

6. Discussion

6.1 L'hémine influence l'expansion et la viabilité des cellules de leucémie myéloïde chronique K562

Afin d'évaluer les effets de l'hémine sur les cellules en culture, nous avons débuté nos expérimentations avec un test de dose réponse d'hémine sur les cellules K562. Les cellules K562 sont des cellules cancéreuses ayant un excellent potentiel prolifératif et sont un modèle de différenciation érythroïde. Nous avons donc décidé de tester deux concentrations basées sur la littérature, soit 30 μ M d'hémine et 100 μ M d'hémine.

Il a été démontré par d'autres équipes que l'hémine induit la production d'hémoglobine chez les cellules K562 [32]. Nous avons donc supposé que l'observation qualitative des culots de cellules K562 traitées ou non avec l'hémine pourrait nous permettre de déterminer si l'hémine que nous utilisions était active et adéquate pour nos expérimentations ultérieures. Tel que prédit, nos observations suggèrent qu'il y a augmentation de la production d'hémoglobine, puisque les cellules en culture traitées à l'hémine étaient caractérisées par une couleur rouge produite après quelques jours de traitement (Figure 5.2). Effectivement, la pigmentation rouge des cellules traitées à l'hémine permet de supposer que l'hémine accélère la différenciation érythroïde des cellules K562, par l'induction de la production d'hémoglobine. Par contre, cette observation est de nature qualitative, elle ne permet donc pas de valider que la pigmentation rouge est effectivement causé par l'augmentation dans la production d'hémoglobine et ne nous indique pas la nature de l'hémoglobine possiblement produite. Tout de même, ces observations sont en accord avec la littérature et suggèrent que l'hémine utilisée semble exercer certains effets attendus.

Pour ce qui est des résultats sur la prolifération cellulaire, les résultats de la figure 5.1 suggèrent tout d'abord un effet négatif de l'hémine sur l'expansion des cellules K562, effet qui n'avait pas été documenté auparavant. Cet effet est d'ailleurs amplifié lorsque la concentration d'hémine est plus importante. En effet, les résultats de la figure 5.1 suggèrent aussi que la concentration d'hémine de 100 μ M semble avoir des effets néfastes majeurs sur la viabilité et la prolifération des cellules K562. Effectivement, après 5 jours de traitement, les cellules n'ont pas du tout proliféré. Un effet sur la viabilité est également notable et corrèle avec cette observation.

Comme nous avons vu un effet inattendu de l'hémine sur l'expansion et la viabilité des cellules K562 dans l'expérimentation précédente, nous avons décidé de poursuivre les essais sur les cellules K562, afin de mieux comprendre les effets de l'hémine sur ces cellules. De plus, Héma-Québec s'intéresse à l'effet de l'hyperthermie légère sur les différents processus de l'hématopoïèse. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de l'hémine sur les cellules K562 dans des conditions normales de culture, en plus d'évaluer l'effet combiné de l'hémine et de l'hyperthermie légère sur ces cellules cancéreuses. Les résultats obtenus lors de cette expérimentation indiquent aussi que l'hémine a un effet négatif sur la viabilité et l'expansion des cellules K562 cultivées dans des conditions normales. Ces résultats indiquent aussi qu'en condition d'hyperthermie légère, l'hémine affecte davantage la viabilité des cellules K562 par rapport aux conditions normales. Tout comme pour la viabilité, l'expansion des cellules K562 est davantage altérée par l'hémine dans les conditions d'hyperthermie légère. Ainsi, il est possible de conclure qu'un traitement à l'hémine semble ralentir la croissance des cellules K562 et affecte négativement leur viabilité. Ces effets sont d'ailleurs accentués lorsque le traitement à l'hémine est combiné avec l'hyperthermie. Il semblerait donc l'hyperthermie agit de concert avec l'hémine en affectant négativement la viabilité et l'expansion des cellules K562.

Pour mieux comprendre le mécanisme de cette répression de croissance et de viabilité causé par l'hémine chez les cellules K562, un sous-projet [67] a été mené par une stagiaire de notre équipe. En bref, les résultats obtenus indiquent que les cellules traitées à l'hémine expriment moins la protéine de translocation BCR-ABL, responsable de la signalisation clé pour la survie et la prolifération des cellules K562. Une meilleure compréhension de cette signalisation lors d'un traitement à l'hémine combiné à l'hyperthermie légère pourrait éventuellement mener au développement de thérapies alternatives pour la leucémie myéloïde chronique.

