90 – Microscopie de balayage des hématies conservées en milieu non-glucosé (G₀) et en milieu SAGM à 3g (G₃) et à 9g (G₉) de glucose par litre pendant 5 semaines.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons participé, dans le cadre d'un travail d'équipe mené avec Carmen Palii, à la mise définitive d'une série de critères de viabilité des hématies humaines. Ces critères nouveaux que nous proposons pour évaluer l'état de santé des hématies destinées à la transfusion sanguine s'ajoutent aux critères traditionnels de dosage d'ATP et du 2,3-DPG et de mesure de l'hémolyse. Il s'agit des tests suivants, tous fondés sur les caractéristiques des hématies sénescentes et sur l'emploi de la cytométrie en flux :

- Test dans le mode FSC/SSC d'évaluation de la diminution de la taille (FSC) et de l'augmentation de la densité (SSC) des cellules.
- Observation en microscopie optique et en microscopie électronique de balayage de la morphologie des hématies, pour visualiser en particulier les formes sphéroéchinocytaires seules phagocytées, en vue de confirmer les observations cytométriques précédentes, d'une part, et pour prévoir, d'autre part, l'érythrophagocytose mesurée par l'étude en cytofluorimétrie de la phagocytose par les macrophages des hématies préalablement marquées par le fluorochrome PKH-26.
- Mesure de la désialylation des glycoconjugués membranaires à l'aide de lectines marquées par l'isothiocyanate de fluorescéine et spécifiques les unes des acides sialiques (WGA, SNA et MAA), les autres des groupements β -galactosyl des membranes des macrophages.
- Evaluation de l'externalisation de la phosphatidylsérine considérée comme un marqueur de phagocytose.
- Dosage du récepteur CD-47, l'un des facteurs d'antiphagocytose suivant le principe du « eat me, don't eat me ».
- Recherche des ions superoxydes qui déclenchent la mort cellulaire par attaque des structures lipidiques.
- Nous avons, en outre, contribué à la mise en place d'un critère capital dans l'évaluation de la viabilité des hématies. Il s'agit d'un test fondé sur la mesure par cytofluorimétrie de l'activité des estérases endocellulaires qui diminuent au cours du vieillissement des cellules. Appliqué à l'hématie, il s'est révélé comme l'un des critères « absolu » dans l'évaluation de la bonne santé de cette cellule. Il est simple, fiable et très sensible. En outre, il s'est révélé comme un critère très précoce de la sénescence érythrocytaire puisqu'il précède l'externalisation de la phosphatidylsérine.

L'utilisation de ces critères d'une manière systématique nous a permis d'accumuler des résultats statistiques qui attestent de la fiabilité des méthodes que nous employons pour effectuer nos recherches dans les domaines du fondamental et de l'appliqué.

A cet égard, l'une des conclusions majeures que nous pouvons tirer des résultats que nous avons obtenus dans ces deux domaines est que le dogme qui soutient que l'externalisation des résidus de β -galactose est le marqueur de capture de l'hématie et que l'externalisation de la phosphatidylsérine en est le marqueur de phagocytose, est erroné. En effet, à maintes reprises nous avons observé une phagocytose intense des hématies sans désialylation ni externalisation de la phosphatidylsérine. En outre, dans la plupart des cas, nous n'avons constaté aucune perte du récepteur CD-47 d'antiphagocytose. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène restent donc un mystère.

Dans le domaine de la recherche fondamentale nous avons démontré que :

1 – Le test cytochimique de Dimri *et al.* (1995) de détection de l'activité β -galactosidasique est certes valable pour l'étude de l'enzyme cytosolique, il ne l'est pas pour celle de l'enzyme membranaire érythrocytaire car il annonce d'une manière artefactuelle, une augmentation de son activité car,

2 – La mesure de cette dernière par la méthode biochimique fondée sur l'emploi de l'umbelliféryl- β -D-galactoside qui exclut tout artefact, démontre, au contraire, une diminution de l'activité de l'enzyme chez les hématies physiologiquement ou artificiellement vieilles. En conséquence, à l'inverse des résultats obtenus avec les cellules nucléées, la diminution de l'activité β -galactosidasique devient un marqueur de sénescence des hématies.

En conséquence, nous n'avons pas résolu l'énigme qui concerne le fait que la désialylation touchant le vieillissement physiologique des hématies humaines induise, non pas une augmentation, mais une diminution des résidus β -galactosyles terminaux. Le mystère reste donc entier.

Dans le domaine de la transfusion, les travaux que nous avons menés, pendant 4 années, en équipe avec Carmen Paliu et en collaboration avec le Centre de Transfusion Sanguine de Lille et avec la Société MacoPharma de Tourcoing ont été très fructueux et peuvent se résumer de la manière suivante :

1° - L'application de la collection des critères de viabilité que nous avons mis au point à des poches fournies par le Centre de Transfusion ne nous ont pas conduite à l'identification de « storage lesions » classiques au cours du stockage. En effet, la désialylation, l'externalisation

de la phosphatidylsérine, la formation d'ions superoxydes, la diminution de l'ATP, l'hémolyse, la disparition du récepteur CD-47 ou l'activité des estérases (test à la calcéine-AM) n'ont pas révélé de variations significatives qui auraient pu expliquer que 30 p. cent des hématies disparaissent de la circulation 24 heures après la transfusion et 70 p. cent au terme de 3 jours. Seule, la cytométrie en flux dans le système dot-plot FSC/SSC a révélé des modifications morphologiques profondes des hématies. La microscopie électronique de balayage a confirmé ces résultats mais a, en outre, apporté l'explication à la clairance rapide des hématies transfusées. En effet, les images obtenues montrent la présence de sphéroéchinocytes à spicules ou lisses, seules formes phagocytées, qui venaient témoigner de l'existence de « storage lesions » dont la nature reste inconnue, mais dont le coupable de la production est le glucose, ajouté d'une manière incontournable aux milieux de conservation et qui représente 10 fois la glycémie. Or, chez les diabétiques, l'hyperglycémie entraîne la glycation des protéines des hématies et il a été récemment démontré que, dans la membrane des macrophages, existe un récepteur des protéines glyquées qui a été isolé, cloné et exprimé.

Ainsi s'explique le fait que les nombreuses tentatives d'amélioration des milieux de conservation des hématies auxquelles nous nous sommes livrés n'aient pas été couronnées de succès. Ce résultat négatif nous montre, en contrepartie, que toute tentative d'amélioration des milieux serait, par avance, vouée à l'échec. Il nous reste, toutefois, à démontrer que notre hypothèse est juste en dosant les protéines glyquées qui se forment dans les poches au cours du stockage et en étudiant l'inhibition de la capture et de la phagocytose des hématies stockées à l'aide de protéines glyquées.

2° - Toutefois, nous avons pu démontrer que l'utilisation de l'automate MacoPharma ABC pour effectuer le prélèvement des sangs à hémato-crite constant est un réel progrès. Nous avons pu, en effet, montrer le résultat bénéfique de ce procédé comparé au prélèvement classique qui projette un volume important de sang dans un milieu agressif à pH 5 et qui provoque des « storage lesions » se manifestant, en particulier, par la formation de sphéroéchinocytes.

3° - Sur la base de l'ensemble des résultats que nous a fournis l'application des tests de viabilité que nous avons mis au point, nous parvenons à la conclusion que le critère absolu de viabilité des hématies est la microscopie électronique de balayage qui, pour l'instant, est la seule technique qui permette de voir se manifester les effets de « storage lesions » dont la nature reste pour l'instant, inconnue.

Enfin, nos travaux montrent l'importance de l'application de la cytométrie en flux qui devient une méthode incontournable de la recherche dans tous les domaines de la biochimie, de la biologie et de la pathologie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abuchowski A., McCoy J.R., Palczuk N.C., van Es T., Davis F.F., Effect of covalent attachment of poly(ethylene glycol) on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase., *J Biol Chem*, 252, **1977a**, 3582-3586. 14
- Abuchowski A, van Es T, Palczuk NC, Davis FF., Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of poly (ethylene glycol)., *J Biol Chem*, 252, **1977b**, 3578-3581. 14
- Aiken N.C., Satterlee J.D., Galey W.R., Measurement of intracellular Ca²⁺ in young and old human erythrocytes using 19F-NMR spectroscopy, *Biochim Biophys. Acta*, 113, **1992**, 155-160. 48
- Ameisen J.C., *La sculpture du vivant*, Edition du Seuil, Paris, **1999**. 1
- Ameisen J.C., On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years, *Cell Death Differ*, 9, **2002**, 367-393. 2
- Ameisen J.C., Looking for death at the core of life in the light of evolution, *Cell Death Differ.*, 11, **2004**, 4-10. 2
- Ameisen J.C., Anoikis, *Med Sci Paris* 21, (2), **2005**, 117. 33
- Amer J., Goldfarb A., and Fibach E., Flow Cytometric Analysis of the Oxidative Status of Normal and Thalassemic Red Blood Cells, *Cytometry Part A* 60A, **2004**, 73–80. 113
- Aminoff D., The role of sialoglycoconjugates in senescence and sequestration of RBC from circulation. *In Cellular and molecular approach of aging. The red cell as a model* (Eaton J.W., Konzen D.K. and White J.A., eds.), *Alan R Liss New York*, **1985**, 279-300. 60
- Anderson R.G., Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, **1993**, 10909-10913. 62
- Ando K., Beppu M., Kikugawa K., Nagai R., Horiuchi S., Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation, *Biochem Biophys Res Commun*, 258, **1999**, 123-127. 55,130
- Aviles M., Abascal I., Martinez-Menarguez J.A., Castells M.T., Skalaban S.R., Ballesta J., Alhadef J.A., Immunocytochemical localization and biochemical characterization of a novel plasma membrane-associated, neutral pH optimum alpha-L-fucosidase from rat testis and epididymal spermatozoa., *Biochem J*, 318, **1996**, 821-831. 61
- Barry M.A., Eastman A., Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca²⁺ and pH., *Biochem Biophys Res Commun* 186, **1992**, 782-789. 108
- Bartosz G., Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes., *Gerontology*, 37, **1991**, 33-67. 108

