

## 5. Résultats

### 5.1 Effet de l'hémine sur les cellules modèles K562

#### 5.1.1 Dose réponse

Étant donné que l'obtention du Normosang n'est pas possible pour la recherche, l'hémine commerciale de source porcine a principalement été utilisée dans le cadre de cette maîtrise. Les différences entre ces deux produits résident dans le fait que le Normosang est composé d'hémine humaine, ainsi que d'arginine, d'éthanol 96% (v/v), de propylène glycol et d'eau. Ces composés facilitent la dissolution et la stabilisation de l'hémine, ainsi que l'injection intraveineuse au patient [35]. L'hémine disponible commercialement pour la recherche se trouve sous forme de poudre. Selon le manufacturier, l'hémine est un groupe prosthétique contenant un atome de fer et est soluble dans divers composés, dont le DMSO [65]. Les tests préliminaires de dose réponse sur les cellules K562 ont été effectués avec de l'hémine bovine, étant donné qu'à ce stade préliminaire de cette expérimentation, l'hémine porcine n'était pas disponible au laboratoire. Nous avons choisi de resuspendre l'hémine obtenue commercialement dans le DMSO, dans lequel l'hémine est soluble. Le premier enjeu était de bien dissoudre l'hémine tout en considérant l'effet potentiellement toxique du DMSO. En effet, il est souhaitable de demeurer sous les 0,1% de DMSO dans les cultures et d'utiliser une même concentration de DMSO dans un échantillon contrôle. Il a donc fallu déterminer premièrement à quelle concentration d'hémine nous désirions travailler pour bien en mesurer ses effets. Dans la littérature, la concentration d'hémine pour le traitement des cellules en culture varie entre 20 $\mu$ M et 200 $\mu$ M [31, 32, 37, 41-44, 62, 66]. Étant donné cette large plage de concentrations, il s'est avéré essentiel d'évaluer la concentration optimale d'hémine dans nos conditions expérimentales avec les cellules K562, qui sont des cellules ayant un bon potentiel prolifératif et constituent un modèle de différenciation érythroïde.

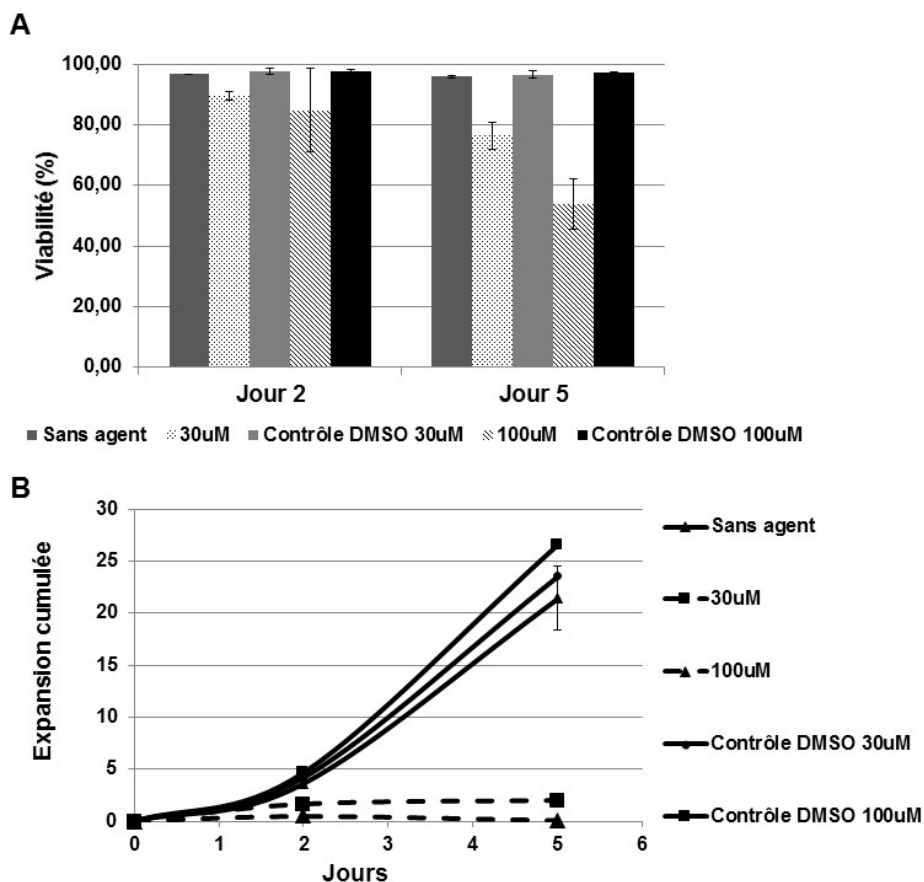
Les cellules K562 ont été mises en culture dans le milieu RPMI-1640 supplémenté en FBS dans des conditions de culture type (37°C et 5% CO<sub>2</sub>). Les cellules ont été traitées avec 30 $\mu$ M ou 100 $\mu$ M d'hémine bovine (Sigma-Aldrich), ce qui semblait être deux concentrations assez représentatives de la littérature. Un contrôle sans agent, ainsi que deux contrôles DMSO représentatifs des conditions de 30 $\mu$ M et de 100 $\mu$ M à l'égard du pourcentage final de DMSO ont été ajoutés à l'expérimentation. Le contrôle DMSO est essentiel, puisque le DMSO peut

influencer la prolifération et la différenciation cellulaire. Il est donc important de s'assurer que le DMSO ne représente pas un facteur pouvant influencer les variables mesurées, soit l'expansion et la différenciation. La culture cellulaire a été réalisée sur une période de 5 jours. Le but de cette expérimentation était de déterminer la concentration d'hémine à utiliser lors de nos expérimentations et de valider que l'hémine resuspendue dans le DMSO est active.

La viabilité des cellules K562, ainsi que leur expansion en présence de différentes concentrations a été suivie tout au long de la culture (Figure 5.1). Les résultats de viabilité suggèrent une importante baisse de viabilité des cellules K562 traitées à l'hémine au jour 5 de culture. En effet, on remarque une baisse de viabilité des cellules traitées avec 100 $\mu$ M d'hémine, avec une viabilité de  $54 \pm 8\%$ , comparativement aux cellules traitées avec 30 $\mu$ M d'hémine qui est de  $76 \pm 5\%$  et aux contrôles sans agent, DMSO 30 $\mu$ M et DMSO 100 $\mu$ M qui est de  $96 \pm 1\%$ ,  $97 \pm 1\%$  et  $97 \pm 0,5\%$  respectivement (Figure 5.1 A). Les résultats d'expansion (Figure 5.1 B) suggèrent que l'hémine, peu importe la concentration, affecte négativement l'expansion cumulée des cellules K562, tel qu'attendu en présence d'une baisse de viabilité. Effectivement, après 5 jours de culture, l'expansion cumulée totale des cellules traitées à 30 $\mu$ M d'hémine est 12 fois plus faible que le contrôle DMSO 30 $\mu$ M (Figure 5.1 B). Cette différence est davantage marquée chez les cellules traitées à 100 $\mu$ M d'hémine. Ainsi, après 5 jours de culture, l'expansion cumulée totale des cellules traitées avec 100 $\mu$ M d'hémine est 28 fois plus faible que l'expansion cumulée totale des cellules traitées avec 30 $\mu$ M d'hémine (Figure 5.1 B).