6.2 L'hémine influence l'expansion et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon

Le but premier de cette maîtrise était d'évaluer les effets de l'hémine sur les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon. Nous avons tout d'abord débuté nos expérimentations dans le milieu de culture maison Héma-Québec, qui favorise la différenciation érythroïde. D'abord, ce protocole de culture favorise l'expansion érythroïde quasi pure, puisque plus de 92% des cellules expriment le marqueur érythroïde CD71 après 21 jours de culture. Les résultats de la figure 5.6 indiquent tout d'abord que l'hémine accentue de façon assez importante, soit entre 2 et 8 fois plus, l'expansion totale des précurseurs érythroïdes en différenciation érythroïde, contrairement à ce qui a été observé chez les cellules K562. L'hémine semble donc stimuler la croissance des cellules particulièrement lors de leur différenciation érythroïde. Cet effet positif de l'hémine sur la croissance des cellules érythroïdes est d'ailleurs une tendance observée entre les deux essais effectués. Par contre, on remarque que l'expansion cumulée totale varie entre les deux essais indépendants présentés dans ce document. Cela est probablement causé par le fait que les deux cultures ont été effectuées avec des pools de cellules CD34+ différents, puisque autrement, ces deux essais ont été effectués dans des conditions de culture similaires.

L'expansion des cellules érythroïdes exprimant le marqueur CD235 a aussi été évaluée suite aux analyses de cytométrie en flux. Il a été remarqué qu'après 25 jours de culture, la majorité des cellules, soit plus de 75%, exprimaient le marqueur CD235a et ce pour chacune des conditions. Par contre, après plus de 25 jours de culture, le pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD235a diminuait, alors qu'il aurait dû continuer d'augmenter. Cette situation s'est avérée être anormale et résultait d'un problème technique, ce qui diminuait la fiabilité de cette analyse, particulièrement en fin de culture. Le problème était causé par le fait que de plus en plus de cellules expriment le marqueur CD235a au cours de la culture, ce qui cause une agglutination avec l'anticorps anti-CD235 utilisé dans le cadre des analyses de cytométrie en flux. Le problème a été résolu ultérieurement par l'équipe de recherche, suite à mon départ en rédaction, en diluant l'anticorps 1 :100. Ainsi, les résultats présentés dans ce mémoire ont été limités par ce problème, c'est pourquoi davantage d'emphase a été mise sur les analyses morphologiques par coloration et ainsi que sur les analyses de la prolifération

cellulaire totale et non sur l'analyse de l'expansion des cellules exprimant le marqueur CD235a.

De plus, les résultats de la figure 5.5 semblent indiquer que l'hémine augmente la différenciation érythroïde des cellules. Effectivement, les cellules traitées à l'hémine expriment davantage le marqueur CD235a au fil du temps. Ainsi, il semblerait que l'hémine stimule la croissance cellulaire, tout en favorisant la différenciation érythroïde.

Aussi, on remarque à la figure 5.6 et au tableau 5.1 qu'un traitement continu à l'hémine semble influencer positivement la croissance des cellules. Cet effet est tout de même notable par rapport aux contrôles que vers le 14^e jour de culture. De plus, les résultats de la figure 5.5 montrent qu'au jour 14, les cellules traitées à l'hémine semblent expriment davantage le marqueur CD235a et sont donc plus avancées dans le processus de différenciation érythroïde. Aussi, lors du cas clinique présenté dans ce mémoire, la patiente avait une accumulation importante de précurseurs érythroïdes dans sa moelle osseuse, résultant entre autres, en une baisse du nombre d'érythrocytes en circulation et ainsi que du taux d'hémoglobine. Plus particulièrement, l'anticorps anti-Gerbich 3 empêchait les cellules au stade d'érythroblaste acidophile de poursuivre leur différenciation et leur maturation finale en réticulocytes. Selon les hypothèses avancées par le médecin traitant d'Héma-Québec, le Normosang aurait contribué à enclencher la reprise de la différenciation des précurseurs érythroïdes bloqués au stade d'érythroblaste acidophile. Tout cela portait donc à croire que ce sont les cellules érythroïdes qui répondent à l'hémine et pas nécessairement les cellules souches présentes en début de culture seulement.

Les résultats présentés dans la figure 5.9 semblent indiquer que, tel qu'attendu, un traitement à l'hémine plus tard en culture, soit au jour 11 de culture, donc sur des cellules engagées dans l'érythropoïèse, accentue aussi leur expansion. Effectivement, l'expansion des cellules totales est positivement influencée lorsque les cellules sont traitées à l'hémine. Donc l'hémine accélère la croissance des précurseurs érythroïdes et semble suggérer que les cellules plus engagées dans l'érythropoïèse répondent à l'hémine. Ainsi, cette expérimentation suggère que l'hémine tend à avoir un effet positif sur la croissance des cellules en cours de différenciation érythroïde, particulièrement sur les précurseurs érythroïdes et pas nécessairement directement sur les cellules souches hématopoïétiques.