- Bass D.A., J.W. Parce, L.R. Dechatelet, P. Szejda, M.C. Seeds and M. Thomas , Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol*, **130** (1983), 1910-1918. 78
- Baxter A., Beeley J.G., Changes in surface carbohydrate of human erythrocyte aged *in vivo*. *Biochem Soc Trans*, **3**, **1975**, 134-136. 66
- Bazarbacha H.M., Jeribi R., Sebai R., Zidi M.-T., Touibi S., Dégénérescence wallérienne, *Presse Med*, **34** (17), **2005**, 1264-1270. 33
- Beaumont C., Canonne-Hergaux F., Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques ; régulation par l'hepcidine, *Transfusion Clinique et Biologique*, **12**, **2005**, 123–130. 54,57,58
- Belaud-Rotureau M.A., Leducq N., Macouillard Poullétier de Gannes F., Diolez P., Lacoste L., Lacombe F., Bernard P., Belloc F., Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis, *Apoptosis*, **5**, **2000**, 551-560. 108
- Bell R.S., Bouret L.A., Bell D.F., Gebhardt M.C., Rosenberg A., Berrey H.B., Treadwell B.V., Tomford W.W., Mankin H.J., Evaluation of fluorescein diacetate for flow cytometric determination of cell viability in orthopaedic research., *J Orthop Res*, **6**, **1988**, 467-474. 79
- Belo L., Rebelo I., Castro E.M.B., Catarino C., Pereira-Leite L., Quintanilha A., Santos-Silva A., Band 3 as a marker of erythrocyte changes in pregnancy, *Eur J Haematol*, **69**, **2002**, 145-151. 54
- Belzacq A.S., Vieira H.L., Kroemer G., Brenner C., The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie*, **84**, **2002**, 167-176. 40
- Ben Jilani K.E., Akarid K., Arnoult D., Petit F., Baert E., Gaillard J.P., Ameisen JC, Estaquier J. Gamma-interferon induces apoptosis of the B lymphoma WEHI-279 cell line through a CD95/CD95L-independent mechanism., *Eur Cytokine Netw*, **12**, **2001**, 587-596. 79
- Benesch R., Benesch R.E., Yu C.I., Reciprocal binding of oxygen and diphospho-glycerate by human hemoglobin., *Proc Natl Acad Sci USA*, **59**, **1968**, 526–532. 10
- Beppu M., Mizukami A., Ando K., Kikugawa K., Antigenic determinants of senescent antigen of human erythrocytes are located in sialylated carbohydrate chains of band 3 glycoprotein., *J Biol Chem*, **267**, **1992**, 14691-14696. 54
- Berg C.P., Engels I.H., Rothbart A., Lauber K., Renz A., Schlosser S.F., Schulze-Osthoff K., Wesselborg S., Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis, *Cell Death and Differ*, **8**, **2001**, 1197 -1206. 30,46,49, 50,84
- Bessis M., Living blood cells and their ultrastructure, *Springer-Verlag, Berlin*, **1973**. 59

- Bessis M., Brecher G., Action of stored plasma on red cell shape (discocyte-echinocyte transformation), *Nouv Rev Fr Hematol*, 2, **1971**, 305-307. 59
- Bessus H., Seghatchian J., Red cell storage lesion: The potential impact of storage-induced CD 47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells, *Transf Apher Science*, 32, **2005**, 227-232. 54
- Beutler E., Kuhl W., Volume control of erythrocytes during storage. The role of mannitol., *Transfusion*, 28, **1988**, 353-357. 11
- Beutler E., Back to the future in RBC preservation, *Transfusion*, 40, **2000**, 893-895. 3, 60
- Beutler E., Viability, function and rejuvenation of liquid-stored red cells, In Chaplin H Jr, Jaffe ER, Lenfant C, Valeri CR, eds, Preservation of red blood cell, *Washington: National Academy of Science*, **1973**, 195-214. 11
- Beutler E., Wood L., The in vivo regeneration of red cell 2,3 diphosphoglyceric acid (DPG) after transfusion of stored blood., *J Lab Clin Med*, 74, **1969**, 300-304. 11
- Beutler E., Wood L.A., Preservation of red cell 2,3-diphosphoglycerate in modified ACD solution and in experimental artificial storage media., *Vox Sang*, 20, **1971**, 403-413. 11
- Beutler E., Wood L.A., Preservation of red cell 2,3-DPG and viability in bicarbonate-containing medium: the effect of blood-bag permeability., *J Lab Clin Med*, 80, **1972**, 723-728. 11
- Blagosklonny Mikhail V., Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells, *Oncogene*, 23, **2004**, 2967-2975. 31
- Boatright K.M, Salvesen G.S., Caspase activation, *Biochem Soc Symp*, 70, **2003**, 233-242. 2
- Bojesen I.N. and Bojesen E., Oleic acid binding and transport capacity of human red cell membrane., *Acta Physiol Scand*, 156, **1996**, 501-516. 62
- Bose J., Gruber A.D., Helming L., Schiebe S., Wegener I., Hafner M., Beales M., Kontgen F., Lengeling A., The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal., *J Biol*, 3, **2004**, 15-19. 125
- Bosman G.J., Willekens F.L., Werre J.M., Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?, *Cell Physiol Biochem*, 16, **2005**, 1-8. 50,57,59
- Bosman G.J., Kay M.M., Erythrocyte aging: a comparison of model systems for simulating cellular aging in vitro., *Blood Cells*, 14, **1988**, 19- 35. 53
- Bosmann H.B., Red cell hydrolases: glycosidase activity in human erythrocyte plasma membrane, *J. Membr Biol* 4, **1971**, 113-123. 61

- Bosmann H.B., Red cell hydrolases. 3. Neuraminidase activity in isolated human erythrocyte plasma membranes., *Vox Sang* 26, **1974**, 497-512. 61
- Brand V.B., Sandu C.D., Duranton C., Tanneur V., Lang KS, Huber SM, Lang F., Dependence of plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte., *Cell Physiol Biochem*, 13, **2003**, 347–356 48
- Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria, *Cell Death Differ*, 8, **2001**, 1143-1156. 49,50,84
- Bratosin D., Mazurier J., Tissier J.P., Estaquier J., Huart J.J., Ameisen J.C., Aminoff D., Montreuil J., Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages., *Bioch*, 80, **1998**, 173–195. 30,47,48
- Bratosin D., Estaquier J., Ameisen J.C. and Montreuil J., Flow cytometric approach to the study of erythrophagocytosis: evidence for an alternative immunoglobulin-independent pathway in agammaglobulinemic mice. *J Immunol Meth*, 265, **2002b**, 133-143. 57,84, 150
- Bratosin D., Leszczynski S., Sartiaux C., Fontaine O., Descamps J., Huart J.J., Poplineau J., Goudaliez F., Aminoff D., Montreuil J., Improved storage of erythrocytes by prior leukodepletion: flow cytometric evaluation of stored erythrocytes, *Cytometry*, 46/6, **2001**, 351-356. 30
- Bratosin D., Mazurier J., Debray H., Lecocq M., Boilly B., Alonso C., Moisei M., Motas C., Montreuil J., Flow cytofluorimetric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span, *Glycoconj J*, 12, **1995**, 258-267. 3,47,57, 86
- Bratosin D., Mazurier J., Tissier J.P., Estaquier J., Huart J.J., Ameisen J.C., Aminoff D., Montreuil J., Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review, *Biochimie*, 80, **1998**, 173-195. 57
- Bratosin D., Mazurier J., Tissier J.P., Slomianny C., Estaquier J., Russo-Marie F., Huart J.J., Freyssinet J.M., Aminoff D., Ameisen J.C., Montreuil J., Molecular mechanisms of erythrophagocytosis. Characterization of the senescent erythrocytes that are phagocytized by macrophages, *C. R. Acad. Sci*, III. 320, **1997a**, 811-818. 71,72,75
- Bratosin D., Mitrofan L., Pali C., Estaquier J. and Montreuil J., A novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and ageing, *Cytometry A*, 66A, **2005**, 78-84. 30
- Brenner A.J., Stampfer M.R., Aldaz C.M., Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 17, **1998**, 199-205. 95

- Brown D.A. and London E., Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?, *Biochem. Biophys Res Commun* 240, **1997**, 1-7. 62
- Brown E. J., Hooper L., Ho T., Gresham H. D., Integrin-associated Protein: A 50-kD Plasma Membrane Antigen Physically and Functionally Associated with Integrins, *J Cell Biol*, 111, **1990**, 2785-2794. 55
- Brown E.G., Frazier W.A., Integrin-associated protein and its ligands. *Trends Cell Biol*, 11, **2001**, 130-135. 28
- Brown E.J., Frazier W.A., Integrin-associated protein (CD47) and its ligands., *Trends Cell Biol*, 11, **2001**, 130-135. 55
- Brown G.C., Nicholls D.G., Cooper C.E., Mitochondria and cell death, *Biochem Soc Symp*, 66, **1998**, Portland Press, London,. 2
- Brown, D.A. and London E. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Re. Commun*, 240, **1997**, 1-7. 62
- Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M.L., Peters L.L., Chasis J.A., Delaunay J., Mohandas N., Anstee D.J., Tanner M.J., A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane., *Blood*, 101, **2003**, 4180-4188. 28
- Bruce L.J., Ghosh S., King M.J., Layton D.M., Mawby W.J., Stewart G.W., Oldenburg P.A., Delaunay J., Tanner M.J., Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex., *Blood*, 100, **2002**, 1878-1885. 27
- Bruning J.W., Kardol M., Arentzen R., Carboxyfluorescein fluorochromasia assay. I. Non-radioactively labeled cell mediated lympholysis., *J Immunol Methods*, 33, **1980**, 33-44. 78
- Bulai T., Bratosin D., Artenie V., Montreuil J., Characterization of a sialate pyruvate-lyase in the cytosol of human erythrocytes., *Biochimie*, 84, **2002**, 655-660. 66
- Bulai T., Bratosin D., Artenie V., Montreuil J., Uptake of sialic acid by human erythrocyte. Characterization of a transport system., *Biochimie*, 85, **2003**, 241-244. 47
- Butifoker P., Kuypers F.A., Xu C.M., Chiu D.T., Lubin B., Enrichment of two glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins, acetylcholinesterase and decay accelerating factor, in vesicles released from human red blood cells, *Blood*, 74, **1989**, 1481-1485. 21
- Callewaert D.M., Radcliff G., Waite R., LeFevre J., Poulik M.D., Characterization of effector-target conjugates for cloned human natural killer and human lymphokine activated killer cells by flow cytometry. *Cytometry*, 12, **1991**, 666-676. 79
- Carini R., Parola M., Dianzani MU, Albano E, Mitochondrial damage and its role in causing hepatocyte injury during stimulation of lipid peroxidation by iron nitroloacetate, *Arch Biochem* 39

Biophys 297, **1992**, 110-118.