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'hémine est active et semble influencer négativement la prolifération des cellules K562, ce qui à notre connaissance n'est pas décrit dans la littérature. Un traitement de 100 $\mu$ M diminue de façon considérable la viabilité et le potentiel prolifératif des cellules. Par ailleurs, comparativement à un traitement avec 100 $\mu$ M d'hémine, un traitement avec 30 $\mu$ M d'hémine semble permettre de maintenir une certaine viabilité des cellules, ainsi qu'une prolifération cellulaire. Le but de cette maîtrise était d'évaluer les effets de l'hémine sur des cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon ayant un moins bon potentiel prolifératif que les cellules K562. Sachant cela et étant donné que la concentration de 100 $\mu$ M d'hémine affectait considérablement la prolifération et la viabilité des cellules par rapport à une concentration d'hémine de 30 $\mu$ M, il a été décidé que la concentration de 30 $\mu$ M serait ainsi plus optimale pour nos expérimentations. Enfin, nous aurions pu procéder à une

expérimentation de dose réponse avec des concentrations d'hémine plus faibles que 30 $\mu$ M, pour évaluer si des concentrations plus faible d'hémine pouvaient aussi avoir des effets sur les cellules étudiées. Par contre, une concentration d'hémine de 30  $\mu$ M a été utilisée pour poursuivre nos expérimentations.



**Figure 5.1 Effet de différentes concentrations d'hémine sur l'expansion et la viabilité des cellules K562**

Les cellules K562 ont été cultivées pour tester 2 concentrations différentes d'hémine. La viabilité (A) et l'expansion cumulée (B) ont été déterminées aux jours 2 et 5. \*Les barres d'erreurs sont présentes pour chacune des conditions.

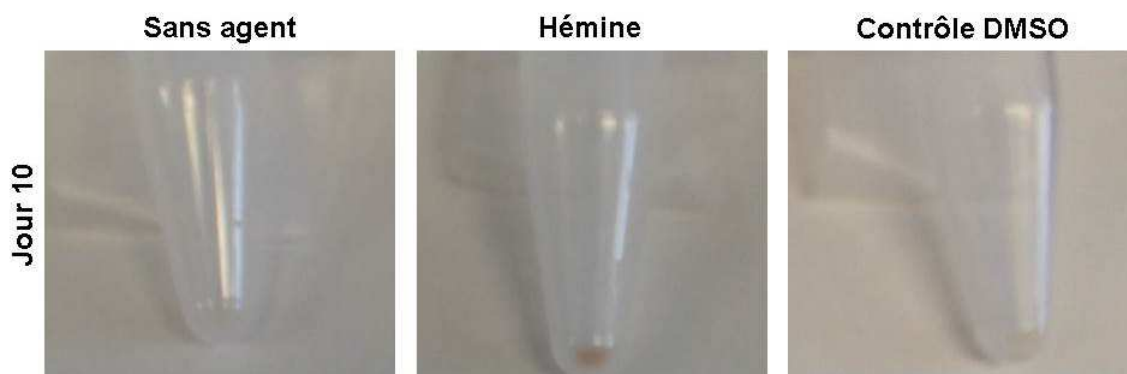
### 5.1.2 Impact du traitement à l'hémine sur la production d'hémoglobine et la différenciation érythroïde des cellules K562

L'hémine est entre autres connue pour induire la production d'hémoglobine chez les K562 [32, 42, 44]. Ainsi, nous voulions confirmer que nous étions en mesure de reproduire cet effet

avec l'hémine que nous utilisons dans notre modèle de culture. Cette expérimentation a d'ailleurs été effectuée afin de vérifier que l'hémine était active et induisait la production d'hémoglobine, synonyme de différenciation érythroïde.

Les cellules K562 ont été mises en culture en présence de 30 $\mu$ M d'hémine porcine. Des contrôles sans agent et DMSO ont été inclus à l'expérimentation. La culture cellulaire a été réalisée sur une période de 10 jours, au terme de laquelle des culots cellulaires ont été récoltés et observés.

L'observation des culots cellulaires a permis d'évaluer la production d'hémoglobine (Figure 5.2). Il a été possible d'observer que les cellules traitées à l'hémine possèdent une pigmentation rouge, comparativement aux contrôles qui possèdent une pigmentation blanchâtre (Figure 5.2). Tel qu'attendu, l'analyse qualitative des culots cellulaires suggère qu'il y a augmentation dans la production d'hémoglobine au jour 10 par les cellules K562 traitées à l'hémine. Cette observation confirme aussi qu'il y a un effet de l'hémine à une concentration de 30 $\mu$ M. Cette observation suggère donc que l'hémine accentue la maturation érythroïde des cellules K562 en induisant la production d'hémoglobine.



**Figure 5.2 Impact d'un traitement à l'hémine sur la production d'hémoglobine chez les K562**

Images représentatives de deux cultures indépendantes de culots cellulaires obtenus au jour 10 d'une culture de cellules K562 en présence de 30 $\mu$ M d'hémine porcine. La pigmentation rouge des cellules des culots suggère une production d'hémoglobine par les cellules K562.

### 5.1.3 Comparaison de l'effet de l'hémine sur les cellules K562 en conditions de culture normales et en conditions d'hyperthermie légère

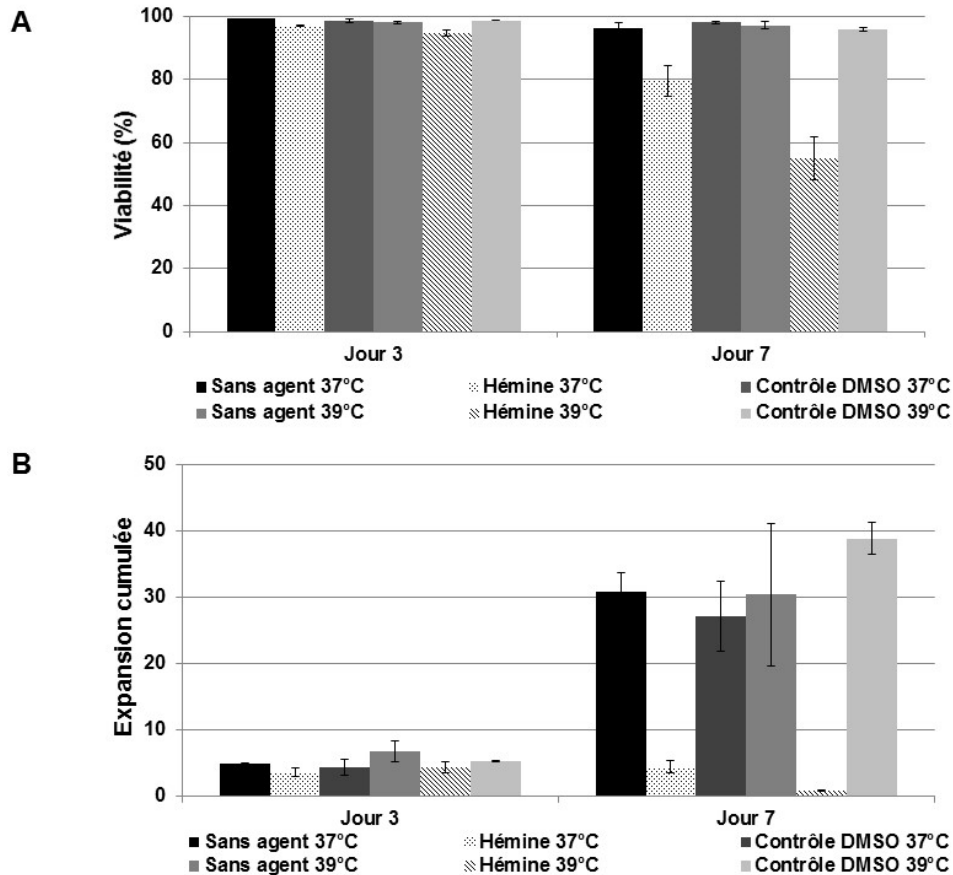
Étant donné les résultats préliminaires quelque peu inattendus démontrant que l'hémine semble influencer négativement l'expansion et la viabilité des cellules K562 (Figure 5.1), nous nous sommes intéressés plus en profondeur à cet effet. De plus, Héma-Québec s'intéresse à la culture cellulaire en hyperthermie légère étant donné ses effets positifs sur l'expansion et la différenciation des progéniteurs myéloïdes [11, 57, 58]. Il nous a semblé intrigant et important de tester l'effet de l'hémine dans des conditions d'hyperthermie légère sur des cellules cancéreuses d'origine myéloïde, les K562. Ainsi, cette expérimentation avait pour but de mieux comprendre l'effet de l'hémine sur l'expansion des cellules K562 en condition normale et d'évaluer l'effet de l'hémine sur l'expansion des cellules K562 en condition d'hyperthermie légère.

