

4. Matériels et méthodes

4.1 Modèle d'étude

Les cellules de leucémie myéloïde chronique K562, provenant de *l'American Type Culture Collection* (ATCC), ont été utilisées entre autres pour des tests d'optimisation. Ces cellules sont immatures et peu différenciées et représentent un modèle cellulaire de différenciation érythroïde relativement bien documenté.

La majorité des expériences ont été effectuées sur des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches utilisées au cours de cette étude sont des cellules souches purifiées CD34+ provenant de sang de cordon. Cette source de CSH est riche en progéniteurs immatures et permet un meilleur potentiel d'expansion par rapport aux autres sources de CSH.

4.2 Sources de cellules souches CD34+

4.2.1 Traitement de sang de cordon ombilical

Ce projet de recherche est réalisé avec l'approbation des comités d'éthique d'Héma-Québec et du CHU (centre hospitalier universitaire) de Québec. Toutes les mères ayant accepté de donner leur sang de cordon ont signé un formulaire de consentement éclairé. Les unités de sang de cordon ombilical ont été prélevées immédiatement après l'accouchement par le personnel médical de l'hôpital Saint-François d'Assise de Québec. Le sang de cordon a été récolté dans des poches (Fenwal, Lake Zurich, IL), contenant une solution anticoagulante de dextrose et d'acide citrique. Les poches de sang de cordon ont été acheminées dans les 24 heures suivant leur prélèvement et conservées à température pièce.

La manipulation du sang de cordon a été faite de manière aseptique, dans une hotte biologique. Pour isoler les cellules mononucléées, le sang de cordon a été transféré dans des tubes Falcon (Corning, NY, É-U) de 50mL pour une séparation des cellules par centrifugation à 400 x g pendant 15 minutes. Précédemment à cette étape, un échantillon de sang a été récupéré afin de procéder au protocole ISHAGE (*International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*) (voir section 4.2.2). Par la suite, la majorité du plasma a été retiré et

remplacé par un volume équivalent de DPBS (gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, É-U). Un maximum de 30 mL de cette préparation a été déposé par tube LeucoSep (Greiner bio-one, É-U) contenant 15mL de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suède), pour une centrifugation à 400 x g pour 30 minutes. Le plasma résiduel a été retiré et la couche de cellules mononucléées située entre le plasma et les globules rouges a été récoltée à la pipette. Les cellules mononucléées du sang ont été lavées deux fois avec une solution de DPBS (gibco by Life Technologies) contenant 2% (v/v) de *Human Serum Albumin* (HSA) (CSL Behring AG, Berne, Suisse) et 1mM d'éthylènediaminetetraacétique (EDTA) (invitrogen by Life Technologies) et centrifugées à 300 x g pour 10 minutes la première fois et à 120 x g pour 10 minutes la deuxième fois. Les cellules ont enfin été resuspendues dans la solution de congélation Cryostor (BioLife Solutions, Bothell, WA, É-U) à raison de 300x10⁶cellules par vial et entreposées à -80°C dans le système CoolCell (Biocision, San Rafael, CA, É-U), permettant un refroidissement de 1°C/minute. Les cellules ont ensuite été entreposées à -135°C dans l'azote liquide.

4.2.2 Protocole ISHAGE

La teneur en CD34+ du sang de cordon a été déterminée sur un échantillon de 200µl de sang frais prélevé suite à la réception de la poche de sang de cordon. Le protocole ISHAGE permet de quantifier les cellules CD34+ par cytométrie en flux avec la trousse StemKit Reagent (Beckman Coulter, Pasadena, CA, É-U). La trousse contient des anticorps monoclonaux contre les antigènes de surface CD34 et CD45, en plus de fournir le marqueur de viabilité 7-amino-Actinomycin D (7-AAD). 50µl de sang a été incubé avec chacun des anticorps. Par la suite, un tampon de lyse est ajouté afin de lyser les cellules et enfin une quantité prédéfinie de fluorosphères *Flow-Count* (Beckman Coulter) est ajoutée. Les tubes sont passés dans l'heure qui suit au cytomètre BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Diego, CA, É-U). La formule mathématique suivante permet de déterminer précisément la quantité de cellules CD34+ dans l'échantillon de sang de cordon :

