

1.3 Modèles cellulaires

1.3.1 Cellules de leucémie myéloïde chronique K562

Les cellules K562 sont des cellules provenant d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique [32, 37-39]. Elles sont caractérisées par la présence du chromosome de Philadelphie [32, 37-40] causé par une translocation et occasionnant une fusion entre deux gènes : le *breakpoint cluster region* (BCR) et l'oncogène Albersson (ABL) formant ainsi une protéine de fusion, BCR-ABL, possédant une tyrosine kinase constitutivement active [32, 40]. Les cellules K562 sont d'un grand intérêt en culture cellulaire. Elles constituent tout d'abord une lignée cellulaire immortalisée [32], non sensible à l'inhibition de contact [38], dont les voies de prolifération sont constitutivement activées par BCR-ABL [32]. Elles constituent aussi un excellent modèle de cellules myéloïdes capables de différenciation érythroïde [37, 41]. Étant immatures et peu différenciées, elles sont retrouvées majoritairement sous forme de blastes [37-39]. Elles sont donc capables de différenciation érythroïde sous l'action de différents inducteurs, tel que l'hémine [32, 39, 41-45]. Ce processus de différenciation favorise l'expression de certains marqueurs propres à cette lignée, tel que la glycophorine A [37]. Sa facilité de culture *in vitro*, ainsi que la possibilité d'induire la différenciation érythroïde en laboratoire font de cette lignée cellulaire un excellent modèle en hématologie pour étudier la différenciation érythroïde.

1.3.2 Cellules souches de sang de cordon

Les connaissances sur les propriétés thérapeutiques du sang de cordon ne datent que de quelques dizaines d'années. Effectivement, la première greffe fructueuse d'une seule unité de sang de cordon a été effectuée le 6 octobre 1988, par le Dr Eliane Gluckman sur un patient pédiatrique atteint de l'anémie de Fanconi, maladie normalement traitée avec des cellules de moelle osseuse [46]. Cette première greffe de sang de cordon a été effectuée selon les connaissances déterminant que les cellules de sang de cordon possèdent un potentiel d'expansion plus grand que les cellules provenant de la moelle osseuse [46]. Ce n'est que l'année suivante, en 1989, que le Dr Broxmeyer s'intéresse davantage au potentiel du sang de cordon comme source alternative de cellules souches pour la reconstitution du système hématopoïétique [47]. Ses travaux ont entre autres permis de découvrir que le sang de cordon

contient des cellules souches hématopoïétiques, ainsi que des progéniteurs hématopoïétiques [46]. Il a donc réussi à démontrer que le sang de cordon permet de reconstituer le système hématopoïétique de patients atteints de diverses conditions et ce avec succès [46]. Une telle utilisation du sang de cordon permet donc d'avoir recours à une source de cellules hématopoïétiques normalement traitée comme un déchet biologique en plus de ne pas nécessiter la moelle osseuse du patient, ni d'un donneur apparenté [47].

Les cellules souches de sang de cordon sont donc d'un grand intérêt pour la culture cellulaire. Elles sont tout d'abord plus primitives que celles contenues dans le sang périphérique et possèdent le même potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation lymphoïde ou myéloïde [47]. Le sang de cordon est aussi particulièrement riche en progéniteurs, qui sont plus immatures et qui ont un meilleur potentiel d'expansion par rapport aux autres sources de CSH [48]. Le fait que le sang de cordon soit considéré comme un déchet biologique après la naissance fait en sorte que cette source de CSH est davantage accessible et moins invasive [47], un atout en recherche et particulièrement pour la greffe. Par contre, le nombre de cellules contenues dans une unité est plutôt faible, ce qui peut contribuer à une baisse de rendement lors de l'isolation des cellules souches hématopoïétiques.