Les cellules K562 ont été mises en culture dans le milieu RPMI-1640 supplémenté en FBS en présence de 30 $\mu$ M d'hémine porcine dès le début de la culture avec les contrôles sans agent et DMSO. La culture cellulaire a été réalisée sur une période de 7 jours. Les cultures ont été réalisées en parallèle dans des conditions de culture normales (37°C et 5% CO<sub>2</sub>) et en condition d'hyperthermie légère (39°C et 5% CO<sub>2</sub>).

La viabilité et l'expansion des cellules K562 en présence d'hémine a été suivie tout au long de la culture (Figure 5.3). Tout d'abord, au jour 3 de culture, le traitement à l'hémine n'affecte pas la viabilité cellulaire autant à 37°C qu'à 39°C, puisque la viabilité pour toutes les conditions se situe au-delà de 95% (Figure 5.3 A). Par contre, au jour 7 de culture, on remarque que la viabilité des cellules traitées à l'hémine à 37°C et à 39°C est affectée négativement. Effectivement, la viabilité des cellules traitées à l'hémine à 37°C est de 79  $\pm$  5%, comparativement au contrôle sans agent qui est de 96  $\pm$  2% et au contrôle DMSO qui est de 98  $\pm$  0,5% (Figure 5.3 A). Cet effet est d'ailleurs accentué à 39°C, puisque la viabilité des cellules traitées à l'hémine est de 55  $\pm$  7% comparativement au contrôle sans agent qui est de 97  $\pm$  1% et au contrôle DMSO qui est de 96  $\pm$  1% (Figure 5.3 A). La viabilité des contrôles sans agent et DMSO est similaire tout au long de la culture dans les deux conditions (Figure 5.3 A), ce qui permet de confirmer que la baisse de viabilité des cellules K562 est causé uniquement par l'hémine.

De plus, les résultats confirment une fois de plus l'effet négatif du traitement à l'hémine sur l'expansion des cellules K562 (Figure 5.3). On remarque au jour 3 de culture, que l'hémine n'a pas encore d'effet sur l'expansion autant à 37°C qu'à 39°C (Figure 5.3 B). Par contre, au jour 7 de culture, l'expansion cumulée des cellules traitées à l'hémine est 6 fois moins élevée que le contrôle DMSO à 37°C (Figure 5.3 B). Cet effet est accentué à 39°C tout comme pour la viabilité, puisque l'expansion cumulée des cellules traitées à l'hémine est 47 fois moins élevée par rapport au contrôle DMSO dans des conditions d'hyperthermie légère (Figure 5.3 B). D'ailleurs, l'expansion des contrôles sans agent et DMSO est similaire tout au long de la culture dans les deux conditions (Figure 5.3 B), ce qui permet de confirmer que le DMSO n'a pas d'effet sur l'expansion des cellules K562 et donc que l'effet observé est un effet spécifique du traitement à l'hémine.

Ces résultats montrent que l'hémine semble avoir comme tendance de diminuer la viabilité des cellules K562 et que ce phénomène est accentué en condition d'hyperthermie légère. Ces résultats montrent aussi que l'hémine semble avoir comme tendance de ralentir la prolifération des cellules K562 au cours de la culture et que tout comme pour la viabilité, ce phénomène est accentué en hyperthermie. Comme ces résultats sont inattendus et novateurs, ils ont mené à un sous-projet, afin de mieux caractériser le mécanisme de régulation de l'hémine sur la baisse de prolifération et de viabilité des cellules K562 [67].



**Figure 5.3 Effet de l'hémine sur la viabilité et l'expansion des cellules K562 en condition normale et en condition d'hyperthermie légère**

Les cellules K562 ont été cultivées en présence ou en absence de 30µM d'hémine porcine dans des conditions normales (37°C et 5% CO<sub>2</sub>) et en conditions d'hyperthermie légère (39°C et 5% CO<sub>2</sub>). La moyenne de la viabilité (A) et de l'expansion cumulée (B) ont été déterminées aux jours 3 et 7. \*Cette expérience est représentative de deux essais indépendants.

## **5.2 Effets de l'hémine sur les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon dans le milieu de culture maison Héma-Québec**

### **5.2.1 Effets de l'hémine lorsqu'ajoutée en début de culture**

Le but premier de ce projet de maîtrise était d'évaluer les effets de l'hémine sur les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon.

L'effet de l'hémine sur l'expansion et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon a d'abord été évalué dans le milieu maison Héma-Québec favorisant la différenciation érythroïde.

Les cellules souches hématopoïétiques CD34+ provenant de pool de cellules souches de différentes unités de sang de cordon ont été mises en culture dans le milieu de culture maison Héma-Québec favorisant la différenciation érythroïde [11]. L'utilisation de pool de cellules CD34+ permet de réduire la variabilité interindividuelle entre les cultures. Les cellules ont été traitées avec 30µM d'hémine porcine dès le début de la culture et un contrôle sans agent et un contrôle DMSO ont été inclus à l'expérimentation. Deux cultures indépendantes ont été réalisées sur une période de 25 jours dans des conditions de culture normales (37°C et 5% CO<sub>2</sub>). Chacune des cultures a été réalisée avec un pool de cellules CD34+ distinct. Les cellules ont été caractérisées phénotypiquement aux jours 7, 11, 14 et 25 par cytométrie en flux pour les marqueurs CD34, CD71 et CD235a. À partir de cette caractérisation, la médiane de l'intensité de fluorescence (MFI) pour le marqueur CD235a a été déterminée. Cette mesure permet d'évaluer la proportion du marqueur d'intérêt à la surface des cellules. Le marqueur CD235a n'apparaît pas à la surface des cellules souches, il apparaît plutôt lorsque les cellules sont davantage engagées dans la différenciation érythroïde. Il constitue ainsi un excellent marqueur pour évaluer la différenciation érythroïde.

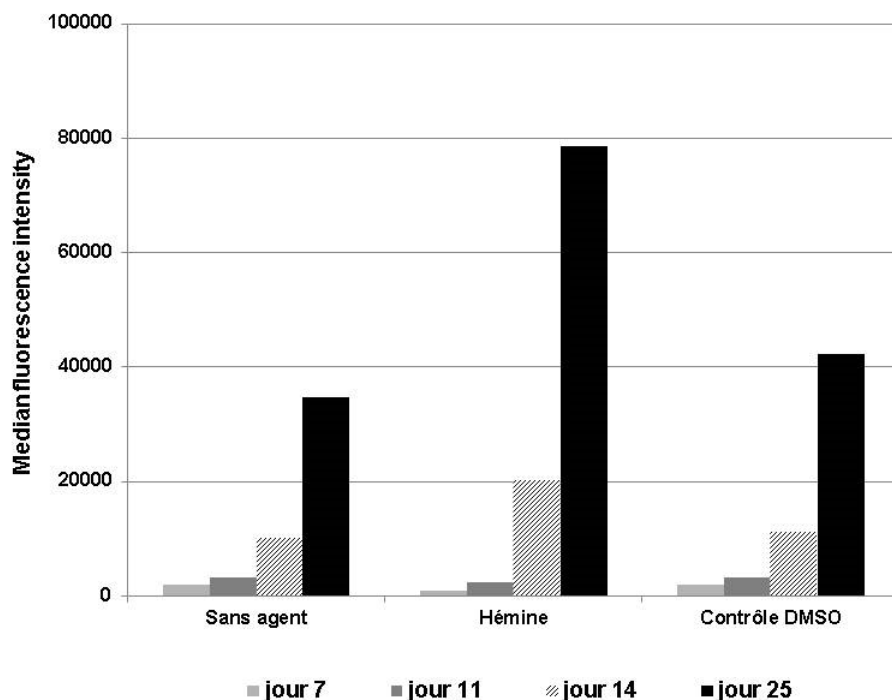
#### **5.2.1.1 Caractérisation phénotypique de la différenciation érythroïde**