$$\frac{\text{CD34}}{\mu\text{l de sang}} = \frac{\text{Nombre de cellules CD34} + * \text{Nombre de billes dans l'échantillon}}{\text{Nombre de billes comptées} * \text{Volume de l'échantillon} * \text{Facteur de dilution}}$$

4.2.3 Sélection des cellules CD34+

Les cellules mononucléées du sang de cordon ont été décongelées rapidement au bain-marie à 37°C et transférées dans un tube Falcon (Corning) de 50mL. Une solution *d'Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) (gibco by Life Technologies) supplémentée avec 20% (v/v) de HSA (CSL Behring AG) a été ajoutée. Les cellules ont été centrifugées à 1000 x g pour 10 minutes. Puis, la solution d'IMDM (gibco by Life Technologies) supplémentée avec 20% (v/v) de HSA (CSL Behring AG) a été ajoutée au culot de cellules, avec 1mg/mL de DNase (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É-U). Les cellules ont ainsi été incubées 15 minutes à température pièce, puis centrifugées pour 10 minutes à 1000 x g. Les cellules ont été ajustées à une concentration de 5×10^8 cellules/mL dans du DPBS (gibco by Life Technologies), supplémenté avec 2% (v/v) de HSA (CSL Behring AG) et 1mM d'EDTA (invitrogen by Life Technologies). L'anticorps anti-CD34 (StemCell Technologies, Vancouver, C-B, Canada) a été ajouté à la suspension cellulaire à raison de 100µL/mL de suspension, suivi d'une incubation de 15 minutes à température pièce. Suite à cela, 50µL/mL de suspension de nanoparticules magnétiques (StemCell Technologies) a été ajouté à la suspension cellulaire, suivi d'une incubation de 10 minutes à température pièce et d'un ajustement du volume avec du DPBS (gibco by Life Technologies) supplémenté avec 2% (v/v) de HSA (CSL Behring AG) et 1mM d'EDTA (invitrogen by Life Technologies). La suspension cellulaire a par la suite été incubée 5 minutes à température pièce dans un dispositif aimanté *EasySep* (StemCell Technologies) avant d'être transvidée dans un nouveau tube avant de poursuivre. Du DPBS (gibco by Life Technologies) supplémenté avec 2% (v/v) de HSA (CSL Behring AG) et 1mM d'EDTA (invitrogen by Life Technologies) a été ajouté à la suspension cellulaire avant une nouvelle incubation dans le dispositif aimanté *EasySep* (StemCell Technologies) pour 5 minutes à température pièce. Ces étapes de lavage avec l'aimant ont été répétées 3 fois. Les cellules ont par la suite été centrifugées à 1250 x g pour 10 minutes, avant d'être congelées tel que décrit dans la section 4.2.1.

4.3 Culture cellulaire

4.3.1 Milieux de culture

Les cellules K562 ont été cultivées dans le milieu de culture RPMI-1640 avec L-glutamine (Lonza, Walkersville, MD, É-U), supplémenté avec 10% (v/v) de sérum fœtal bovin (FBS) (gibco by Life Technologies).