Carman T.A., Afshari C.A., Barrett J.C., Cellular senescence in telomerase expressing Syrian hamster embryo cells, *Exp Cell Res*, 244, **1998**, 33-42. 95

Cartron J.P., Rh blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillie`res Best Pract Res Clin Haematol*, 12, **1999**, 655-689. 28

Castedo M., Perfettini J.-L., Medema J.P. and Kroemer G., Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition, *Oncogene*, 23, **2004**, 2825-2837. 31

Chatterjee R., Welty E.V., Walder R.Y., Pruitt S.L., Rogers P.H., Arnone A., Walder J.A., Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative cross-linked between the alpha chains (lysine 99 alpha 1---lysine 99 alpha 2)., *J Biol Chem*, 261, **1986**, 9929-9937. 15

Chen C.C., Chang J.H., Lee J.B., Javier J., Azar D.T., Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, **2002**, 2593-2602. 79

Chiarini A., Fiorilli A., Di Francesco L., Venerando B., Tettamanti G., Human erythrocyte sialidase is linked to the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor and partly located on the outer surface, *Glycoconj J*, 10, **1993**, 64-71. 47

Choy Y.M., Wong S.L., Lee C.Y., Changes in surface carbohydrates of erythrocytes during *in vivo* aging., *Biochem Biophys Res Commun*, 91, **1979**, 410-415. 66

Clark M.R., Guatlli J.C., White A.T. and Shoet S.S. Study on the dehydrating effect of the red cell Na⁺/K⁺-pump in nystatin-treated cells with varying Na⁺ and water contents., *Biochim Biophys Acta*, 646, **1981**, 422-432. 62

Clark M.R., Senescence of red blood cells: progress and problems, *Physiol Rev*, 68, **1988**, 503-554. 1

Coates Philip J., Markers of senescence?, *J Pathol*, 196, **2002**, 371-373. 98

Corbin F., Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer., *Int J Hematol*, 76, **2002**, 253-257. 12

Cossarizza A., Cooper E.L., Quaglino D., Salvioli S., Kalachnikova G., Franceschi C., Mitochondrial mass and membrane potential in coelomocytes from the earthworm *Eisenia foetida*: studies with fluorescent probes in single intact cells., *Biochem Biophys Res Commun*, 214, **1995**, 503-510. 39

Cotson S. and Holt S.J., Studies in enzyme cytochemistry IV. Kinetics of aerial oxidation of indoxyl and some of its halogen derivatives. *Proc Royal Soc (London)*, 148B, **1958**, 506-509. 102

Cotter T.G., Programmed cell death, *Essays Biochem, Portland Press, London*, 39, **2003**, 161-166. 2

- Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 10th ed. F-67075 Strasbourg: Council of Europe Publishing, **2004**. 9
- Crompton M., Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death, *J Physiol*, 529, **2000**, 11-21. 35, 45
- Cuvillier O., Sphingosine in apoptosis signaling, *Biochim Biophys Acta*, 1585, **2002**, 153-162. 2
- Danon D., Marikowsky Y., Skutelsky E., The sequestration of old red cells and extruded erythroid nuclei. In Ramot B., Red cell structure and metabolism, *Acad Press New York*, **1971**, 23-38. 59
- Daugas E., Candé C., Kroemer G., Erythrocytes: Death of a mummy, *Cell Death Differ*, 8, **2001**, 1131-1133. 60
- Debatin K.M., Krammer P.H., Death receptors in chemotherapy and cancer., *Oncogene*, 12, **2004**, 2950-66. 31
- de Magalhaes J.P., Migeot V., Mainfroid V., de Longueville F., Remacle J., Toussaint O., No increase in senescence-associated beta-galactosidase activity in Werner syndrome fibroblasts after exposure to H₂O₂., *Ann N Y Acad Sci*, 1019, **2004**, 375-378. 113
- Desagher S., Martinou J-C., Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol*, 10, **2000**, 369-377. 2
- Deshmukh M., Kuida K. and Johnson E.M.J., Caspase inhibition extends the commitment to neuronal death beyond cytochrome *c* release to the point of mitochondrial depolarization. *J Cell Biol*, 150, **2000**, 131-139. 39
- Devarakonda R. Krishna, Bernhard Sperker, Peter Fritz, Ulrich Klotz, Does β -galactosidase activity indicate cell senescence?, *Mechanisms of Ageing and Development*, 109, **1999**, 113-123. 95, 97
- Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M. and Campisi J., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, **1995**, 9363-9367. 95,96,97, 102,103, 116
- Ding G., Franki N., Kapasi A.A., Reddy K., Gibbons N., Singhal P.C., Tubular cell senescence and expression of TGF-beta1 and p21 (WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats., *Exp Mol Pathol*, 70, **2001**, 43-53. 95
- Durantont C., Huber S., Tanneur V., Lang K., Brand V, Sandu C, Lang F. () 48
Electrophysiological properties of the plasmodium falciparum - induced cation conductance of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, 13, **2003**, 189-198.
- Durantont C., Huber S.M., Lang F., Oxidation induces a Cl(-) - dependent cation conductance in 48

- human red blood cells., *J Physiol*, 539, **2002**, 847–855.
- Duvall E., Wyllie A.H., Morris R.G., Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)., *Immunology*, 56, **1985**, 351-358. 57
- Earnshaw W.C., L.M. Martins and S.H. Kaufmann , Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, **1999**, 383–424. 43
- Edinger A.L., Thompson C.B., Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Curr Opin Cell Biol*, 16, **2004**, 663-669. 2
- Edinger A.L., Thompson C.B., Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Current Opinion in Cell Biology*, 16, **2004**, 663-669. 32
- Edinger A.L., Thompson C.B., Defective autophagy leads to cancer, *Cancer Cell*, 4, **2003**, 422-424. 32
- Eisele K., Lang P.A., Kempe DS, Klarl BA, Niemoller O, Wieder T, Huber SM, Durantou C, Lang F., Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions., *Toxicol Appl Pharmacol*, 210, **2006**, 116-122. 49
- Estaquier J., Tanaka M., Suda T., Nagata S., Golstein P., Ameisen J.C., Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists, *Blood*, 87, **1996**, 4959-4966. 79
- Evan G.I., Brown L., Whyte M., Harrington E., Apoptosis and the cell cycle, *Curr Opin Cell Biol*, 7, **1995**, 825-834. 43
- Fairbanks G., Sterk T.L. and Wallach D.F.H., Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry*, 10, **1971**, 2606-2617. 22
- Ferraro-Peyret C., Quemeneur L., Flacher M., Revillard J.P., Genestier L., Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes., *J Immunol*, 169, **2002**, 4805-4810. 49
- Finch C.A., Adenine-supplemented blood, *Vox Sang*, 48, **1985**, 319-322. 11
- Franck P., Petitpain N., Cherlet M., Dardennes M., Maachi F., Schutz B., Poisson L., Nabet P., Measurement of intracellular pH in cultured cells by flow cytometry with BCECF-AM, *J Biotechnol*, 46/3, **1996**, 187-195. 90
- Goi G., Cazzola R., Tringali C., Massaccesi L., Russo Volpe S., Rondanelli M., Ferrari E., Baquero Herrera C.J., Cestaro B., Lombardo A., Venerando B., Erythrocyte membrane alterations during ageing affect β -D-glucuronidase and neutral sialidase in elderly healthy subjects, *Experimental Gerontology*, 40, **2005**, 219–225. 67, 68, 108