La différenciation érythroïde a été caractérisée par des analyses de cytométrie en flux (Figure 5.4). Les analyses de cytométrie en flux révèlent que pour chacune des conditions plus de 70% des cellules sont engagées dans la voie de différenciation érythroïdes et ce après 7 jours de culture. Par contre, après plus de 28 jours de culture, la détection de l'expression du marqueur CD235a a été problématique. Cela a été causé par une agglutination de l'anticorps anti-CD235 due à une trop grande expression du marqueur CD235a après 28 jours de culture. Les résultats montrent que la MFI pour le marqueur CD235a augmente graduellement tout au long de la culture pour chacune des conditions et donc que les cellules sont engagées dans la voie de différenciation érythroïde (Figure 5.4). Cela montre que, tel qu'attendu, le milieu de culture maison Héma-Québec engendre la différenciation érythroïde des cellules. De plus, à partir du jour 14, la MFI pour le marqueur CD235a est plus élevée chez les cellules traitées



à l'hémine comparativement aux contrôles. Effectivement, au jour 14, la MFI est 1,8 fois plus élevée chez les cellules traitées à l'hémine par rapport au contrôle DMSO (figure 5.4). Au jour 25, soit à la fin de la culture, la MFI des cellules traitées à l'hémine est 1,9 fois plus élevée que celle du contrôle DMSO (Figure 5.4). Enfin, la MFI pour les contrôles sans agent et DMSO est similaire tout au long de la culture, ce qui permet de confirmer que le DMSO n'a pas d'effet sur la différenciation des cellules et donc que l'effet observé est un effet spécifique du traitement à l'hémine. Cette tendance est d'ailleurs reproductible entre les deux essais indépendants.

Ainsi, les résultats de MFI illustrent que l'expression du marqueur CD235a est augmentée à la surface des cellules traitées à l'hémine. Cela suggère un état de différenciation plus avancée des cellules traitées à l'hémine dans le milieu de culture maison Héma-Québec par rapport aux contrôles.



**Figure 5.4 MFI de l'expression du marqueur CD235a chez les précurseurs érythroïdes traités à l'hémine**

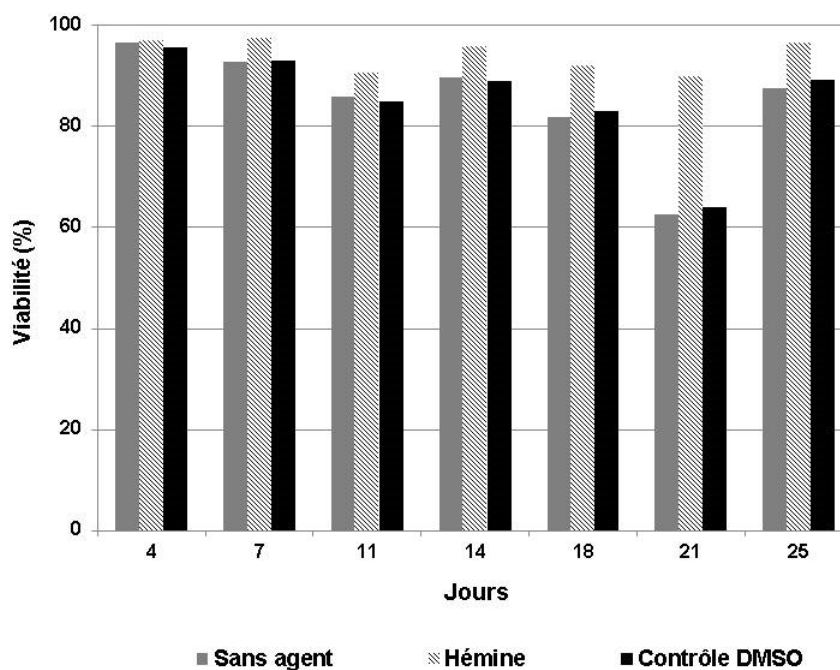
Les précurseurs érythroïdes ont été cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec en présence de 30 $\mu$ M d'hémine porcine. Les cellules ont entre autres été caractérisées par cytométrie en flux pour le marqueur érythroïde CD235a aux jours 7, 11, 14 et 25. La MFI (*Median fluorescence intensity*) pour le marqueur CD235a a ensuite été déterminée. \*Cette expérience est représentative de deux essais indépendants.

### 5.2.1.2 Viabilité des cellules totales

Tout d'abord, la viabilité des cellules en présence d'hémine a été suivie tout au long de la culture (Figure 5.5). Globalement, l'hémine a peu d'effet sur la viabilité des cellules jusqu'au jour 14 (Figure 5.5). Au jour 18, la viabilité des cellules traitées à l'hémine est de 92% comparativement au contrôle sans agent qui est de 82% et du contrôle DMSO qui est de 83% (Figure 5.5). Cet effet est accentué au jour 21, où la viabilité des cellules traitées à l'hémine est de 90%, ce qui est supérieur au contrôle sans agent qui est de 63% et au contrôle DMSO qui est 64% (Figure 5.5). Par contre, la différence de viabilité tend à se rétablir au jour 25, où la viabilité des cellules traitées à l'hémine est de 97%, tandis que celles des contrôles sans agent et DMSO est de 88% et 89% respectivement (Figure 5.5). Il est possible de conclure

que cet effet positif de l'hémine sur la viabilité est un effet spécifique l'hémine puisque les contrôles sans agent et DMSO ont une viabilité similaire tout au long de la culture.

Ainsi, l'hémine semble favoriser le maintien d'une meilleure viabilité des cellules hématopoïétiques en différenciation érythroïde. Cette tendance est d'ailleurs reproductible entre les deux essais indépendants. De façon intéressante, ceci diffère des observations faites dans le modèle K562, où l'hémine avait un effet négatif modeste sur la viabilité.



**Figure 5.5 Effet de l'hémine sur la viabilité des précurseurs érythroïdes**

Les précurseurs érythroïdes ont été cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec en présence de 30 $\mu$ M d'hémine porcine. La viabilité a été suivie sur une période de 25 jours. \*Cette expérience est représentative des deux essais indépendants.

### 5.2.1.2 Expansion des cellules totales

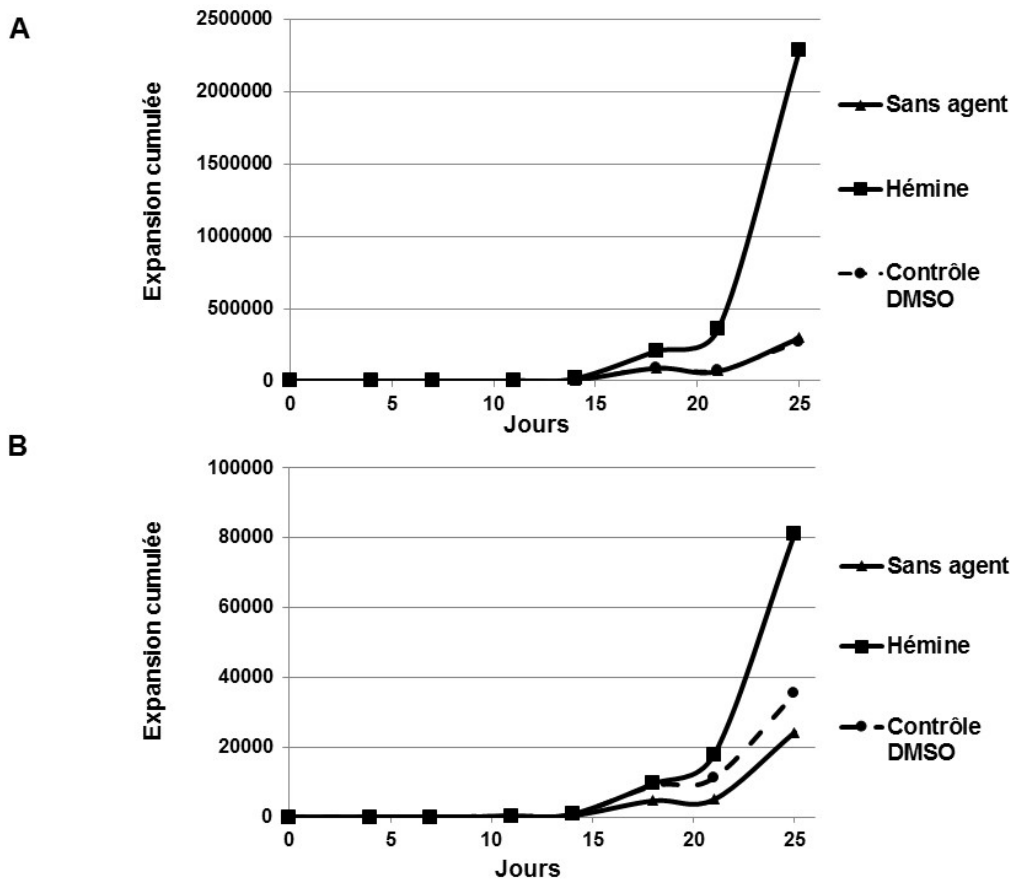
Ensuite, l'expansion des cellules en présence d'hémine a été évaluée tout au long des cultures (Figure 5.6 et Tableau 5.1).