1.3.3 Les globules rouges *in vitro*

La demande mondiale en produits sanguins sécuritaires à des fins de transfusion est croissante, d'autant plus que la population mondiale tend à augmenter et est vieillissante [49-51]. L'approvisionnement en produits sanguins sécuritaires, particulièrement dans les pays non industrialisés, représente aussi un défi important, puisque les besoins en produits sanguins ne peuvent être comblés que par les dons [49-52]. De plus, les problèmes reliés aux infections transmises via la transfusion, telles que les hépatites et le VIH, ainsi que l'émergence de nouveaux pathogènes menace la sécurité et la qualification des produits sanguins [50-52]. Cela représente ainsi une préoccupation mondiale en matière de santé. La transfusion de produits sanguins représente une thérapie indispensable pour plusieurs conditions, particulièrement pour les anémies [50, 51]. La migration planétaire de différents groupes ethniques représente aussi un enjeu. Il existe donc une demande croissante pour des phénotypes de groupes sanguins plus rares, d'autant plus qu'il est essentiel de prendre en

considération la réalité des patients allo-immunisés [50, 51]. Cela rend donc les thérapies par transfusion sanguine encore plus difficiles à réaliser. Ces nombreux enjeux mettent en évidence le fait qu'il est indispensable de penser à une solution alternative.

La production de globules rouges *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques s'avère être une alternative potentielle. En effet, la production de globules rouges *in vitro* pourrait venir pallier à plusieurs problèmes. Tout d'abord, via la production importante de globules rouges, en plus d'avoir l'avantage de diminuer les risques de transmissions de maladies infectieuses et de pathogènes et d'être utile pour les patients ayant des phénotypes de groupes sanguins plus rares [49]. Advenant la possibilité d'utiliser une source cellulaire au potentiel infini de renouvellement pour la production, par exemple les cellules souches pluripotentes induites ou des lignées immortalisées aux génotypes hautement caractérisés, cette avenue s'avère des plus prometteuses. En effet, depuis quelques années, des efforts en recherche sont déployés partout sur la planète afin de développer une méthode efficace pour la production de globules rouges *in vitro*. Plusieurs groupes de recherche travaillent à développer un tel procédé [48, 49, 53-55]. En 2017, un groupe britannique a démontré comment une lignée d'érythroblastes humains immortalisés pouvait contribuer à la production de globules rouges *in vitro* [49]. D'autres groupes se concentrent sur la production de globules rouges *in vitro* à partir de CSH, approche qui a le désavantage de ne pas procurer une source cellulaire au potentiel de renouvellement infini. Ainsi, ces autres groupes qui travaillent sur le sujet depuis plusieurs années utilisent les cellules souches hématopoïétiques différenciant dans la voie érythroïde pour développer un procédé de production de globules rouges *in vitro* [50]. Ils visent donc à reproduire *in vitro*, le plus fidèlement possible, le microenvironnement dans lequel se déroule l'érythropoïèse *in vivo* [50]. Pour ce faire, ils développent et utilisent des combinaisons de diverses cytokines et une variation de la concentration de ces cytokines, afin d'engendrer la différenciation et la maturation des cellules érythroïdes [50, 54]. Puis, ces procédés sont optimisés sur diverses sources de cellules souches hématopoïétiques et autres, afin d'avoir un rendement de production le plus optimal possible [53-55]. Il est évident que les globules rouges ainsi produits en laboratoire doivent être fonctionnels et posséder les mêmes propriétés que les globules rouges retrouvés chez les humains. Les globules rouges *in vitro* doivent donc avoir les mêmes capacités de déformabilité, un contenu en enzymes identique, la même capacité de l'hémoglobine à lier

et relâcher l'oxygène, ainsi qu'une expression des antigènes de groupes sanguins semblable aux globules rouges retrouvés chez humains [54, 55].

Jusqu'à ce jour, plusieurs défis de nature économique et technique ont été rencontrés par ces équipes [51]. Tout d'abord, un premier problème concerne l'énucléation des érythroblastes en fin de maturation [50, 51]. Il a été démontré que la maturation complète des érythrocytes, comprenant le processus d'énucléation, n'est possible que dans un milieu de culture reproduisant avec fidélité le microenvironnement hématopoïétique *in vivo* [54]. Il a été démontré qu'il est difficile d'engendrer l'énucléation *ex vivo*, mais que l'énucléation se déroule normalement lorsque les cellules en fin de maturation sont injectées dans l'organisme [54]. Comme le mécanisme d'énucléation n'est pas encore bien défini, il est difficile de développer un protocole permettant d'atteindre la maturation finale et d'obtenir des globules rouges fonctionnels [48, 55]. Par la suite, un autre problème rencontré est le rendement de production. La production à grande échelle de globules rouges *in vitro* est en ce moment ni suffisante, ni rentable pour combler les besoins [50]. En effet, la prolifération des cellules souches hématopoïétiques est limitée, produisant un nombre sous optimal de cellules au final [49, 51, 53-55]. Il s'avère donc essentiel pour les chercheurs de mieux comprendre les divers mécanismes de l'érythropoïèse [51]. Cela pourrait permettre d'établir le développement d'un milieu de culture favorisant une prolifération massive des cellules hématopoïétiques et ainsi atteindre une production suffisante de globules rouges [51]. Enfin, le problème majeur réside dans le fait que les coûts de production d'un tel procédé sont extrêmement élevés. La diminution des coûts passe entre autres par la diminution de la quantité de milieu de culture nécessaire et par l'utilisation de bioréacteurs afin de diminuer la surface de culture utilisée [48, 50, 51, 53].