- Gabrio B.W., Donohue D.M., Huennekens F.M., Finch C.A., Erythrocyte preservation. VII. Acid-citrate-dextrose-inosine (ACDI) as a preservative for blood during storage at 4 degree C., *J Clin Invest*, 35, **1956**, 657-663. 11
- Gahmberg C.G., Hakomori S.I., External labeling of cell surface galactose and galactosamine in glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes. *J Biol Chem*, 248/12, **1973**, 4311-4317. 70, 93
- Galili U., Korkesh A., Kahane I., Rachmilewitz EA., Demonstration of a natural antigalactosyl IgG antibody on thalassemic red blood cells., *Blood*, 61, **1983**, 1258-1264. 54
- Garcia A., Apoptosis: from regulation to infection, *Biochimie*, 85, **2003**, 719-820. 2
- Gattegno L., Bladier D., Garnier M., Cornillot P., Changes carbohydrate content of surface membranes of human erythrocytes during ageing, *Carbohydr Res*, 52, **1976**, 197-208. 66
- Gatti R., Belletti S., Orlandini G., Bussolati O., Dall'Asta V., Gazzola G.C., Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy, *J Histochem Cytochem*, 46, **1998**, 895-900. 79
- Giarratana M.C., Kobari L., Lapillonne H., Chalmers D., Kiger L., Cynober T., Marden M.C., Wajcman H., Douay L., *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells, *Nature Biotechnology*, 23, **2004**, 69-74. 13
- Gibson J.G. 2nd, Rees S.B., McManus T.J., Scheitlin W.A., A citrate-phosphatedextrose solution for the preservation of human blood., *Am J Clin Pathol*, 28, **1957**, 569-578. 10
- Gieseg S.P., Maghzal G., Glubb D., Protection of erythrocytes by the macrophage synthesized antioxidant 7,8 dihydropterin, *Free Rad Res*, 34, **2001**, 123-136. 112
- Gilmore A.P., Anoikis, *Cell Death and Differ*, 12, **2005**, 1473-1477. 33
- Glass G.A., Gershon D., Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor age., *Biochem J*, 218, **1984**, 531-537. 66
- Glass G.A., Gershon H., Gershon D., The effect of donor and cell age on several characteristics of rat erythrocytes, *Exp Hematol*, 11, **1983**, 987-995. 66
- Goi G., Bairati C., Massaccesi L., Lovagnini A., Lombardo A., Tettamanti G., Membrane anchoring and surface distribution of glycohydrolases of human erythrocyte membranes., *FEBS Lett*, 473, **2000**, 89-94. 61,62,64, 67,68,101, 108
- Goi G., Bairati C., Segalini G., Burlina A.B., Massaccesi L., Lovagnini A., Lombardo A., Alterations in the activity of several glycohydrolases in red blood cell membrane from type 2 diabetes mellitus patients., *Metabolism*, 48, **1999**, 817-821. 62
- Going J.J., Stuart R.C., Downie M., Fletcher-Monaghan A.J., Keith W.N., 'Senescence associated' b-galactosidase in the upper gastrointestinal tract., *J Pathol*, 196, **2002**, 394-400. 95, 96, 97

- 98
- Goldstein J.C., N.J. Waterhouse, P. Juin, G.I. Evan and D.R. Green , The coordinate release of cytochrome *c* is rapid, complete and kinetically invariant., *Nat Cell Biol*, 2, **2000**, 156-160. 39
- Gopalan V., Glew R.H., Libell D.P. and DePetro J.J., The dual effects of alcohols on the kinetic properties of guinea pig liver cytosolic beta-glucosidase., *J Biol Chem*, 264, **1989**, 15418-15422. 61
- Gorman A.M., Orrenius S., Ceccatelli S., Apoptosis in neuronal cells: role of caspases, *Neuroreport*, 9/10, **1998**, R49-R55. 77
- Gottlieb R.A., Nordberg J., Skowronski E., Babior B.M., Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, **1996**, 654-658. 108
- Gould S.A., Moore E.E., Hoyt D.B., Burch J.M., Haenel J.B., Garcia J., DeWoskin R., Moss G.S., The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery., *J Am Coll Surg*, 187, **1998**, 113-120. 15
- Green D.R., Apoptotic pathways: ten minutes to dead, *Cell*, 121, **2005**, 671-674. 2
- Green D.R. and Reed J.C., Mitochondria and apoptosis., *Science*, 281, 1998, 1309. 39, 46
- Green D.R. and Kroemer G., The central executioner of apoptosis: mitochondria or caspases?, *Trends Cell Biol*, 8, **1998**, 267-271. 39
- Green P.S., Leeuwenburgh C., Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis., *Biochim Biophys Acta*, 1588, **2002**, 94-101. 79
- Grimsley C., Ravichandran K.S., Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals, *Trends Cell Biol*, 13/12, **2003**, 648-656. 92
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev*, 13, **1999**; 1899-1911. 44
- Gyls K.H., Fein J.A., Wiley D.J., Cole G.M., Rapid annexin-V labeling in synaptosomes, *Neurochem. Int*, 44, **2004**, 125-131. 79
- Hakomori S., Structure and function of sphingolipids in transmembrane signalling and cell-cell interactions. *Biochem Soc Trans*, 21, **1993**, 583-595. 19
- Halbhuber K.J., Hemke U., Geyer G., Zur Elimination digerierter Erythrozyte der Ratten, *Folia Haematol*, 97, **1972**, 196-203. 47

- Haldar K., de Amorim A.F. and Cross G.A. Transport of fluorescent phospholipid analogues from the erythrocyte membrane to the parasite in *Plasmodium falciparum*-infected cells., *J Cell Biol*, 108, **1989**, 2183-2192 62
- Hamasaki N., Yamamoto M., Red blood cell function and blood storage., *Vox Sang*, 79, **2000**, 191–197. 9, 10
- Haugland R.P., Handbook of fluorescent probes and research products., *Molecular Probes Inc., Eugene OR*, **2002**. 78, 79
- Hengartner M.U., The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 2000, 770-776. 2, 44
- Henrich C.J., Aminoff D., Isolation and characterization of a glycopeptide from human senescent erythrocytes., *Carbohydr Res*, 120, 1983, 55-56. 54
- Hess J.R., Rugg N., Knapp A.D. Gormas J.F., Silberstein E.B., Greenwalt T.J., Successful storage of RBCs for 10 weeks in a new additive solution, *Transfusion*, 40, **2000**, 1012-1016. 10
- Heyworth C.M., Neumann E.F., Wynn C.H., The stability and aggregation properties of human liver acid β -galactosidase., *Biochem J*, 193, **1981**, 773-779. 97
- Hirsch T., P. Marchetti, S.A. Susin, B. Dallaporta, N. Zamzami, I. Marzo, M. Geuskens and G. Kroemer , The apoptosis–necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15, **1997**, 1573-1579. 39
- Högman C.F. and Meryman H.T., Red blood cells intended for transfusion: quality criteria revisited, *Transfusion*, 46, **2006**, 137-142. 13
- Hollo Z., Homolya L., Hegedus T., Sarkadi B., Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cell, *FEBS Lett*, 383, **1996**, 99-104. 79
- Holt S.J. and Sadler. P.W., Studies in enzyme cytochemistry III. Relationships between solubility, molecular association and structure in indigoid dyes. *Proc Royal Soc (London)*, 148B, **1958**, 495. 102
- Homolya L., Hollo Z., Germann U.A., Pastan I., Gottesman M.M., Sarkadi B., Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein, *J Biol Chem*, 268, **1993**, 21493-21496. 79
- Hooper N.M. and Turner A.J., Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor., *Biochem J*, 250, **1988**, 865-869. 62
- Hoppe-Seyler, *Biological Chemistry*, 372, **1991**, 573-584 23
- Huang Z., The chemical biology of apoptosis: Exploring protein-protein interactions and the life 2

and death of cells with small molecules, *Chem Biol*, 9, **2002**, 1059-1072.

- Imanishi H., Nakai T., Abe T., Takino T., Glutathione metabolism in red cell aging, *Mech Ageing Dev*, 32, **1985**, 57-62. 66
- Jäättelä M., Voies multiples de la mort de cellules comme régulateurs de déclenchement de tumeur et progression, *Oncogene*, 23, 2004, 2746–2756. 31, 32
- Jackson C.-J., Charlton J.L., Kuzminski K., Lang G.M., Sehon A.H., Synthesis, isolation, and characterization of conjugates of ovalbumin with monomethoxypoly(ethylene glycol) using cyanuric chloride as the coupling agent., *Anal Biochem*, 165, **1987**, 114-127. 14
- Jaffrézou J.P., Laurent G., Levade T., Ceramide in regulation of apoptosis, *Subcellular Biochemistry Plenum Pub., New York*, 36, **2002**, 269-284. 2
- Jay Daniel G., Role of Band 3 in Homeostasis and Cell Shap, *Cell*, 86, **1996**, 853-854. 25
- Jiang P., Lagenaur C. F., Narayanan V., Integrin-associated Protein Is a Ligand for the P84 Neural Adhesion Molecule, *J Biol Chem*, 274, **1999**, 559. 55
- Junqueira V.B.C., Barros S.B.M., Chan S.S., Rodrigues L., Giavarotti L., Abud R.L., Deucher G.P., Aging and oxidative stress, *Molecular Aspects of Medicine*, 25, **2004**, 5-16. 66, 67
- Kadlubowski M., Agutter P.S., Changes in the activities of some membrane-associated enzyme during *in vivo* ageing of the normal human erythrocyte, *Br J Haematol*, 37, **1977**, 111-125. 66
- Kapanen A., Danilov A., Lehenkari P., Ryhänen J., Jämsä T., Tuukkanen J., Effect of metal alloy surface stresses on the viability of ROS-17/2.8 osteoblastic cells, *Biomaterials*, 23, **2002**, 3733-3740. 79
- Katherine A.S., Thomas P., LaBerge W., Thomas J., In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free Radic. Biol Med*, 22, **1997**, 835-842. 66
- Katz M.L., Robison W.G. Jr, Herrmann R.K., Groome A.B., Bieri J.G., Lipofuscin accumulation resulting from senescence and vitamin E deficiency: spectral properties and tissue distribution., *Mech Ageing Dev*, 25, **1984**, 149-159. 97
- Kay M.M.B., Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ, *Proc. Natl Acad Sci USA*, 72, **1975**, 3521-3525. 53
- Kay M.M.B., Band 3 and its alterations in health and disease., *Cell Mol Biol*, 50, **2004**, 117-138. 53, 54
- Kaya T., Torisawa Y., Oyamatsu D., Nishizawa M., Matsue T., Monitoring the cellular activity of a cultured single cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). A comparison with fluorescence viability monitoring, *Biosens Bioelectron*, 18, **2003**, 1379-1383. 79