Tout d'abord pour la première culture, l'expansion cumulée des cellules totales jusqu'au jour 11 est semblable entre les conditions. Les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée de 2075 comparativement au contrôle DMSO qui est de 1592 et du contrôle sans

agent qui est de 1578 (Figure 5.6 A). L'hémine a davantage un effet sur l'expansion cumulée des cellules à partir du jour 14 de culture. Effectivement, dès le jour 14 de culture, les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée 2,6 fois plus élevée que le contrôle DMSO (Figure 5.6 A). Au jour 18 les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée 2,4 fois plus élevée que le contrôle DMSO (Figure 5.6 A). Au jour 21, les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée 5,1 fois plus élevée que le contrôle DMSO (Figure 5.6 A) Enfin, l'hémine accentue l'expansion cumulée totale des cellules, qui est 8,7 fois plus élevée que l'expansion cumulée totale du contrôle DMSO (Figure 5.6 A).

Les effets globaux de l'hémine ont par la suite été observés dans une deuxième culture effectuée à partir d'un pool cellules souches hématopoïétiques provenant de donneuses différentes. Encore une fois, l'expansion cumulée des cellules totales est similaire entre les conditions jusqu'au jour 11 puisque les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée de 226 en comparaison au contrôle DMSO qui est de 248 et au contrôle sans agent qui est de 206 (Figure 5.6 B). L'effet de l'hémine est davantage considérable à partir du jour 14 de culture, tendance d'ailleurs observée lors du premier essai. En effet, les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée 1,2 fois plus élevée que le contrôle DMSO et 2 fois plus élevée que le contrôle sans agent (Figure 5.6 B). Au jour 18 les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée 1,1 fois plus élevée que le contrôle DMSO et 2,1 fois plus élevée que le contrôle sans agent (Figure 5.6 B). Au jour 21, les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée 1,6 fois plus élevée que le contrôle DMSO et 3,6 fois plus élevée que le contrôle sans agent (Figure 5.6 B) Enfin, l'hémine accentue l'expansion cumulée totale des cellules, qui est 2,3 fois plus élevée que l'expansion cumulée totale du contrôle DMSO (Figure 5.6 B).

Ainsi, l'hémine semble favoriser la prolifération des cellules hématopoïétiques en différenciation érythroïde, tendance similaire entre les deux essais indépendants. Ceci constitue d'ailleurs un effet contraire à ce qui est observé chez les cellules K562, où l'hémine ralentit de façon importante la prolifération des cellules.



**Figure 5.6 Effet de l'hémine sur l'expansion des précurseurs érythroïdes**

Les précurseurs érythroïdes ont été cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec en présence de 30 $\mu$ M d'hémine porcine. L'expansion cumulée des cellules totales a été calculée sur une période de 25 jours lors de deux essais indépendants (A;B). \* Le graphique A représente le premier essai et le graphique B représente le deuxième essai.

L'expansion cellulaire des cellules totales pour les deux essais indépendants a par la suite été calculée, afin de démontrer plus clairement les effets de l'hémine sur l'expansion entre chacun des passages (Tableau 5.1). On remarque une tendance similaire quant à l'expansion cellulaire entre les conditions pour chacun des essais indépendants (Tableau 5.1) Globalement, l'expansion cellulaire semble légèrement plus élevée pour le premier essai (Tableau 5.1 A). Tout d'abord, on remarque que pour le premier essai, l'hémine stimule particulièrement l'expansion cellulaire entre le jour 11 et le jour 14, puisque l'expansion cellulaire des cellules traitées à l'hémine est de 8, comparativement au contrôle sans agent

qui est de 4,37 et du contrôle DMSO qui est de 4,07 (Tableau 5.1 A). L'expansion cellulaire des cellules traitées à l'hémine est donc 1,97 fois plus élevée par rapport au contrôle DMSO. Cet effet est par contre moins marqué pour le deuxième essai, puisque l'expansion cellulaire des cellules traitées à l'hémine est de 3,79, comparativement au contrôle sans agent qui est de 2,10 et de contrôle DMSO qui est de 2,99 (Tableau 5.1 B). Les cellules traitées à l'hémine ont donc une expansion cellulaire 1,27 fois plus élevée que le contrôle DMSO. De plus, pour le premier essai, l'hémine a aussi un effet entre les jours 18 et 21, étant donné que l'expansion cellulaire des cellules traitées à l'hémine est 2,1 fois plus élevée que le contrôle DMSO (Tableau 5.1 A). L'hémine a aussi un léger effet entre les jours 21 et 25 puisque l'expansion cellulaire des cellules traitées à l'hémine est 1,7 fois plus élevée que le contrôle DMSO (Tableau 5.1 A). Ces effets entre les jours 18 et 21, puis 21 et 25 sont beaucoup moins marqués pour le deuxième essai.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'hémine semble augmenter la prolifération des précurseurs érythroïdes cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec. L'hémine semble aussi avoir un effet détectable à partir du 11<sup>e</sup> jour de culture et ainsi l'hémine contribue à accentuer l'expansion totale de ces cellules érythroïdes sur une période de 25 jours. Cet effet est aussi contraire à ce qui se passe chez les K562, où l'hémine a un effet négatif sur l'expansion de ces cellules.

A	J4 à J7	J7 à J11	J11 à J14	J14 à J18	J18 à J21	J21 à J25
Sans agent	8,30	9,37	4,37	13,10	0,75	4,43
Hémine	9,43	8,30	8,00	12,53	1,71	6,43
Contrôle DMSO	8,67	9,47	4,07	13,63	0,80	3,73

B	J4 à J7	J7 à J11	J11 à J14	J14 à J18	J18 à J21	J21 à J25
Sans agent	7,35	9,38	2,10	10,76	1,07	4,80
Hémine	6,42	9,52	3,79	11,17	1,86	4,60
Contrôle DMSO	7,92	9,15	2,99	12,08	1,26	3,10

**Tableau 5.1 Expansion cellulaire des précurseurs érythroïdes en présence d'hémine**

Les précurseurs érythroïdes ont été cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec en présence de 30µM d'hémine porcine. L'expansion cellulaire a été calculée sur une période de 25 jours lors de deux essais indépendants (A;B). \*Le tableau A représente le premier essai et le tableau B représente le deuxième essai.

#### 5.2.1.4 Morphologie cellulaire

L'érythropoïèse est caractérisée par d'importants changements au niveau de la morphologie des cellules. Cette analyse a permis de déterminer les différents stades de différenciation lors d'une culture favorisant la différenciation érythroïde en plus d'évaluer si l'hémine contribue à accélérer la différenciation et la maturation érythroïde des cellules dans le milieu de culture maison Héma-Québec.