De plus, l'hémine ajoutée plus tard en cours de culture semble avoir un léger effet positif sur la différenciation des précurseurs érythroïdes. En effet, l'expression du marqueur CD235a est augmentée modestement à la surface des cellules traitées à l'hémine. Cela suggère que l'hémine agit particulièrement sur la croissance des précurseurs érythroïdes.

Cependant, cette analyse se base sur des observations provenant d'une expérimentation effectuée qu'une seule fois. On ne peut donc pas conclure de façon certaine. Par contre, le résultat obtenu est en accord avec la tendance préalablement observée.

Aussi, contrairement à ce qui a été observé chez les K562, les résultats obtenus lors de ces différentes expérimentations indiquent que l'hémine n'influence pas négativement la viabilité des cellules. D'ailleurs, selon les résultats obtenus, il semblerait que l'hémine contribue même à maintenir la viabilité des cellules en cours de différenciation érythroïde, lorsque qu'on note par exemple des diminutions dans les conditions contrôles.

Le mécanisme par lequel l'hémine contribue à favoriser différenciation des cellules érythroïdes, à accentuer leur croissance et à maintenir leur viabilité tout au long de ces processus semble difficile à cerner. Il est connu que l'hémine agit entre autres à titre de régulateur transcriptionnel [27-30, 32]. Il est aussi connu que l'hémine conduit à l'augmentation de l'expression de la globine, augmentant la production d'hémoglobine dans les cellules K562 [32]. Cela permet ainsi de supposer que l'hémine engendrerait aussi la production de globine chez les cellules souches différenciant dans la voie érythroïde. Cette augmentation dans la production d'hémoglobine accentuerait la différenciation érythroïde des cellules, tout en stimulant leur croissance. Pour valider cette hypothèse, nous avons voulu quantifier la production globine. Pour ce faire, nous avons procédé à des analyses moléculaires de RT-qPCR ciblant l'ARN messager de la globine alpha, de la globine beta et de la globine gamma. Ces analyses se sont avérées plus complexes que prévu. Étant donné que nous étudions des cellules en cours de différenciation sur une longue période de temps et dans diverses conditions, il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre le traitement à l'hémine et l'augmentation de l'ARN messager codant pour les diverses globines. Nous nous sommes donc tournés vers des analyses de Western Blot, ciblant directement la globine alpha, la globine beta, ainsi que la globine gamma. Ces analyses ont permis de valider jusqu'à

présent les effets positifs de l'augmentation de la quantité de globine dans les K562, mais pas dans les CSH en culture.

Enfin, les analyses par coloration Wright-Giemsa, nous ont permis de suivre l'état morphologique des cellules tout au long de la culture, venant confirmer que le milieu de culture maison Héma-Québec permet aux cellules de passer par tous les stades de la différenciation érythroïde. Par contre, nous avons constaté une certaine hétérogénéité des stades de différenciation au cours des jours, ce qui a compliqué l'analyse. Bien qu'une certaine hétérogénéité soit normale, il est possible qu'elle ait été accentuée par le fait que des cellules de plusieurs donneurs avaient été combinées pour procéder à nos expérimentations. Ainsi, nos observations de l'état morphologique ne nous ont pas permis d'observer des différences en ce qui concerne la morphologie et donc de l'état de différenciation entre les conditions. Il faudrait donc procéder à une analyse morphologique plus détaillée afin d'obtenir plus d'indications sur les possibles effets de l'hémine sur la différenciation érythroïde.

Tout de même, l'énumération des cellules nucléées et énucléées montre que l'hémine semble accentuer l'énucléation des cellules, ce qui a été observé lorsque le SCF a été retiré du milieu de culture afin de favoriser l'énucléation. Le traitement à l'hémine semble donc contribuer à l'accélération de la différenciation érythroïde et contribuer à la maturation en réticulocytes dans ces conditions de culture.

Les observations effectuées dans le cadre de cette maîtrise ne permettent pas à ce stade de bien comprendre le mécanisme d'action de l'hémine. Plus particulièrement, il est difficile d'expliquer l'impact thérapeutique du Normosang chez la patiente du cas clinique présenté dans le présent document. Par contre, il est possible de supposer que selon les résultats obtenus jusqu'à présent, le Normosang aurait probablement particulièrement agité sur les cellules érythroïdes de la patiente et non sur les cellules souches en amont de ce processus de différenciation. Il est probable que l'hémine, via un certain mécanisme d'action, ait contribué à compétitionner ou modifier la liaison de l'anticorps anti-Gerbich 3 sur le récepteur de la glycophorine C, responsable dans ce cas, de l'inhibition de la différenciation érythroïde. L'hémine aurait ainsi contribué à lever ce mécanisme d'inhibition de la

différenciation. Dans cet ordre d'idée, il serait intéressant de procéder à des expérimentations avec des cellules en différenciation érythroïde en présence d'un anticorps anti-glycophorine C, afin de venir reproduire les conditions retrouvées chez la patiente, et ce en présence d'hémine, afin de venir évaluer cette hypothèse.