- Kempe D.S., Lang P.A., Eisele K., Klarl B.A., Wieder T., Huber S.M., Durantón C., Lang F., 49
Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions, *Am J Physiol Cell Physiol*, 288, **2005**, C396-402.
- King K.L., Cidlowski J.A., Cell cycle regulation and apoptosis, *Annu Rev Physiol*, 60, **1998**, 44
601-17.
- King M.A., Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *J* 79
Immunol Methods, 243, **2000**, 155-166.
- Klionsky D.J., Emr S.D., Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, *Science*, 32
290, **2000**, 1717-1721.
- Kluck R.M., E. Bossy-Wetzl, D.R. Green and D.D. Newmeyer , The release of cytochrome *c* 39
from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis., *Science*, 275, **1997**, 1132-1139.
- Krishna D.R., Sperker B., Fritz P., Klotz U., Does pH 6 betagalactosidase activity indicate cell 95, 97
senescence? *Mech Ageing Dev*, 109, **1999**, 113–123.
- Kroemer G. and Reed J.C., Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 6, **2000**, 513. 39
- Kroemer G., Mitochondrial control of apoptosis, *Biochimie*, 84, **2002**, 103-104. 2
- Kroemer G., Petit P.X., Zamzami N., Vayssière J.-L. and Mignotte B., The biochemistry of 39
apoptosis., *FASEB J*, 9, **1995**, 1277.
- Kroemer Guido, Cell death and cancer: an introduction, *Oncogene*, 23, **2004**, 2744–2745. 31
- Kuo C., Wells W., Galactosidase from rat mammary gland, *J Biol Chem*, 253, **1978**, 3550-3556. 96, 97
- Kurz D.J., Decary S., Hong Y., Erusalimsky J.D., Senescence associated (beta) galactosidase 97
reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells., *J Cell Sci*, 113, **2000**, 3613–3622.
- Lane D.P., Worrying about p53, *Curr Biol*, 2, **1992**, 581-583. 44
- Lang F., Foller M., Lang K.S., Lang P.A., Ritter M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S.M., Ion 48
channels in cell proliferation and apoptotic cell death., *J Membr Biol*, 205, **2005a**, 147-157.
- Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Durantón C., Wieder T., Huber S.M., Lang F., Mechanisms of 59, 60
suicidal erythrocyte death, *Cell Physiol Biochem*, 15, **2005**, 195-202.
- Lang K.S., Myssina S., Brand V., Sandu C., Lang P.A., Berchtold S., Huber S.M., Lang F., 48, 49
Wieder T., Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes., *Cell Death Differ*, 11, **2004**, 231-243.

- Lang K.S., Duranton C., Poehlmann H., Myssina S. Bauer C., Lang F., Wieder T., Huber S.M., 48
Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes., *Cell Death Differ* 10, **2003a**, 249–256.
- Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S.M., Lang F., Mechanisms of 33
suicidal erythrocyte death., *Cell Physiol Biochem*, 15, **2005a**, 195 – 202.
- Lang K.S., Myssina S., Brand V., Sandu C., Lang PA, Berchtold S., Huber S.M., Lang F., 48
Wieder T., Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes., *Cell
Death Differ* 11, **2004a**, 231–243
- Lang K.S., Roll B., Myssina S., Schittenhelm M., Scheel-Walter H.G., Kanz L., Fritz J., Lang 48, 60
F., Huber S.M., Wieder T., Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, Thalassemia
and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency., *Cell Physiol Biochem*, 12, **2002**, 365–372.
- Lang P.A., Kempe D.S., Myssina S., Tanneur V., Birka C., Laufer S., Lang F., Wieder T. and 48
Huber S.M., PGE2 in the regulation of programmed erythrocyte death, *Cell Death and
Differentiation*, 12, **2005b**, 415–428.
- Lange R.D., Crosby W.H., Donohue D.M, FINCH CA, GIBSON JG 2nd, McMANUS TJ, 11
STRUMIA MM., Effect of inosine on red cell preservation., *J Clin Invest*, 37, **1958**, 1485-1493.
- Lapolla A., Traldi P., Fedele D., Importance of measuring products of non-enzymatic glycation 55, 56
of proteins, *Clin. Biochem.*, 38, **2005**, 103-115.
- Lauber K., Blumenthal S. G., Waibel M., Wesselborg S., Clearance of Apoptotic Cells: Review 52
Getting Rid of the Corpses, *Molecular Cell*, 14, **2004**, 277–287.
- Leist M. and Jäättelä M., Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms, 30
Nat Rev Mol Cell Biol, 2, **2001**, 589-598.
- Lelièvre J.D., Arnoult D., Petit F., Estaquier J., Infection par le VIH1 et apoptose lymphocytaire 2
T CD4, *La Revue de Médecine Interne*, 24, **2003**, 522-529.
- Lennon S.V., Martin S.J. and Cotter T.G., Dose-dependent induction of apoptosis in human 76
tumour cell lines by widely diverging stimuli, *Cell Prolif*, 24, **1991**, 203.
- Lenny L.L., Hurst R., Goldstein J., Galbraith R.A., Transfusion to groupe O subjects of 2 units 14
of red cells enzymatically converted from groupe B to groupe O, *Transfusion*, 34, **1994**, 209-
214.
- Levesque A., Paquet A., Page M., Measurement of tumor necrosis factor activity by flow 79
cytometry., *Cytometry*, 20, **1995**, 181-184.
- Levine Beth, Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular 32
defence, *Cell*, 120, **2005**, 159-162.
- Liang H. and S.W. Fesik , Three-dimensional structures of proteins involved in programmed 43

cell death. *J Mol Biol*, 274, **1997**, 291–302.

Lichtenfels R., Biddison W.E., Schulz H., Vogt A.B., Martin R., CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods*, 172, **1994**, 227-239. 79

Litaker J.R., Pan J., Cheung Y., Zhang D.K., Lin Y., Wong S.C.H., Wan T.S.K., Tsao S.W., Expression profile of SA- β galactosidase and activation of telomerase in human ovarian surface epithelial cells undergoing immortalization, *Int J Oncol*, 13, **1998**, 951-956. 95

Ling Y., Liu H.J., Hou L., Zhang B., Enhanced expression of hsp gene confers cellular resistance to H₂O₂ induced senescence., *Chin Med Sci J*, 21, **2006**, 1-5.

Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J., The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology, *Cell*, 104, **2000**, 487-501. 35

Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipurski S.L., Matsudaira P., Darnell J., Structure des membranes : la membrane plasmique, *Biologie moléculaire de la cellule*, De Boerck (éd.), Louvain, **1997**, 620-626. 16, 26

Lojda, Z., Indigogenic methods for glycosidases. *Histochemie*, 22, **1970**, 347. 102

Lombardo A., Caimi L., Marchesini S., Goi G. and Tettamanti G., Enzymes of lysosomal origin in human plasma and serum: assay conditions and parameters influencing the assay., *Clin Chim Acta* 108, **1980**, 337-346. 61

Lombardo A., Goi G., Gambacorti Passerini C., Barbieri M.C., Colombo G., Rugarli C. and Tettamanti G., Lysosomal glycohydrolases in normal T and non-T peripheral lymphocytes. *Clin Chim Acta*, 137, 1984, 67-75. 61

Lorenzo H.K., Susin S.A., Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death., *FEBS Lett*, 557, **2004**, 14-20. 33

Lorimore S.A., Coates P.J., Scobie G.E., Milne G., Wright E.G., Inflammatory-type responses to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects?, *Oncogene*, 20, **2001**, 7085–7095. 98

Loutit J.F., Mollison P.L., Young I.M., Lucas E.J., Citric acid-sodium citrate-glucose mixture for blood storage, *Q J Exp Physiol*, 32, **1943**, 183-202. 10

Low M.G. and Finean J.B., Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C., *FEBS Lett*, 82, **1977**, 143-146. 62

Low T.Y., Seow T.K. and Chung M.C.M., Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry, *Proteomics*, 2, **2002**, 1229-1239. 21

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 1951, 265-275. 100
- Lutz H.U., Stammli P., Fasler S., Ingold M., Fehr J., Density separation of human red blood cells on self forming Percoll gradients: correlation with cell age., *Biochim Biophys Acta*, 1116, **1992**, 1-10. 67,72,86, 106,107
- Lutz H.U., Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance, *Cell Molec Biol*, 50, **2004**, 107-116. 53, 57
- Lutz H.U. and Fehr J., Total sialic acid content of glycophorins during senescence of human red blood cells., *J Biol Chem*, 254, **1979**, 11177-11180. 62
- Lutz H.U., Liu S.C., Palek J., Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion: characterization of spectrin-free vesicles., *J Cell Biol*, 73, **1977**, 548-560. 21
- Mahuran D.M., Novak A. and Lowden J.A., The lysosomal hexosaminidase isozymes., *Curr. Top Biol Med Res*, 12, **1985**, 229-288. 61
- Mandal Debabrata, Arindam Mazumder, Pradeep Das, Manikuntala Kundu and Joyoti Basu, Fas-, Caspase 8-, and Caspase 3-dependent Signaling Regulates the Activity of the Aminophospholipid Translocase and Phosphatidylserine Externalization in Human Erythrocytes, *JBC*, 280, **2005**, 39460–39467. 49
- Mandal D., Baudin-Creuzat V., Bhattacharyya A., Pathak S., Delaunay J., Kundu M. and Basu J. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3)., *J Biol Chem*, 278, **2003**, 52551–52558. 49
- Mandal D., Moitra P. K., Saha S. and Basu J., Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes, *FEBS Lett*, 513, **2002**, 184–188. 49
- Manodori A.B., Barabino G.A., Lubin B.H., Kuypers F.A., Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin, *Blood*, 95, **2000**, 1293-1300. 48
- Marchesi V.T., Furthmayer H. and Tomita M., The red cell membrane, In: *Annu Rev Biochem*, Snell E.S., Boyer P.D., Meister A. and Richardson C.C., eds. Palo Alto, California, 45, **1976**, 667-720. 22
- Marchetti P., Castedo M., Susin S.A., Zamzami N., Hirsch T., Macho A., Haeflner A., Hirsch F., Geuskens M., Kroemer G., Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis, *J Exp Med*, 184, **1996**, 1155-1160. 39
- Maria E. G., Marcel L. and Gregory J. G., Lysosomes in cell death, *Oncogene*, 23, **2004**, 2881–2890. 42
- Martin S.J., Finucane D.M., Amarante-Mendes G.P., O'Brien G.A., Green D.R., Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts 49