Les cellules souches hématopoïétiques CD34+ provenant de pool de cellules souches de différentes unités de sang de cordon ont été mises en culture dans le milieu de culture maison

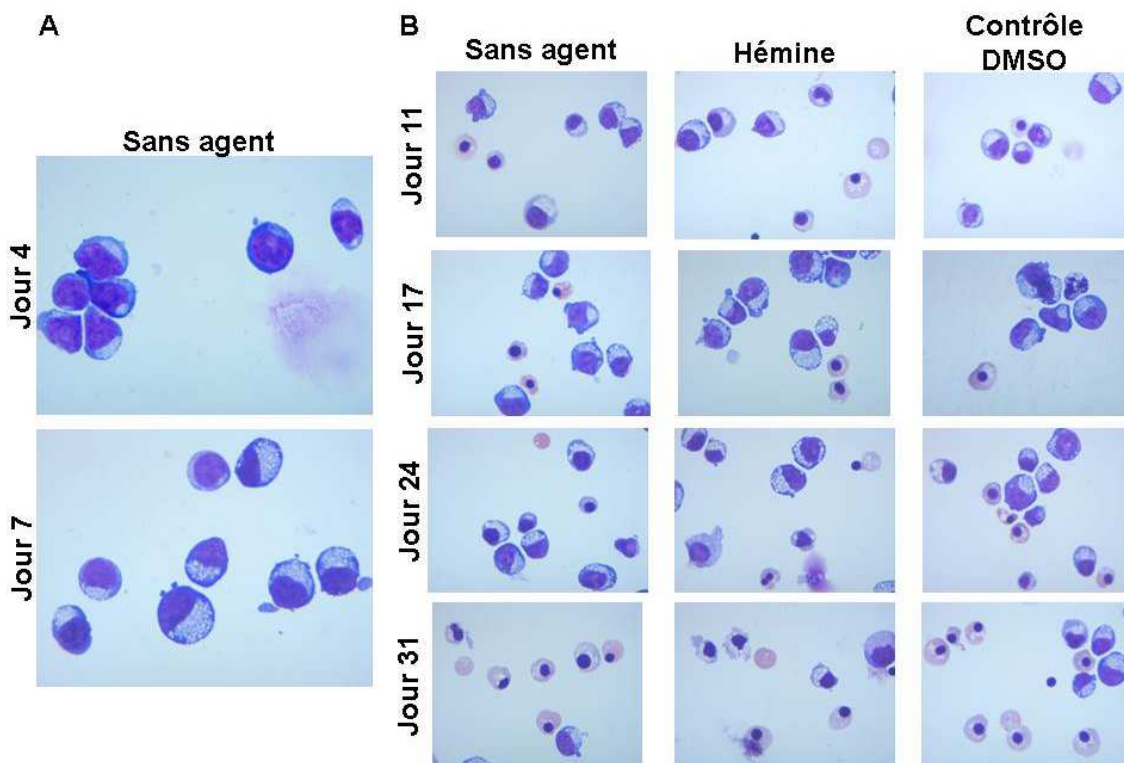
Héma-Québec. Les cellules ont été traitées avec 30µM d'hémine porcine au 7<sup>e</sup> jour de culture. Un contrôle sans agent et un contrôle DMSO ont été inclus à l'expérimentation. La culture a été réalisée sur une période de 31 jours dans des conditions de culture normales (37°C et 5% CO<sub>2</sub>). Les cellules ont été caractérisées morphologiquement aux jours 4, 7, 11, 17, 24 et 31 par la coloration classique Wright-Giemsa et observées au microscope à un grossissement final de 1000x. À partir de ces observations morphologiques, il a été possible de suivre le stade de différenciation des cellules.

Les résultats de microscopie permettent de suivre l'état de différenciation des cellules au cours d'une culture favorisant la différenciation érythroïde, quoique ces observations sont de nature qualitatives et demeurent subjectives à l'observateur (Figure 5.7). Au jour 4 de culture, les cellules correspondent majoritairement au stade de proérythroblaste puisqu'elles sont plutôt grosses, plus ou moins rondes et le noyau occupe la majorité de la cellule (Figure 5.7). Au jour 7, les cellules tendent à être au stade d'érythroblaste basophile : les cellules ont légèrement diminué en taille et le noyau est basophile, c'est-à-dire de couleur mauve pâle (Figure 5.7). Au jour 11, les cellules semblent être au stade d'érythroblaste polychromatophile, puisque les cellules ont encore diminué en taille et le noyau a tendance à davantage se condenser près de la paroi cellulaire. On remarque aussi la présence de quelques réticulocytes nucléés, par leur couleur rosée et leur petit noyau bleuté (Figure 5.7). Au jour 17, il ne semble pas y avoir de changement dans la différenciation des cellules par rapport au jour 11 (Figure 5.7). Au jour 24, la population cellulaire est plutôt hétérogène : on observe encore quelques érythroblastes polychromatophiles en plus de cellules au stade d'érythroblaste acidophile, cellules ayant un noyau bleuté très condensé à la paroi, avec un cytoplasme clair, ainsi que des réticulocytes nucléés ou en cours d'énucléation (Figure 5.7). Cela indique que les cellules procèdent à la maturation érythroïde finale. Enfin, au jour 31, la majorité des cellules sont au stade de réticulocyte nucléé, puisqu'elles sont très petites, de couleur rosée et possèdent un petit noyau très condensé à la paroi de couleur bleu foncé. On observe aussi la présence de quelques réticulocytes (Figure 5.7).

Il est extrêmement ardu de statuer par cette caractérisation morphologique si l'hémine exerce un effet sur la différenciation érythroïde, étant donné qu'il ne semble pas y avoir de différences morphologiques évidentes entre les cellules des contrôles sans agent et DMSO et les cellules traitées à l'hémine à prime abord. Cette expérimentation permet tout de même de



confirmer que, tel que prévu, le milieu de culture maison Héma-Québec permet la différenciation érythroïde.



**Figure 5.6 Morphologie des précurseurs érythroïdes traités à l'hémine**

Les précurseurs érythroïdes ont été cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec en présence de 30 $\mu$ M d'hémine porcine à partir de 7<sup>e</sup> jour de culture. La coloration Wright-Giemsa a été effectuée aux jours 4, 7, 11, 17, 24 et 31 de culture (1000x).

### 5.2.1.5 Caractérisation de la modulation de l'énucléation

L'énumération des cellules nucléées et énucléées a par la suite été effectuée à partir de la culture présentée dans la section 5.2.1.4 (Tableau 5.2 A). Entre 100 et 200 cellules par condition ont été comptées pour chacun des jours. On remarque qu'au jour 24, le nombre de cellules énucléées en présence d'hémine est plus élevé par rapport aux contrôles. Effectivement, les cellules énucléées en présence d'hémine représentent 11,1% des cellules par rapport au contrôle sans agent où les cellules énucléées représentent 3,2% des cellules et au contrôle DMSO où 3,8% des cellules sont énucléées (Tableau 5.2 A). Au jour 31, on remarque que pour les cellules traitées à l'hémine, les cellules énucléées représentent 6,3%

des cellules, ce qui constitue une baisse de 4,8% par rapport au jour 24 (Tableau 5.2 A). Cela constitue aussi une baisse par rapport au contrôle sans agent, puisque 10,3% des cellules sont énucléées (Tableau 5.2 A). De plus, il est difficile de conclure sur l'analyse de l'énumération des cellules énucléées et nucléées au jour 31, étant donné les différences importantes entre le contrôle sans agent et le contrôle DMSO (Tableau 5.2 A). L'hémine semble donc accélérer légèrement l'énucléation compte tenu du résultat obtenu au jour 24, effet qui n'est par contre observable au jour subséquent. Il est possible que le DMSO ait un certain effet sur l'énucléation, observation qui devra être évaluée lors d'expérimentations subséquentes. Il est aussi à noter les cellules sont très fragiles une fois énucléées et ne demeurent pas dans les cultures, ce qui peut possiblement expliquer partiellement la dynamique transiente d'augmentation du nombre de cellules énucléées.