Les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon ont tout d'abord été cultivées dans un milieu de culture maison favorisant la différenciation érythroïde [11]. Ce dernier est composé d'IMDM (gibco by Life Technologies), de 100µM de 2-mercaptoéthanol (gibco by Life Technologies) qui prévient la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS), de 20µg/mL de *low density lipoprotein* (LDL) (StemCell Technologies) qui permet la prolifération et la survie des cellules érythroïdes, de 20% (v/v) de *Bovine serum albumin Insulin Transferrin* (BIT) (StemCell Technologies) qui supporte la croissance des cellules érythroïdes, de 0,5x de pénicilline-streptomycine (Sigma-Aldrich) et supplémenté en cytokines : 20U/mL d'EPO (Feldan, Québec, QC, Canada) qui supporte la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes et de 20ng/mL de SCF (Feldan), facteur de croissance des cellules souches. La composition de ce milieu de culture favorise ainsi la différenciation érythroïde des cellules souches. Ce milieu sera nommé milieu de culture maison Héma-Québec pour la suite du présent document.

Le milieu de culture a toujours été conservé à 4°C pour un maximum de deux semaines. Avant la mise en culture des cellules ou d'effectuer un renouvellement de milieu, le milieu a toujours été équilibré à 37°C.

4.3.2 Conditions de culture

Les cellules K562 ont été cultivées à une densité cellulaire de 250 000 cellules/mL. Les cultures se sont déroulées sur une période de 7 à 10 jours dans un environnement contrôlé à 5% CO₂ à atmosphère humide. Deux conditions de températures ont été évaluées, soit une condition de température physiologique à 37°C et une condition d'hyperthermie légère à 39°C (Incubateur Heracell 150i, ThermoFischer Scientific, Mississauga, ON, Canada). Un ajustement de la densité cellulaire et un renouvellement du milieu de culture ont été faits à

tous les trois ou quatre jours. Les cellules ont été cultivées dans des plaques de culture 24 puits ou 6 puits (Corning), selon le volume de culture.

Les cellules souches hématopoïétiques, proviennent de généreux dons de sang de cordon, tel que décrit précédemment. Ces cellules ont tout d'abord été cultivées dans le milieu de culture maison Héma-Québec à une densité cellulaire variant entre 100 000 cellules/mL et 300 000 cellules/mL. Les cultures se sont déroulées sur 28 à 32 jours dans un environnement à 37°C et de 5% CO₂. Un ajustement de la densité cellulaire, ainsi qu'un renouvellement du milieu de culture ont été effectués à tous les trois ou quatre jours. Les cellules ont été cultivées dans des plaques de culture 24 puits ou 6 puits (Corning), selon le volume de culture.

Les cellules ont été traitées avec l'hémine de porc BioXtra 97% (Sigma-Aldrich) resuspendue à une concentration de 10mM dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 30µM sauf indications contraires. L'hémine a été ajoutée dès le début de culture, sauf indications contraires et ajoutée à nouveau à chaque renouvellement de milieu de culture.

4.3.3 Suivi de la viabilité et de l'expansion

Lors de chaque renouvellement de milieu de culture, des comptes cellulaires ont été effectués en duplicata au NucleoCounter NC-250 avec l'ajout de la solution 18 Acridine orange (AO) (ChemoMetec, Gydevang, Danemark), diluée 1/20 avec les cellules en culture. Cet essai permet de déterminer la concentration cellulaire. Une quantification de la viabilité cellulaire est aussi possible grâce au composé AO, c'est-à-dire l'acridine orange, de la solution 18. L'acridine orange permet de colorer les cellules vivantes et mortes, donc la totalité des cellules et les cellules mortes sont énumérées par la coloration au DAPI, présent dans la solution 18. Le logiciel NucleoView calcule ainsi la viabilité.