La production massive de globules rouges *in vitro* engendre ainsi des défis de nature technique et économique. Il est essentiel de passer d'un modèle de production à petite échelle en laboratoire à une production industrielle et ce à moindre coûts. Jusqu'à aujourd'hui il reste encore très difficile de développer des conditions techniques qui permettraient une production de globules rouges *in vitro* efficace, sécuritaire, conforme et abordable. Tout de même, la production de globules rouges *in vitro* représente toujours une avenue potentielle et prometteuse sur laquelle plusieurs équipes de recherche travaillent.

1.3.4 Hyperthermie

L'hyperthermie est reconnue comme pouvant servir de traitement pour divers cancers en combinaison avec la chimiothérapie ou la radiothérapie [56]. Elle contribuerait à engendrer la mortalité de certaines cellules cancéreuses [56]. Plus récemment, des effets positifs de l'hyperthermie légère (autour de 39 degrés) sur la prolifération des cellules myéloïdes ont été découverts par hasard à Héma-Québec. Il semblerait que le système hématopoïétique soit sensible à de tels changements de température. Entre autres, il a été démontré que l'hyperthermie légère accélère et augmente la mégacaryopoïèse, ainsi que la thrombopoïèse *in vitro* [57, 58]. Ces effets sont tout à fait intéressants scientifiquement, particulièrement en terme de production cellulaire, diminuant possiblement le temps pour l'accumulation d'un certain nombre de cellules pour l'utilisation thérapeutique. De plus, il a été démontré dans une autre étude menée par des chercheurs d'Héma-Québec, que l'hyperthermie favorise le développement et la maturation érythroïde [11]. Ces travaux montrent que l'hyperthermie agirait entre autres en synergie avec l'EPO, ce qui contribuerait à promouvoir et accélérer le développement érythroïde *in vitro* de cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon [11]. Ainsi, l'augmentation de l'expansion des cellules et l'accélération de la différenciation en hyperthermie, justifie le fait que l'hyperthermie joue un rôle important dans les divers processus de différenciation du système hématopoïétique.

1.4 Le système sanguin

1.4.1 Les cellules du système sanguin

L'hématopoïèse et ses différentes voies de différenciation mènent à la formation d'une multitude de cellules sanguines spécialisées provenant initialement des cellules souches hématopoïétiques. D'une part, la voie lymphoïde sert à la production de leucocytes tels que les lymphocytes B, des lymphocytes T, ainsi que des cellules NK. Ces cellules ont majoritairement un rôle à jouer dans la défense du système immunitaire. D'autre part, la différenciation dans la voie myéloïde entraîne entre autres la formation d'érythrocytes, dont la fonction est le transport de l'oxygène à travers l'organisme. La voie myéloïde permet aussi la formation de leucocytes, qui sont essentiellement des cellules immunitaires. Parmi ces

leucocytes on retrouve les granulocytes neutrophiles, les granulocytes éosinophiles et les granulocytes basophiles. Enfin, la voie myéloïde engendre la formation des monocytes, ainsi que des mégacaryocytes. La maturation finale des mégacaryocytes permet la production de plaquettes, impliquées dans la coagulation sanguine.