Aussi, tel que mentionné précédemment, il est probable que l'hémine ait contribué à augmenter la production d'hémoglobine dans les cellules érythroïdes de la patiente, favorisant ainsi la différenciation érythroïde des cellules. On peut ainsi penser que ce phénomène aurait permis aux cellules de prendre le dessus sur l'inhibition de la différenciation causé par la liaison de l'anti-Gerbich 3 sur les cellules. C'est pourquoi il est essentiel de poursuivre et de peaufiner les analyses de Western Blot, afin de venir valider ou infirmer cette hypothèse.

Ainsi, pour l'instant, les résultats obtenus laissent croire que l'hémine aurait un rôle à jouer dans la prolifération et la différenciation érythroïde et donc que le Normosang engendrerait de tels effets lorsqu'administré dans le cadre d'un traitement thérapeutique.

6.3 Perspectives

Bien que cette maîtrise ait réussi à répondre à certaines questions, il reste encore beaucoup à faire. En effet, ce projet de maîtrise avait pour but d'évaluer les effets de l'hémine sur l'expansion et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Il est d'ailleurs possible d'atteindre l'énucléation des cellules érythroïdes et ainsi obtenir des réticulocytes en culture de façon légèrement accrue en présence d'hémine. Cet effet est tout à fait intéressant, mais il faudrait procéder à une meilleure caractérisation de cette étape de culture. Tout d'abord, il faudrait procéder à une meilleure détermination du taux d'énucléation des cellules, par exemple par cytométrie en flux. Ceci permettra une meilleure caractérisation des effets de l'hémine sur ce phénomène, au lieu d'avoir recours au compte de cellules sur lames.

De plus, depuis quelques années, plusieurs équipes se sont penchées sur le développement d'une méthode de culture efficace pour la production de globules rouges *in vitro*. Luc Douay

et son équipe ont développé un milieu de culture pour la production de globules rouges *in vitro* à partir des cellules souches mobilisée du sang périphérique : l'*Erythroid differentiation medium* (EDM). Ce protocole favorise une expansion importante des cellules souches hématopoïétiques en plus de favoriser une différenciation érythroïde par phase. Étant donné que nos résultats précédents suggèrent que l'hémine contribue à accélérer la différenciation, ainsi qu'accentuer la croissance des précurseurs érythroïdes, nous avons donc pensé qu'il serait souhaitable de confirmer ou infirmer ces effets dans un milieu de culture plus riche et davantage optimisé. Le milieu de culture maison Héma-Québec a donc été comparé avec le milieu EDM dans le cadre de cette maîtrise.

Globalement, les expériences dans ce milieu de culture ont été peu investiguées. Aussi, des problèmes techniques ont été rencontrés. Entre autres, de faibles résultats d'énucléation ont été observés et peuvent être expliqués par une difficulté de nature technique. En effet, il est publié que le milieu EDM devrait favoriser l'énucléation d'environ 80% des cellules [55]. Il n'a pas été possible d'observer un taux d'énucléation aussi élevé dans nos cultures. Ceci peut possiblement être expliqué par le fait qu'une quantité résiduelle substantielle de SCF était présente dans le milieu de culture lors de la phase d'énucléation, ce qui freinerait ce processus. Il aurait fallu centrifuger les cellules afin de retirer complètement le SCF du milieu en le changeant de phase.

Ce projet de maîtrise amène aussi de nouvelles hypothèses, par exemple que les effets de l'hémine pourraient être plus évidents lorsque les cellules sont en quelque sorte malades ou endommagées, comme c'est le cas de la patiente présentée dans le cas clinique, ou non nourries de façon optimale en laboratoire.

Enfin, il a été démontré dans le cas clinique, que suite au traitement de la patiente au Normosang, les médecins ont observé une hausse du nombre de plaquettes. Cet effet n'était pas prévu et demeure inexplicable pour l'instant. Dans le cadre de cette maîtrise, le rôle de l'hémine lors de la mégacaryopoïèse n'a pas été évalué. Il est légitime de penser que l'hémine pourrait aussi influencer ce processus. Ainsi, on peut penser que l'hémine a un rôle important à jouer dans les voies de différenciation myéloïde et donc que les progéniteurs myéloïdes communs pourraient aussi être sensibles à l'hémine. Il serait donc intéressant d'explorer

l'effet de l'hémine sur les progéniteurs myéloïdes communs et les mégacaryocytes, afin de déterminer si l'hémine a effectivement un effet sur les mégacaryocytes.

[MCours.com](https://www.mycours.com)