Suite à la constatation de ce faible pourcentage d'énucléation, une modification a été apportée à ce protocole, soit de complètement retirer le SCF en fin de culture, dans le but de permettre une meilleure énucléation. Ainsi, l'énumération des cellules nucléées et énucléées été effectué dans une culture où l'hémine a été ajoutée dès le début de la culture, mais dont le SCF a été retiré du milieu de culture à partir du jour 7. (Tableau 5.2 B). Encore une fois, entre 100 et 200 cellules par condition ont été comptées pour chacun des jours. Au jour 11, on remarque que ni les cellules traitées à l'hémine, ni le contrôle DMSO ont atteint l'énucléation (Tableau 5.2 B). Seulement 3 jours plus tard, on remarque que 24,2% des cellules traitées à l'hémine sont énucléées ce qui est 8,8% plus élevé par rapport au contrôle DMSO. On remarque ainsi une plus forte énucléation des cellules traitées à l'hémine en absence de SCF. Ce résultat suggère que l'hémine accentue le processus d'énucléation.

Ainsi, l'analyse de l'énumération des cellules nucléées et énucléées montre que l'hémine semble agir positivement, quoique relativement modestement, sur l'énucléation dans le milieu de culture maison Héma-Québec.

**A**

	Jour 24		Jour 31	
	Nucléées	Énucléées	Nucléées	Énucléées
<b>Contrôle sans agent</b>	96,8%	3,2%	89,7%	10,3%
<b>Hémine</b>	88,9%	11,1%	93,7%	6,3%
<b>Contrôle DMSO</b>	96,2%	3,8%	95,0%	5,0%

**B**

	Jour 11		Jour 14	
	Nucléées	Énucléées	Nucléées	Énucléées
<b>Hémine</b>	100%	0%	75,8%	24,2%
<b>Contrôle DMSO</b>	100%	0%	84,6%	15,4%

**Tableau 5.2 Comparaison des cellules nucléées et énucléées dans le milieu maison Héma-Québec**

Les précurseurs érythroïdes ont été cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec en présence de 30 $\mu$ M d'hémine porcine. Entre 100 et 200 cellules ont été comptées par chacune des conditions. Le compte relatif des cellules nucléées et énucléées a été effectué aux jours 24 et 31 sur une culture type (A). Le SCF n'a pas été ajouté au milieu de culture à partir du jour 7 pour favoriser la maturation complète et le compte relatif des cellules nucléées et énucléées a été effectué aux jours 11 et 14 (B).

### 5.2.2 Effets de l'hémine lorsqu'ajoutée plus tard en cours de culture

Suite aux résultats obtenus précédemment, l'hémine semble avoir un effet positif sur l'expansion cellulaire détectable à partir du jour 14 de culture. De plus, dans le cas clinique, il a été démontré que les cellules de la patiente étaient bloquées au stade d'érythroblaste acidophile, correspondant à des cellules érythroïdes en cours de différenciation. Ainsi, dans le cas de cette patiente, l'hémine semblerait avoir eu un effet spécifique sur les précurseurs érythroïdes. Sachant tout cela, nous avons voulu vérifier si les cellules plus engagées dans l'érythropoïèse répondent à l'hémine, visant particulièrement le stade d'érythroblaste acidophile pour reproduire le cas clinique

Les cellules souches hématopoïétiques CD34+ provenant de pool de cellules souches de différentes unités de sang de cordon ont été mises en culture dans le milieu de culture maison Héma-Québec. Les cellules ont été traitées avec 30µM d'hémine de porc à partir du 11<sup>e</sup> jour de culture et un contrôle sans agent et un contrôle DMSO ont été inclus à l'expérimentation. La culture a été réalisée sur une période de 28 jours dans des conditions de culture normales (37°C et 5% CO<sub>2</sub>). Les cellules ont été caractérisées phénotypiquement aux jours 7, 18, 25 et 28 par cytométrie en flux pour les marqueurs CD34, CD71 et CD235a. Ensuite, la médiane de l'intensité de fluorescence (MFI) pour le marqueur CD235a a été analysée, afin de caractériser l'effet de l'hémine sur le niveau d'expression du marqueur CD235a et ainsi sur la différenciation érythroïde.

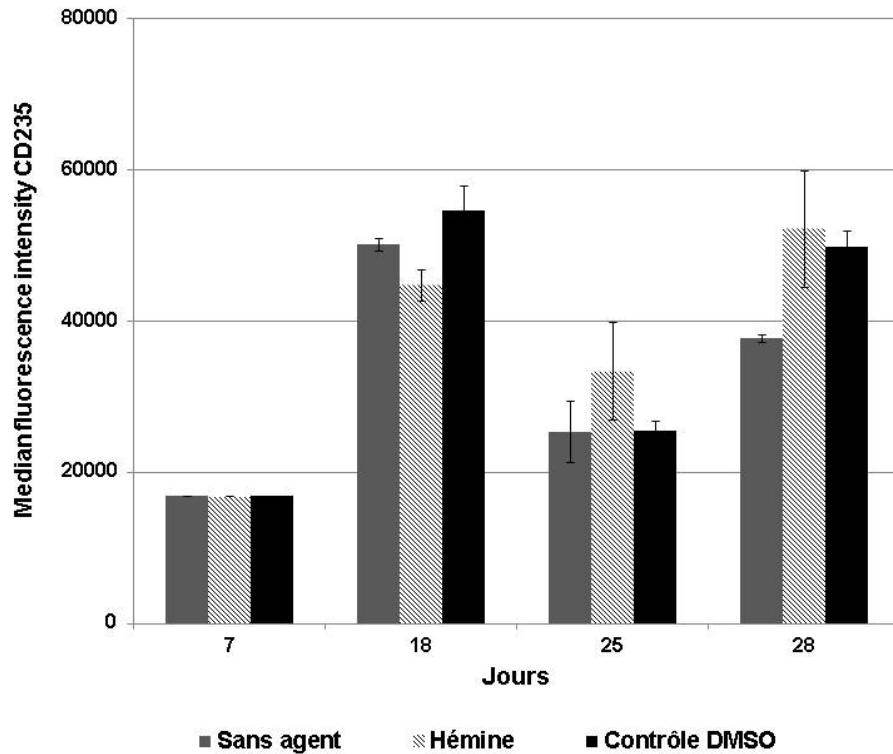
#### **5.2.2.1 Caractérisation phénotypique de la différenciation érythroïde**

Les résultats obtenus lors de l'expérimentation précédente (section 5.2.1) où l'hémine a été ajoutée dès le début de la culture de cellules souches de sang de cordon dans le milieu maison Héma-Québec suggèrent que l'hémine accélère la différenciation érythroïde. Cette expérimentation avait donc pour but de vérifier si l'hémine ajoutée plus tard en cours de culture contribue toujours à l'augmentation de la différenciation érythroïde des cellules.

Les analyses de cytométrie en flux révèlent que pour chacune des conditions plus de 75% des cellules sont engagées dans la voie de différenciation érythroïdes et ce après 7 jours de culture. Par contre, après plus de 28 jours de culture, la détection de l'expression du marqueur CD235a a été problématique, tel que décrit précédemment. Cela a été causé par une agglutination de l'anticorps anti-CD235 due à une trop grande expression du marqueur CD235a après 25 jours de culture.

Les résultats obtenus ne montrent cette fois aucune différence apparente sur l'intensité de la MFI entre le 7<sup>e</sup> jour de culture et le 28<sup>e</sup> jour de culture pour les conditions contrôle sans agent, hémine et contrôle DMSO (Figure 5.8).

Dans l'ensemble, malgré la grande variabilité des résultats de MFI, l'hémine ajoutée au 11<sup>e</sup> jour de culture semble avoir un léger effet positif aux jours 25 et 28, puisque l'expression du marqueur CD235 est augmentée modestement à la surface des cellules traitées à l'hémine. Cela suggère un effet modeste sur la différenciation des cellules érythroïdes traitées à l'hémine (Figure 5.8).