1.4.2 Les maladies du système hématopoïétique

Les multiples cellules du système sanguin sont sujettes à divers troubles médicaux qui peuvent altérer leurs fonctions. Ces troubles peuvent être hérités ou acquis au cours de la vie [59]. Cela contribue souvent à altérer l'état de santé et la qualité de vie de la personne atteinte. Parmi les maladies les plus communes, on retrouve les anémies et les thalassémies, qui sont caractérisées par des défauts dans la synthèse de l'hème [59]. On retrouve aussi les hémoglobinopathies, décrites comme étant des défauts hérités affectant l'hémoglobine [59]. Parmi celles-ci, citons l'anémie falciforme qui est la maladie monogénique la plus répandue mondialement [60]. Les thrombocytoses sont aussi des maladies de nature hématologique assez répandues [59]. Différents cancers peuvent aussi affecter le système hématopoïétique, comme les leucémies de diverses natures. Enfin, il est important de noter que plusieurs maladies affectant les cellules du système sanguin apparaissent suite à une infection virale, tel que le virus d'immunodéficience humaine (VIH) [59]. Plusieurs traitements, de nature pharmacologique ou non, sont développés pour traiter ces divers troubles hématologiques. Dans certains cas, la transfusion de culots globulaires demeure l'unique option non pas pour traiter la maladie, mais pour stabiliser l'état de santé du patient. Ainsi, étant donné la complexité des maladies de nature hématologique, les possibilités de traitements sont parfois assez limitées.

1.5 Héma-Québec

Héma-Québec est responsable de l'approvisionnement, du traitement et de la distribution de produits sanguins et de ses dérivés au Québec. Le tout est effectué de façon sécuritaire avec efficience, ce qui permet d'offrir un service de qualité aux hôpitaux du Québec. En plus des produits sanguins, Héma-Québec est responsable du traitement et de la distribution de tissus

humains, de cellules souches issues de sang de cordon, de produits cellulaires et s'occupe de la gestion d'une banque de lait maternel unique au Québec. Ainsi, au cours des dernières années Héma-Québec a évolué afin de répondre efficacement aux besoins multiples des québécois en matière de santé [61]. De plus, Héma-Québec est aussi responsable de s'approvisionner et de distribuer des produits stables, tels que les immunoglobulines ou bien l'albumine.

Héma-Québec est constituée de plusieurs secteurs d'activité, dont la recherche et développement et les affaires médicales. Ces deux secteurs entretiennent des liens étroits, afin de répondre de façon efficiente aux besoins des québécois. Les affaires médicales sont responsables d'offrir des services et des conseils en matière d'hématologie, de microbiologie et d'épidémiologie aux services hospitaliers du Québec.

1.5.1 Cas clinique ayant motivé la présente étude

En 2014, le cas d'une femme de 61 ans présentant des symptômes d'anémie hémolytique auto-immune sévère et une réticulocytopénie a été pris en charge par un médecin hématologue d'Héma-Québec, Dr André Lebrun. La patiente a d'abord été transfusée avec 5 unités de culot globulaire, qui n'ont pas eu les résultats escomptés en termes d'amélioration de son état de santé. Au contraire, la réticulocytopénie continua de s'aggraver, justifiant davantage de transfusions. Étant donné l'évolution de son état de santé, une thérapie immunosuppressive a été débutée. La nature de cette thérapie a évolué selon les traitements et l'état de santé de la patiente, mais comprenait du méthylprednisolone, des immunoglobulines, ainsi que de l'anti-CD20 (Rituximab). Une analyse cytologique a par la suite révélé une aplasie de la moelle osseuse affectant les progéniteurs érythroïdes chez cette patiente. Plus précisément, un nombre élevé d'érythroblastes acidophiles a été observé lors de cette analyse, suggérant que ce type de cellules était la cible de l'inhibition menant à l'arrêt de la différenciation et de la maturation, de l'apoptose et de la réticulocytopénie causant l'anémie. L'anémie hémolytique auto-immune (AIHA) a par la suite été confirmée par la présence d'anticorps anti Gerbich 3 (anti-Ge3), malgré la présence d'antigène Gerbich 3 (Ge3) sur les globules rouges de la patiente. À partir de ce moment, la patiente a été transfusée avec des unités Ge3 négatives. Malgré cela, les effets de ces transfusions ne contribuaient