- requires ICE/CED-3 protease activity., *J Biol Chem*, 271, **1996**, 28753-28756.
- Martina Seiffert, Charles Cant, Zhengjun Chen, Irene Rappold, Wolfram Brugger, Lothar Kanz, Eric J. Brown, Axel Ullrich, and Hans-Jörg Bühring, Human Signal-Regulatory Protein Is Expressed on Normal, But Not on Subsets of Leukemic Myeloid Cells and Mediates Cellular Adhesion Involving Its Counterreceptor CD47, *Blood*, 94, **1999**, 3633. 55
- Matsushita M., Yabuki A., Malchesky P.S., Harasaki H., Nose Y., In vivo evaluation of a pyridoxylated-hemoglobin-polyoxyethylene conjugate., *Biomater Artif Cells Artif Org*, 16, **1988**, 247-260. 15
- Matsuyama H., Niklasson F., de Verdier C.H., Hogman C.F., Phosphoenolpyruvate in the rejuvenation of stored red blood cells in SAGM medium: Optimal conditions and the indirect effect of methemoglobin formation., *Transfusion*, 29, **1989**, 614-619. 10
- McDonald J.F., Zheleznyak A., Frazier W.A., Cholesterol-independent interactions with CD47 enhance $\alpha\beta 3$ avidity., *J Biol Chem*, 279, **2004**, 17301-17311. 54
- McEvoy L., Williamson P., Schlegel R.A., Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages, *Proc. Natl Acad Sci USA*, 83, **1986**, 3311-3315. 48
- Mecocci P., Polidori M.C., Troiano L., Cherubini A., Cecchetti R., Pini G., Straatman M., Monti D., Stahl W., Sies H., Franceschi C., Senin U., Plasma antioxidants and longevity : a study on healthy centenarian., *Free Radic Biol Med*, 28, **2000**, 1243-1248. 67
- Meijer A. J. and Codogno P., Regulation and role of autophagy in mammalian cells, *Int J Biochem Cell Biol*, 36, **2004**, 2445-62. 31
- Meisenholder G.W., Martin S.J., Green D.R., Nordberg J., Babior B.M., Gottlieb R.A., Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection., *J Biol Chem*, 271, **1996**, 16260-16262. 108
- Melino G., Knight R.A., Nicotera P., How many ways to die? How many different models of cell death?, *Cell Death Differ*, 12, **2005**, 1457-1462. 33
- Mendez M.V., Stanley A., Park H.Y., Shon K., Phillips T., Menzoian J.O., Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence, *J Vasc Surg*, 28, **1998**, 876-883. 95
- Meryman HT, Hornblower ML, Syring RL., Prolonged storage of red cells at 4 degrees C. *Transfusion*, 26, **1986**, 500-505. 11
- Messana I., Ferroni L., Misiti F., Girelli G., Pupella S., Castagnola M., Zappacosta B., Giardina B., Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation., *Transfusion*, 40, **2000**, 353-360. 10
- Morioka K., Toné S., Mukaida M., Takano-Ohmuro H., The apoptotic and nonapoptotic nature 2, 59

of the terminal differentiation of erythroid cells, *Exp Cell Res*, 240, **1998**, 206-217.

- Mouton R.E., Venable M.E., Ceramide induces expression of the senescence histochemical marker, β -galactosidase, in human fibroblasts, *Mechanisms of Ageing and Development*, 113, **2000**, 169–181. 97, 112
- Mueller T.J., Jackson C.W., Dockter M.E., Morrison M., Membrane skeletal alteration during in vivo mouse red cell aging. Increase in the band 4.1a:4.1b ratio, *J Clin Invest*, 79, **1987**, 492-499. 19
- Muniz M., Riezman H., Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J*, 19, **2000**, 10-15. 62
- Nakao K., Wada T., Kamiyama T., Nakao M., Nagano K., A direct relationship between adenosine triphosphate-level and in vivo viability of erythrocytes, *Nature*, 194, **1962**, 877-878. 11
- Neri S., Mariani E., Meneghetti A., Cattini L., Facchini A., Calcein-acetoxymethyl cytotoxicity assays: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants., *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, **2001**, 1131-1135. 79
- Ng G., Huang J., The significance of autophagy in cancer., *Mol Carcinog*, 43, **2005**, 183-187. 32
- Nho K., Zalipsky S., Abuchowski A., Davis F.F., PEG-modified hemoglobin as an oxygen carrier, in Harris JM (ed): *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. New York, NY, Plenum Press, **1992**, 171-182. 15
- Nicotera P., Melino G., Regulation of the apoptosis-necrosis switch., *Oncogene*, 23, **2004**, 2757–2765. 33
- Noel-Hudson M.S., Braut-Boucher F., Robert M., Aubery M., Wepierre J. Comparison of six different methods to assess UVA cytotoxicity on reconstructed epidermis. Relevance of a fluorometric assay (the calcein-AM) to evaluate the photoprotective effect of tocopherol, *Toxicol In Vitro*, 11, **1997**, 645-651. 79
- Obeid L.M., Linardic C.M., Karolak L.A., Hannun Y.A., Programmed cell death induced by ceramide, *Science*, 259, **1993**, 1769-1771. 2
- Ogden C.A., deCathelineau A., Hoffmann P.R., Bratton D., Ghebrehiwet B., Fadok V.A., Henson P.M., C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells., *J Exp Med*, 194, **2001**, 781-795. 51
- Oldenborg P-A, Zheleznyak A., Fang Y.F., Lagenaur C.F., Gresham H.D., Lindberg F.P., Role of CD47 as a marker of self on red blood cells., *Science*, 288, **2000**, 2051- 2054. 55
- Ozkan P., Mutharasan R., A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM, *Biochim Biophys Acta*, 1572/1, **2002**, 143-148. 90

- Palestini P., Pitto M., Ferraretto A., Tettamanti G. and Masserini M. Change of ganglioside accessibility at the plasma membrane surface of cultured neurons, following protein kinase C activation., *Biochemistry* 37, **1998**, 3143-3148. 62
- Papadopoulos N.G., Dedoussis G.V.Z., Spanakos G., Gritzapis A.D., Baxevanis C.N., Papamichail M., An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry, *J Immunol Methods*, 177, **1994**, 101-111. 79
- Patterson S., Spahr, E. Daugas, S.A. Susin, T. Irinopoulos, C. Koehler and G. Kroemer , Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ*, 7, **2000**, 137-144. 39
- Perez-Sala D., Collado-Escobar D., Mollinedo F., Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease., *J Biol Chem*, 270, **1995**, 6235-6242. 108
- Petit P.X., LeCoeur H., Zorn E., Dauguet C., Mignotte B. and Gougeon M.L., Alterations of mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol*, 130, **1995**, 157. 39
- Prall Y.G., Gambhir K.K, Ampy F.R., Acetylcholinesterase: an enzymatic marker of human red blood cell aging, *Life Sci*, 63, **1998**, 177-184. 82
- Ralf M.C., Social control on cell survival and cell death, *Nature*, 356, **1992**, 397- 400. 46
- Rebollo A., Gomez J., Martinez de Aragon A., Lastres P., Silva A., Perez-Sala D., Apoptosis induced by IL-2 withdrawal is associated with an intracellular acidification., *Exp Cell Res*, 218, **1995**, 581-585. 108
- Reithmeier R.A.F., A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion exchangers., *Blood Cell Mol Dis*, 27, **2001**, 85-89. 28
- Ren Y, Savill J., Apoptosis: the importance of being eaten, *Cell Death Differ*, 7, **1998**, 563-568. 51
- Rettig M.P., Low P.S., Gimm J.A., Mohandas N., Wang J.Z., Christian J.A., Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocyte senescence in the dog., *Blood*, 93, 1999, 376-384. 53
- Reynolds J.E., Li J., Craig R.W., Eastman A., BCL-2 and MCL-1 expression in Chinese hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by staurosporine. *Exp Cell Res*, 225, 1996, 430-436. 108
- Roden M.M., Lee K.H., Panelli M.C., Marincola F.M., A novel cytolysis assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology., *J Immunol Methods*, 226, **1999**, 29-41. 79
- Romano L., Scuteri A., Gugliotta T., Romano P., De Luca G., Sidoti A., Amato A., Sulphate influx in the erythrocytes of normotensive, diabetic and hypertensive patients., *Cell Biol Int*, 26, 54

2002, 421-426.