**Figure 5.8 Différenciation érythroïde des précurseurs érythroïdes traités à l'hémine au jour 11 de culture**

Les précurseurs érythroïdes ont été cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec. Les cellules ont été traitées avec 30 $\mu$ M d'hémine porcine à partir du jour 11. Les cellules ont été caractérisées par cytométrie en flux entre autres pour le marqueur érythroïde CD235a aux jours 7, 18, 25 et 28. La MFI (*Median fluorescence intensity*) pour le marqueur CD235a a ensuite été déterminée.

### 5.2.2.2 Viabilité des cellules totales

La viabilité des cellules a tout d'abord été suivie tout au long de cette culture (Figure 5.9 A). Les résultats montrent que dans ces conditions, l'hémine ne semble pas avoir d'effet sur la viabilité des cellules. Effectivement, au jour 21, la viabilité des cellules traitées à l'hémine est de  $78 \pm 1\%$ , tandis que la viabilité des contrôles sans agent et DMSO est de  $69 \pm 2\%$  et  $67 \pm 2\%$  respectivement (Figure 5.9 A). Au jour 25, l'hémine semble contribuer à maintenir la viabilité des cellules, puisque les cellules traitées à l'hémine ont une viabilité de  $94 \pm 1\%$  comparativement au contrôle sans agent qui est de  $77 \pm 1\%$  et du contrôle DMSO qui est de

82 ± 1% (Figure 5.9 A). Enfin, au jour 28, l'effet de l'hémine sur la viabilité est moindre puisque les cellules traitées à l'hémine ont une viabilité de 82 ± 3%, le contrôle sans agent a une viabilité de 75 ± 1% et le contrôle DMSO a une viabilité de 74 ± 4% (Figure 5.9 A).

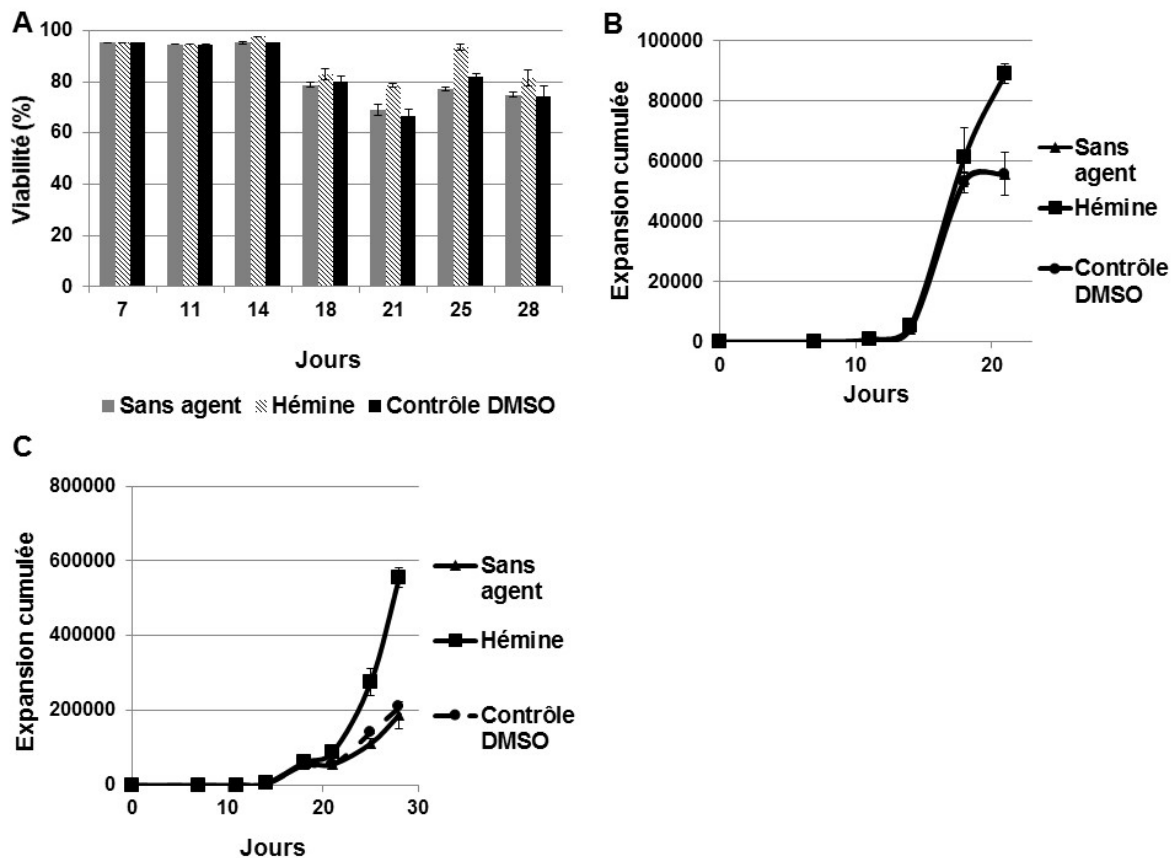
Les résultats illustrent que la viabilité des cellules pour chacune des conditions semble suivre la même tendance, soit une viabilité similaire globalement, à l'exception d'un effet positif vers le jour 25, soit légèrement plus tardivement que lors de l'expérience décrite précédemment où la viabilité semblait améliorée par l'hémine vers le jour 21

### **5.2.2.3 Expansion des cellules totales**

Les résultats de la figure 5.8 permettent de suivre l'effet de l'hémine sur les cellules érythroïdes en cours de différenciation. Tout d'abord, l'expansion cumulée des cellules totales est semblable entre les conditions au jour 14, soit 3 jours après le début du traitement à l'hémine (Figure 5.9 B). Les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée de 5336 ± 136 tandis que le contrôle sans agent a une expansion cumulée de 4218 ± 119 et le contrôle DMSO a une expansion cumulée de 4446 ± 272 (Figure 5.9 B). Cela représente une expansion seulement 1,2 fois plus élevée des cellules traitées à l'hémine par rapport au contrôle DMSO. De la même façon, au jour 18, les cellules traitées à l'hémine ont une expansion 1,2 fois plus élevée par rapport au contrôle DMSO (Figure 5.9 B). Au jour 21, soit 10 jours après le début du traitement à l'hémine, les cellules traitées à l'hémine commencent à avoir une expansion cumulée plus importante que les contrôles. Effectivement, les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée 1,6 fois plus élevée que le contrôle DMSO (Figure 5.9 B). Ce phénomène continue de s'accroître au jour 25 puisque les cellules traitées à l'hémine ont une expansion cumulée 1,9 fois plus élevée que le contrôle DMSO (Figure 5.9 C). Enfin, l'hémine accentue l'expansion cumulée totale des cellules, qui est 2,7 fois plus élevée que l'expansion cumulée totale du contrôle DMSO sur une période de 28 jours (Figure 5.9 C). Il est d'ailleurs possible de confirmer que cet effet positif de l'hémine sur l'expansion cellulaire est uniquement causé par l'hémine puisque les contrôles sans agent et DMSO ont une expansion similaire tout au long de la culture.

Ainsi, ces résultats tendent vers la confirmation de notre hypothèse, soit que les précurseurs érythroïdes répondent aussi au traitement à l'hémine. L'hémine ajoutée au 11<sup>e</sup> jour de culture

semble ainsi engendrer les mêmes effets positifs sur la prolifération des précurseurs érythroïdes.



**Figure 5.9** Effet d'un traitement à l'hémine ajoutée au jour 11 de culture sur l'expansion et la viabilité des précurseurs érythroïdes

Les précurseurs érythroïdes ont été cultivés dans le milieu de culture maison Héma-Québec. Les cellules ont été traitées avec 30 $\mu$ M d'hémine porcine à partir du jour 11. La viabilité a été calculée sur une période de 28 jours (A). L'expansion cumulée a été calculée sur une période de 20 jours (B), puis sur une période totale de 28 jours (C). \*Résultats représentatifs d'un essai indépendant.