pas à l'amélioration de son état de santé devenu très critique. Avec un accord spécial de Santé Canada, sous le programme d'accès spécial, un traitement au Normosang® (hémine humaine) a été effectué chez la patiente. Dans ce cas-ci, le médecin d'Héma-Québec a cité en référence, un papier publié par Wang et al, en 2013 dans la revue *Transfusion* [62], qui démontrait que l'hémine contribuait à lever le mécanisme d'inhibition de la différenciation et de la maturation vers la lignée érythroïde causé par un anticorps anti glycophorine C (anti-GPC). Ainsi, une première dose de 250mg de Normosang® lui a été administrée et ce traitement a été maintenu aux deux jours pendant 29 jours. Deux jours après la première administration de Normosang®, une augmentation significative des réticulocytes, du taux d'hémoglobine, ainsi que du nombre de plaquettes a été observée. Ces données ont atteints des taux au-delà des valeurs normales trois jours après l'injection, atteignant un point culminant après 9 jours et le tout a été maintenu tout au long du traitement au Normosang®. Ces taux sont revenus à la normale sept jours après l'arrêt du traitement. Suivant ce traitement, l'état de la patiente s'est grandement amélioré. Son niveau d'hémoglobine a été maintenu, son nombre de réticulocytes et de globules rouges ont atteints des niveaux normaux. De plus, l'anticorps anti-Ge3 était faiblement détectable, probablement causé par la thérapie immunosuppressive. Il semble donc que le traitement à l'hémine humaine aurait contribué à l'amélioration de l'état de santé de la patiente. Il a été supposé par le médecin d'Héma-Québec que l'hémine favoriserait l'augmentation de la synthèse d'hémoglobine dans les érythroblastes acidophiles, ce qui favoriserait la maturation et l'énucléation des cellules érythroïdes.

1.5.2 Origine et intérêt du projet

Le cas clinique décrit au paragraphe précédent suggère que le traitement au Normosang® a causé l'augmentation du nombre de globules rouges, de plaquettes, ainsi que du niveau d'hémoglobine chez la patiente traitée. Ces observations intéressantes ont poussé Héma-Québec à se demander si le Normosang® pourrait avoir des indications thérapeutiques autres que le traitement des crises aiguës de porphyrie. Ainsi, une meilleure caractérisation du mécanisme d'action de l'hémine pourrait permettre de possiblement élargir le spectre des indications cliniques du Normosang® pour le traitement de multiples maladies de nature

hématologique, possiblement d'autres types d'anémie. L'hémine pourrait aussi améliorer la production de globules rouges *in vitro* avec un effet accentuant la maturation des précurseurs et possiblement sur l'énucléation.

2. Hypothèse

Étant donné que les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'hémine, ainsi que ses effets spécifiques sur les cellules souches hématopoïétiques demeurent peu documentés, surtout dans des modèles cellulaires non cancéreux, nous croyons qu'une meilleure connaissance à ce sujet pourrait permettre d'élargir le spectre d'application de l'hémine. Suite au cas clinique décrit précédemment, nous suggérons que l'hémine aurait un effet sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs myéloïdes communs, résultant en une augmentation de la production d'érythrocytes et de plaquettes.

3. Objectifs

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est de caractériser les effets d'un traitement à l'hémine sur la prolifération et sur la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon et sur les précurseurs à différents stades de leur différenciation érythroïde. Pour arriver à atteindre cet objectif principal et afin de vérifier l'hypothèse, deux objectifs spécifiques ont été fixés :

1. Vérifier l'activité de l'hémine sur la lignée cellulaire modèle K562 :

- Effectuer une dose réponse de l'hémine sur ces cellules, afin de déterminer la concentration optimale d'hémine dans une culture type.
- Mesurer les effets de l'hémine sur la prolifération cellulaire.
- Mesurer les effets de l'hémine sur la viabilité cellulaire.
- Évaluer la production d'hémoglobine chez les cellules traitées à l'hémine.
- Évaluer l'effet de l'hyperthermie en combinaison avec l'hémine sur la prolifération cellulaire.
- Évaluer l'effet de l'hyperthermie en combinaison avec l'hémine sur la viabilité cellulaire.

2. Évaluer les effets de l'hémine sur les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon :

A) Dans un milieu de culture maison favorisant la différenciation érythroïde lorsque l'hémine est ajoutée dès le début de la culture

- Mesurer les effets de l'hémine sur la prolifération cellulaire.
- Mesurer les effets de l'hémine sur la viabilité cellulaire.
- Évaluer la différenciation érythroïde des cellules par cytométrie en flux.
- Caractériser la morphologie cellulaire par coloration Wright-Giemsa.
- Évaluer les effets de l'hémine sur la modulation de la maturation finale et l'énucléation.

B) Dans un milieu de culture maison favorisant la différenciation érythroïde lorsque l'hémine est ajoutée plus tard en cours de culture

- Mesurer les effets de l'hémine sur la prolifération cellulaire.
- Mesurer les effets de l'hémine sur la viabilité cellulaire.
- Évaluer la différenciation érythroïde des cellules par cytométrie en flux.