- Romero P.J., Romero E.A., Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells, *Cell Calcium*, 26, **1999**, 131- 137. 48
- Rosenblum B.B., Hanash S.M., Yew N., Neel J.V., Two-dimensional electrophoretic analysis of erythrocyte membranes., *Clin Chem*, 28, **1982**, 925-931. 21
- Royall J.A. and Ischiropoulos H., Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as a fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells, *Arch Biochem Biophys*, 302, **1993**, 348. 78
- Salamino F., Sparatore B., Melloni E., Michetti M., Viotti P.L., Pontremoli S., Carafoli E., The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte. *Cell Calcium*, 15, **1994**, 28-35, 50, 112
- Salvesen G.S., Caspases and apoptosis, in Hooper N. M., *Proteases in biology and medicine*, *Essays Biochem*, 38, **2002**, 9-19. 2
- Salzer U., Hinterdorfer P., Hunger U., Borker C., Prohaska R., Ca²⁺-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin, *Blood*, 99, **2002**, 2569-2577. 21
- Santos-Silva A., Castro E., Teixeira N., Guerra F., Quintanilha A., Altered erythrocyte band 3 profile as a marker in patients at risk for cardiovascular disease., *Atherosclerosis*, 116, **1995**, 199-209. 54
- Sass M.D., Caruso C.J., O'Connell D.J., Decreased glutathione in aging red cells., *Clin Chim Acta*, 11, **1965**, 334-340. 66
- Scatchard G., *Ann NY Acad Sci*, 51, **1949**, 660-672. 76
- Schauer R., Kamerling J.P., In *Glycoproteins, Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 29B, **1997**, 243-402. 23
- Schenkel-Bruner, Human Blood Groups, *Springer, Berlin*, **1995**. 21,22,23
- Schmidt A.M., Vianna M., Gerlach M., Brett J., Ryan J., Kas J., Esposito C., Hegarty H., Hurley W., Clauss M., Wang F., Pan Y. C. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface., *J Biol Chem*, 267, **1992**, 14987-14997. 55
- Schmidt A.M., Yan S.D., Wautier J.L., Stern D., Activation of RAGE : a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis., *Circ Res*, 84, **1999**, 489-497 57
- Schroit A.J., Madsen J., Tanaka Y., *In vivo* recognition and clearance of red blood cells 48

- containing phosphatidylserine in their plasma membranes, *J Biol Chem.*, 260, 1985, 5131-5138.
- Schwarz-Ben Meir N., Glaser T., Kosower N.S., Band 3 protein degradation by calpain is enhanced in erythrocytes of old people., *Biochem J*, 275, **1991**, 47-52. 53
- Scott K.L., Lecak J., Acker J.P., Biopreservation of red blood cells: past, present, and future, *Transfusion Med Rev*, 19, **2005**, 127-142. 60
- Scott M.D., Bradley A.J., Murad K.L., Camouflaged Blood Cells: Low-Technology Bioengineering for Transfusion Medicine?, *Transfusion Medicine Reviews*, 114, **2000**, 53-63. 14
- Seaman G.V., Knox R.J., Nordt F.J., Regan D.H., Red cell aging. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes, *Blood*, 50, **1977**, 1001-1011. 66
- Seghatchian J. Universal leucodepletion: an overview of some unresolved issues and highlights of lessons learned., *Transfus Apheres Sci*, 29, **2003**, 105-117. 12
- Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., Cristofalo V.J., Is betagalactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res*, 257, **2000**, 162-171. 96, 97
- Shinozuka T., Takei S., Watanabe H., Ohkuma S., Affinity of young and old human erythrocytes for alkyl-sepharose 6MB gels., *J Chromatogr*, 375, **1986**, 380-385. 66
- Shinozuka T., Takei S., Yanagida J., Watanabe H., Ohkuma S., Comparative study on the main membrane-surface sialoglycopeptides released from young and old human erythrocytes with trypsin, *Comp Biochem Physiol B*, 89, **1988**, 309-315. 66
- Shinozuka T., Changes in human red blood cells during aging in vivo., *Keio J Med*, 43, **1994**, 155-163. 108
- Simon E.R., Red cell preservation: further studies with adenine, *Blood*, 194, **1962**, 877-878 11
- Simons K. and van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells., *Biochemistry*, 27, **1988**, 6197-6202. 62
- Slee E.A., O'Connor D.J., Lu X., To die or not to die: how does p53 decide?, *Oncogene*, 23, **2004**, 2809-2818. 44
- Sohal R.S., Brunk U.T. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging., *Adv Exp Med Biol*, 266, **1989**, 17-26. 97
- Solheim B.G., O. Flesland, J. Seghatchian, F. Brosstad, Clinical implications of red blood cell and platelet storage lesions: an overview, *Transfusion and Apheresis Science*, 31, **2004**, 185-189. 9
- Sorette M.P., Galili U., Clark M.R., Comparison of serum anti-band 3 and anti-Gal antibody binding to density-separated human red blood cells, *Blood*, 77, **1991**, 628-636. 86

- Sperandio S., Ian de Belle and Dale E. Bredesen, An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death, *PNAS*, 97, **2000**, 14376-14381. 33
- Spring F.A., Parsons S.F., Ortlepp S., Olsson M.L., Sessions R., Brady R.L., Anstee D.J., Intercellular adhesion molecule-4 binds $\alpha_4\beta_1$ and α_V family integrins through novel integrin-binding mechanisms., *Blood*, 98, **2001**, 458-466. 28
- Sterling D., Reithmeier R.A.F., Casey J.R., A transport metabolon: functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers., *J Biol Chem*, 276, **2001**, 47886-47894. 27
- Sugimoto K., Toyoshima H., Sakai R., Miyagawa K., Hagiwara K., Ishikawa F., Takaku F., Yazaki Y., Hirai H., Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines., *Blood*, 79, **1992**, 2378-2383. 44
- Suzuki Y., Nagao Y., Kato H., Matsumoto M., Nerome K., Nakajama K. and Nobusawa E. Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached., *J Biol Chem*, 261, **1986**, 17057-17061. 62
- Suzuki Y.J., Cleemann L., Abernethy D.R., Morad M., Glutathione is a cofactor for H₂O₂-mediated stimulation of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in cardiac myocytes, *Free Radic. Biol Med*, 24/2, **1998**, 318-325. 77
- Szasz Hasitz M., Sarkadi B., Gardos G., Phosphorylation of the Ca²⁺ pump intermediate in intact red cells, isolated membranes and inside-out vesicles., *Mol Cell Biochem*, 22, **1978**, 147-52. 112
- Tait J.F., Gibson D., Measurement of membrane phospholipid asymmetry in normal and sickle-cell erythrocytes by means of annexin V binding, *J Lab Clin Med*, 123, **1994**, 741-748. 48
- Takshita M., Tamura M., Yubisui T., Yoncyama Y., Exponential decay of cytochrome b₅ and cytochrome b₅ reductase during senescence of erythrocytes: relation to the increased met hemoglobin content, *J Biochem Tokyo*, 93, **1983**, 931-934. 66
- Testa U., Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis, *Leukemia*, 18, **2004**, 1176-1199. 33, 59
- Thomas E., al-Baker E., Dropcova S., Denyer S., Ostad N., Lloyd A., Kill I.R., Faraggher R.G., Different kinetics of senescence in human fibroblasts and peritoneal mesothelial cells, *Exp Cell Res*, 236, **1997**, 355-358. 95
- Tringali C., Fiorilli A., Venerando B., Tettamanti G., Different behavior of ghost-linked acidic and neutral sialidases during human erythrocyte ageing, *Glycoconj J*, 18, **2001**, 407-418. 47, 68
- Tsujimoto Y., Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. 40

Biosci Rep, 22, **2002**, 47-58.

- Valeri C.R., Hirsch N.M., Restoration in vivo of erythrocyte adenosine triphosphate, 2,3-diphosphoglycerate, potassium ion, and sodium ion concentrations following the transfusion of acid-citrate-dextrose-stored human red blood cells., *J Lab Clin Med*, 73, **1969**, 722-733. 11
- Vasile E., Tomita Y., Brown L.F., Kocher O., Dvorak H.F., Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/ VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis., *FASEB J*, 15, **2001**, 458-466. 96
- Venerando B., Fiorilli A., Croci G., Tringali C., Goi G., Mazzanti L., Curatola G., Segalini G., Massacesi L., Lombardo A., Tettamanti G., Acidic and neutral sialidase in the erythrocytes of patients with type 2 diabetes, *Blood*, 101, **2003**, 2071. 62
- Venerando B., Fiorilli A., Croci G.L., Tettamanti G., Presence in human erythrocyte membranes of a novel form of sialidase acting optimally at neutral pH, *Blood*, 90, **1997**, 2047-2056. 47,61,64, 65
- Viitala J. and Jarnefelt J., The red cell surface revisited, *Trends Biochem Sci*, **1985**, 392-393. 25
- Vlassara H., Valinsky J., Brownlee M., Cerami C., Nishimoto S., Cerami A., Advanced glycosylation endproducts on erythrocyte cell surface induce receptor-mediated phagocytosis by macrophages. A model for turnover of aging cells, *J Exp Med*, 166, **1987**, 539-549. 55, 130
- Vogt M., Haggblom C., Yeargin J., Christiansen-Weber T., Haas M., Independent induction of senescence by p16INKSa and p21CIP1 in spontaneously immortal human fibroblasts., *Cell Growth Differ*, 9, **1998**, 139-146. 95
- Walls R., Kumar K.S., Hochstein P., Aging human erythrocytes. Differential sensitivity of young and old erythrocytes to hemolysis induced by peroxide in the presence of thyroxine, *Arch Biochem Biophys*, 174, **1975**, 463-468. 66
- Wang K.K., Roufogalis B.D., Villalobo A., Further characterization of calpain-mediated proteolysis of the human erythrocyte plasma membrane Ca²⁺-ATPase., *Arch Biochem Biophys*, 267, **1988**, 317-327. 111
- Wang K.K., Calpain and caspase: can you tell the difference?, *Trends Neurosci*, 23, **2000**, 20-26. 2
- Wang K.K., Villalobo A., Roufogalis B.D., Activation of the Ca²⁺-ATPase of human erythrocyte membrane by an endogenous Ca²⁺-dependent neutral protease., *Arch Biochem Biophys*, 260, 1988, 696-704. 50
- Wang S., Miura J. Y., Jung Y. K., Zhu H., Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE, *Cell*, 92, **1998**, 501-509. 43