L'expansion totale a été calculée selon la formule mathématique ci-dessous :

$$\text{Expansion cumulée} = \frac{\text{Nombre de cellules totales}}{\text{Nombre de cellule ensemencées}} * \text{Expansion cumulée au jour précédent}$$

L'expansion cellulaire a par la suite été calculée selon la formule mathématique ci-dessous :

$$\text{Expansion cellulaire} = \frac{\text{Expansion cumulée du jour d'intérêt}}{\text{Expansion cumulée au jour précédent}}$$

4.3.4 Détermination qualitative de la production d'hémoglobine

Lors de chaque renouvellement de milieu de culture, 1 000 000 de cellules ont été récoltées. Ces cellules ont été centrifugées à 1000 x g pour 5 minutes. Les cellules ont par la suite été lavées avec du DPBS (gibco by Life Technologies) et centrifugées à nouveau à 1000 x g pour 5 minutes. La couleur du culot ainsi obtenu a été observée, afin d'évaluer qualitativement la production d'hémoglobine par les cellules : plus les cellules du culot adoptaient une pigmentation rouge, plus il était supposé que les cellules produisaient de l'hémoglobine. Les culots ont par la suite été immédiatement congelés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

4.4 Analyse phénotypique par cytométrie en flux

4.4.1 Anticorps utilisés

Le tableau 4.1 contient la liste des anticorps utilisés sur les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon pour procéder aux analyses de cytométrie en flux, afin de déterminer l'état de différenciation de cellules. Tous les anticorps étaient des immunoglobulines G (IgG) monoclonaux de souris couplés à des molécules fluorescentes. L'anticorps CD34-FITC a été utilisé à 5µl/test, l'anticorps CD71-APC a été utilisé à 5µl/test, l'anticorps CD235-PE a été utilisé à 0,5µl/test et le marqueur de viabilité 7-AAD a été utilisé à 8µL par test.

Tableau 4.1 Liste des anticorps utilisés pour le marquage des précurseurs érythroïdes

Fluorochrome	Cible	Clone	Fournisseur
FITC	CD34	581	Beckman Coulter
PE	CD235a	GA-R2 (HIR2)	BD
7AAD	Viabilité	S/O	Beckman Coulter
APC	CD71	M-A712	BD

4.4.2 Marquage extracellulaire

Entre 500 000 cellules et 1 000 000 de cellules cultivées dans le milieu maison Héma-Québec ou EDM ont été utilisées pour le marquage. Les cellules ont préalablement été lavées au DPBS (gibco by Life Technologies), supplémenté avec 1% (v/v) de FBS (gibco by Life Technologies), 0,01% (v/v) sodium azide (Sigma-Aldrich) et 1mM EDTA (invitrogen by Life Technologies), avant d'être marquées avec les anticorps CD34-FITC, CD71-APC et CD235a-PE pour une durée de 20 minutes. Les cellules ont par la suite été à nouveau lavées avec la même solution de lavage et resuspendues dans la même solution contenant le 7-AAD dilué 1/100. Les tubes ont immédiatement été passés au cytomètre BD Accuri C6 (BD Biosciences). Les données ont été acquises directement dans le logiciel d'analyse du cytomètre, avec 30 000 événements dans la région correspondant à la population de cellules totales, déterminée par la taille (FSC) et la granularité (SSC). Des contrôles FMO (*fluorescence minus one*) ont aussi été préparés en même temps et de la même façon que pour le marquage des cellules. Ces contrôles contiennent des cellules marquées avec tous les anticorps utilisés, sauf un. Ainsi, un contrôle FMO est préparé pour chaque anticorps. Les FMO permettent de déterminer la région où les cellules sont positives pour l'anticorps d'intérêt. Des billes de compensation (BD Compbeads, BD Biosciences) ont également été utilisées, afin d'éliminer le chevauchement entre les différents fluorochromes. Les billes ont été marquées individuellement pour chaque anticorps, en même temps que les cellules, avec une quantité correspondante d'anticorps.