- Wang X.M., Terasaki P.I., Rankin G.W. Jr, Chia D., Zhong H.P., Hardy S., A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release, *Hum Immunol*, 37, **1993**, 264-270. 79
- Wautier J.L., Wautier M.P., L'adhérence des érythrocytes à l'endothélium vasculaire, *Transfus Clin Biol*, 6, **1999**, 397-402. 55, 57
- Weed R.I., LaCelle, P. L., Uakow M., Structure and function of the red cell membrane : Changes during storage. *In* The human red cell in vitro (T.J. Greenwalt and G.A. Jamiesen, eds.) Grune and Stratton, New York, **1974**, 65-89. 47
- Weil J., *Biochimie générale*, Masson éd., Paris, **1997**, 232-243 19
- Weil M., Jacobson M.D., Raff M.C., Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes., *J Cell Sci*, 111, **1998**, 2707-2715. 49
- Weng S. and Spiro R.G., Endoplasmic reticulum kifunensine-resistant alpha-mannosidase is enzymatically and immunologically related to the cytosolic alpha-mannosidase., *Arch Biochem Biophys*, 325, **1996**, 113-123. 61
- Werre J.M., Willekens F.L.A., Bosch F.H., De Haan L.D., Van der Vegt S.G.L., Van den Bos A.G., Bosman G.J., The red cell revisited: matters of life and death., *Cell Mol Biol*, 50, **2004**, 139-145. 50, 54
- Weston S.A., Parish C.R., New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies, Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy, *J Immunol Methods*, 133, **1990**, 87-97. 78
- Willekens F.L.A., Bos H.J., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Groenen-Döpp Y.A.M., Van de Plas G.C., Werre J.M., Loss of anticomplement activity from circulating old red cells., *Brit J Haematol*, **1998**, 102:302. 54
- Willekens F.L.A., Bosch F.H., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Groenen-Döpp Y.A.M., Werre J.M., Quantification of loss of haemoglobin components from the circulating red blood cell in vivo., *Eur J Haematol*, 58, **1997**, 246-250. 50
- Willemsen R., Brunken R., Sorber C.W.J., Hoogeveen A.T., Wisselaar H.A., Van Dongen J.M. and Reuser A.J.J., A quantitative immunoelectronmicroscopic study on soluble, membrane-associated and membrane-bound lysosomal enzymes in human intestinal epithelial cells., *Histochem. J*, 23, **1991**, 467-473. 61
- Williamson P., Kulick A., Zachowski A., Schlegel R.A., Devaux P.F., Ca²⁺ induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes., *Biochemistry*, 14, **1992**, 6355-6360. 49
- Winslow R.M., Gonzales A., Gonzales M.L., Magde M, McCarthy M, Rohlf's RJ, Vandegriff KD., Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes, *J Appl Physiol*, 85, **1998**, 993-1003. 15

- Wolf B.B., Green D.R., Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases, *J Biol Chem*, 274, **1999**, 20049-20052. 2
- Wolf B.B., Green D.R., Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases, *J Biol Chem*, 274, **1999**, 20049-20052. 43
- Wolfe J.T., Ross D., Cohen G.M., A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes, *FEBS Lett*, 352/1, **1994**, 58-62. 77
- Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R., Cell death: the significance of apoptosis., *Int Rev Cytol*, 68, **1980**, 251-306. 35
- Xu H.I., Zhou Y., Ji W., Perng G.S., Kruzelock R., Kong C.T., Bast R.C., Mills G.B., Li J., Hu S.X., Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition., *Oncogene*, 15, 1997, 2589-2596. 95
- Yegorov Y.E., Akimov S.S., Hass R., Zelenin A.V., Prudovsky I.A., Endogenous β -galactosidase activity in continuously nonproliferating cells., *Exp Cell Res*, 243, **1998**, 207-211. 95,96,97
- Yoshida H., Kawane K., Koike M., Mori Y., Uchiyama Y., Nagata S., Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells, *Nature*, 437, **2005**, 754-758. 59
- Zachowski A., Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement., *Biochem J*, 294, **1993**, 1-14. 16
- Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Decaudin D., Macho A., Hirsch T., Susin S.A., Petit P.X., Mignotte B. and Kroemer G., Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death, *J Exp Med*, 182, **1995**, 367-377. 39, 77
- Zamzami N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J.-L. Vayssière, P.X. Petit and G. Kroemer , Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med*, 181, **1995**, 1661-1668. 39
- Zhang D., Kiyatkin A., Bolin J.T., Low P.S., Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3., *Blood*, 96, **2000**, 2925-2933. 27
- Zheng T.S., Schlosser S.F., Dao T., Hingorani R., Crispe I.N., Boyer J.L., Flavell R.A., Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95, **1998** , 13618-23. 36
- Ziwei Huang, The Chemical Biology of Apoptosis: Exploring Protein-Protein Interactions and the Life and Death of Cells with Small Molecules, *Chemistry & Biology*, 9, **2002**, 1059-1072. 45

Teck Yew Low¹
Teck Keong Seow²
Maxey C. M. Chung^{1,2}

¹Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine,
National University of Singapore,
Singapore

²Bioprocessing Technology
Centre, National University
of Singapore, Singapore

Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry

A classical proteomic analysis was used to establish a reference map of proteins associated with healthy human erythrocyte ghosts. Following osmotic lysis and differential centrifugation, ghost proteins were separated by either one-dimensional gel electrophoresis (1-DE) or two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Selected protein bands or spots were excised and trypsinized before mass spectrometric analyses and data mining was performed using the SWISS-PROT and NCBI nonredundant databases. A total of 102 protein spots from a 2-D gel were successfully identified. These corresponded to 59 distinct polypeptides with the remaining 43 being isoforms. As for the 1-D gel, 44 polypeptides were identified, of which 19 were also found on the 2-D gel. Most of the 19 common polypeptides were membrane cytoskeletal proteins that are often referred to as the "band" proteins. The remaining 25 polypeptides that were found exclusively on 1-D gels were proteins with high hydrophobicity (e.g., sorbitol dehydrogenase and glucose transporter) and high molecular mass (e.g., Kell blood group glycoprotein and Janus-kinase 2). A higher number of signaling proteins was also identified on 1-D gels compared to 2-D gels. These included Ras, cAMP dependent protein kinase and TGF-beta receptor type 1 precursor.

Keywords: Human erythrocyte membrane protein / Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / One-dimensional gel electrophoresis / Two-dimensional gel electrophoresis
PRO 0279

1 Introduction

Due to its mechanical strength and flexibility, the erythrocyte plasma membrane allows the mature erythrocyte to traverse the vascular system while maintaining the biconcave cell shape for maximal gaseous exchange. Besides, the plasma membrane also serves to isolate cell content from the exterior, as well as regulating intracellular cation concentrations and interacting with the environment *via* the membrane receptors.

It has been postulated that 30% of total cellular proteins are transmembrane proteins based on the completed genome sequences [1, 2]. Membrane proteins are both challenging and interesting for proteomic studies as they are under-represented on 2-D gels, due not only to their

low concentrations and high hydrophobicities, but also to their generally basic pI/s [3]. Erythrocyte membrane associated proteins were chosen for our study because they are readily available in large quantities and had been well characterized biochemically in earlier studies. Secondly, a reference erythrocyte membrane 2-D/1-D map is potentially useful for expression profiling studies of red blood cell related diseases since the mature erythrocyte does not have a transcriptome.

A number of papers have been published on the applications of 2-DE to separate and catalogue erythrocyte membrane proteins [4–10] since the 1970's. However, different methods and results have been documented, notably in the solubilization, electrophoretic patterns, resolution, number of spots and methods for identification of protein spots [9]. However, in the last 5 years, the technology for protein separation and identification has improved considerably due mainly to (1) the development of IPG strips [11] which are capable of giving reproducible spot positions, (2) the use of sensitive silver staining for spot detection [12], (3) the advent of biological mass spectrometry [13, 14]; and (4) the availability of bioinformatics databases that enable rapid identification of proteins.

Correspondence: Assoc. Prof. Dr. Maxey C. M. Chung, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National University of Singapore, 10 Kent Ridge Crescent, Singapore 119260
E-mail: bchcm@nus.edu.sg
Fax: +65-6779-1453

Abbreviations: GRAVY, grand average of hydrophobicity; PMF, peptide mass fingerprint

Nous avons contribué à la mise en place d'une série de tests de cytométrie en flux destinés à évaluer la viabilité des hématies destinés à se substituer aux procédés classiques de dosage de l'ATP et du 2,3-DPG. Nous sommes intéressée en particulier à une méthode à la calcéine-AM (un ester acétoxyméthyl de la fluorescéine) et sommes parvenue à la conclusion qu'il représentait un test de choix en raison de sa simplicité, de sa sensibilité et de sa fiabilité.

Dans le domaine de la recherche fondamentale nous avons démontré que le test cytochimique de Dimri *et al.* (1995) de détection de l'activité β -galactosidasique à l'aide du substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, est certes valable pour l'étude de l'enzyme cytosolique des cellules nucléées, mais qu'il ne l'est pas pour celle de l'enzyme membranaire érythrocytaire car il annonce, d'une manière artefactuelle, une augmentation de son activité. En effet, la mesure de cette dernière par la méthode biochimique fondée sur l'emploi de l'umbelliféryl- β -D-galactoside qui exclut tout artefact, démontre, au contraire, une diminution de l'activité de l'enzyme chez les hématies physiologiquement ou artificiellement vieilles. En conséquence, à l'inverse des résultats obtenus avec les cellules nucléées, la diminution de l'activité β -galactosidasique devient un marqueur de sénescence des hématies.

Dans le domaine de la transfusion nous avons démontré que la clairance rapide des hématies transfusées (70% au terme de 3 jours) était liée à la transformation des discocytes en sphérocytes, seuls phagocytés et détectés par la microscopie électronique de balayage, transformation provoquée par la glycation des protéines érythrocytaires induite par le glucose ajouté aux milieux de conservation des hématies (9g par litre soit 10 fois la glycémie). En outre, nous avons démontré que l'utilisation de l'automate MacoPharma ABC® imaginé et brevetée par la Société MacoPharma de Tourcoing pour effectuer le prélèvement des sangs à hémato-crite constant, est un réel progrès car il protège les hématies du stress provoqué par le pH acide (5,5) des milieux de prélèvement.