4.4.3 Analyses des données

Les données ont été analysées grâce au logiciel FCS Express version 6 (De Novo Software, Los Angeles, CA, É-U). Ce logiciel permet l'analyse de deux marqueurs à la fois en abscisse et en ordonnée et permet d'utiliser une succession hiérarchique de régions déterminées qui s'incluent les unes après les autres, afin de cibler spécifiquement la population cellulaire d'intérêt. Les billes de compensation ont permis d'éliminer l'émission de fluorescence non spécifique dans les différents canaux, grâce à un algorithme fourni dans le logiciel. Pour l'analyse spécifique des cellules, la population de cellules totale a été déterminée dans un graphique exposant la taille (FSC) et la granularité (SSC). Par la suite, les cellules viables ont pu être sélectionnées à partir de cette population de cellules totales, en sélectionnant les cellules négatives pour le 7-AAD. Enfin, à partir des cellules viables, les contrôles FMO ont permis de positionner une région définie en sélectionnant la population de cellules positives pour l'anticorps d'intérêt (Figure 4.1). Les valeurs de MFI (*median fluorescence intensity*) ont été déterminées grâce au logiciel FCS express, en calculant la médiane de fluorescence des cellules par rapport à l'anticorps d'intérêt. La MFI permet de déterminer l'intensité de fluorescence d'un marqueur phénotypique, donc plus la MFI est élevée plus les cellules expriment ce marqueur.

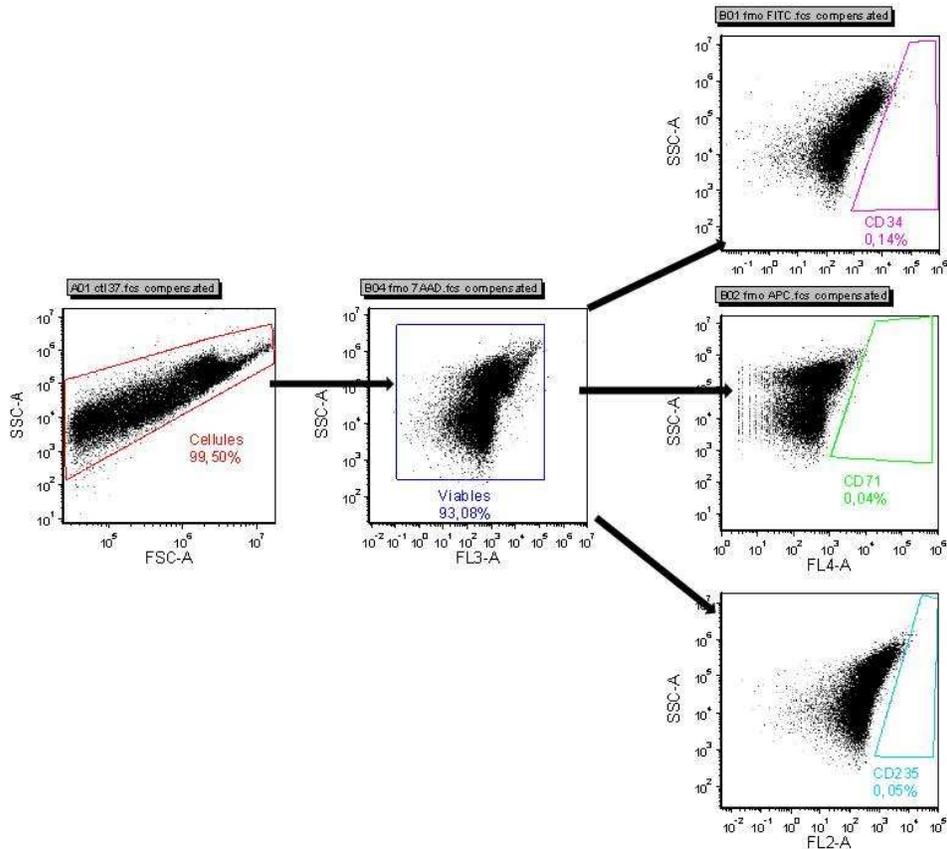


Figure 4.1 Stratégie d’analyse des cellules pour l’identification des cellules CD34+, des CD71+ et des CD235+

Les cellules en culture ont pu être suivies par cette stratégie d’analyse pour les marqueurs CD34-FITC, CD71-APC et CD235-PE (voir section 4.4.3).

4.5 Analyse morphologique

4.5.1 Coloration Wright-Giemsa

Le colorant Wright-Giemsa est un colorant neutre à deux composants : il contient tout d’abord un colorant acide, l’éosine, qui met entre autres en évidence l’hémoglobine qu’il colore en rose-rouge [63]. Il contient aussi un colorant basique, l’azur de méthylène et met en évidence l’ADN qu’il colore en bleu [63]. Les cellules colorées par la méthode Wright-Giemsa abordent donc un noyau dans les teintes de violet et un cytoplasme pâle de coloration bleutée à rose [64]. Cette coloration permet entre autres d’évaluer la morphologie des cellules érythroïdes. Entre 50 000 cellules et 200 000 cellules ont été récoltées pour la coloration et

déposées sur une lame de microscope pour être centrifugées dans le Cytospin 3 (Shandon, Pittsburg, PEN, É-U) à 450 RPM pour 5 minutes. Les cellules ont par la suite été fixées dans du méthanol 100% pendant 5 minutes et séchées à la verticale pendant 15 minutes au minimum. Puis, les lames ont été colorées 15 minutes dans le colorant Giemsa (Sigma-Aldrich) dilué 1/20 et lavées dans l'eau pour 4 minutes. Les lames ont été séchées 15 minutes à la verticale, avant d'être observées au microscope.

4.5.2 Analyse des stades de différenciation érythroïde

Les lames colorées par Wright-Giemsa ont été observées au microscope (Froggabbio, North York, ON, Canada), à des grossissements de 400x et de 1000x. Une analyse qualitative de la couleur du noyau, de la couleur et de l'étendue du cytoplasme, ainsi que de la grosseur totale de la cellule a été effectuée. Ces caractéristiques permettent ainsi la détermination du stade de différenciation érythroïde (Figure 1.2). La coloration Wright-Giemsa permet de déceler les différentes caractéristiques morphologiques des stades de différenciation érythroïde. Les cellules au stade de proérythroblaste sont plutôt grosses, plus ou moins rondes, avec un cytoplasme bleu foncé et le noyau de couleur mauve occupe la majorité de la cellule. Les cellules au stade d'érythroblaste basophile ont diminuées en taille, possèdent un cytoplasme bleu plus clair et le noyau est de couleur mauve. Les cellules au stade d'érythroblaste polychromatophile ont comme caractéristiques un noyau condensé vers la paroi de couleur mauve pâle et un cytoplasme bleu clair. Elles ont aussi diminué en taille. Les cellules au stade d'érythroblaste acidophile ont encore diminué en taille, possèdent un cytoplasme clair, ainsi qu'un noyau bleuté condensé vers la paroi cellulaire. Les réticulocytes nucléés, sont plus petits, ont une coloration rosée et un noyau très condensé bleu foncé. Enfin, les réticulocytes sont petits de couleur rose pâle et ne possèdent pas de noyau [15].

4.5.3 Détermination de l'énucléation

Lors de l'observation des lames colorées par Wright-Giemsa au microscope, une énumération des cellules nucléées et énucléées a été effectuée pour chacune des conditions. Les cellules comptées comme étant nucléées sont les cellules possédant un noyau de couleur mauve à bleu foncé à l'intérieur de la cellule. Les cellules comptées comme étant énucléées

sont les cellules ayant atteint le stade de réticulocyte. Les cellules ayant atteint ce stade sont de couleur rose pâle et ne possèdent aucun noyau à l'intérieur. Un minimum de 100 cellules a été énuméré pour chaque condition. Un compte relatif des cellules énucléées a été effectué pour chacune des conditions selon le calcul suivant :

$$\% \text{ de cellules énucléées} = \frac{\text{Nombre de cellules énucléées}}{\text{Nombre de cellules nucléées} + \text{Nombre de cellules énucléées}} * 100$$