

Sénescence des globules rouges induite *ex vivo* par les plasmas de patients Drépanocytaires :

corrélation entre les marqueurs et conséquences en terme d'adhérence
durant les événements aigus de la maladie

Philippe CHADEBECH

philippe.chadebech@efs.sante.fr

EFS, Inserm et IMRB U955 équipe 2
« Transfusion et Maladies du Globule Rouge »

Hôpital Henri-Mondor, Créteil

Directrice d'équipe : F. Pirene



Déclaration de conflits d'intérêts

Nom : **Philippe CHADEBECH, PhD**



Je n'ai pas de conflit d'intérêt

Modèle d'étude : la maladie drépanocytaire

➤ Drépanocytose :

hémoglobinopathie → mutation, position 6 β -globine

⇒ Production d'une HbS anormale ⇒ polymérisation ⇒ rigidité / fragilité des GR

- ↘ durée de vie du GR
- adhérence aux parois vasculaires

➤ Conséquences cliniques de la mutation :

⇒ Atteintes chroniques

- anémie hémolytique + risque infectieux (asplénie fonctionnelle)

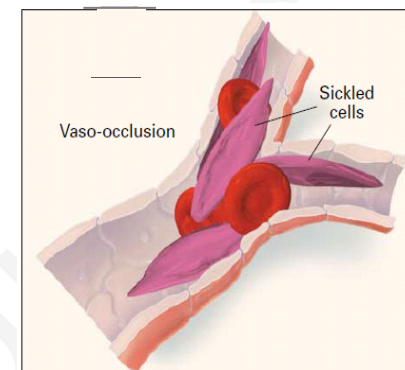
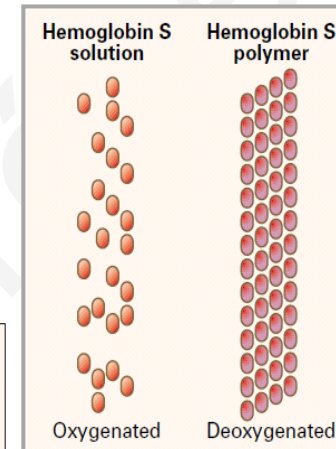
⇒ Complications aiguës

- crises vaso-occlusives (CVO) douloureuses
- ⇒ infarctus (zones osseuses ; tous les organes)
- hémolyses sévères

Surmonter épisodes aiguës : transfusion de CGR phénotypés

- apport d'HbA ⇒ diminuer le taux d'HbS
- corriger une anémie brutale, sortir de crise, intervention chir.

➤ Equipe de recherche EFS / Inserm → étude des complications de la transfusion



D'après Steinberg



Sénescence des globules rouges (AA) transfusés

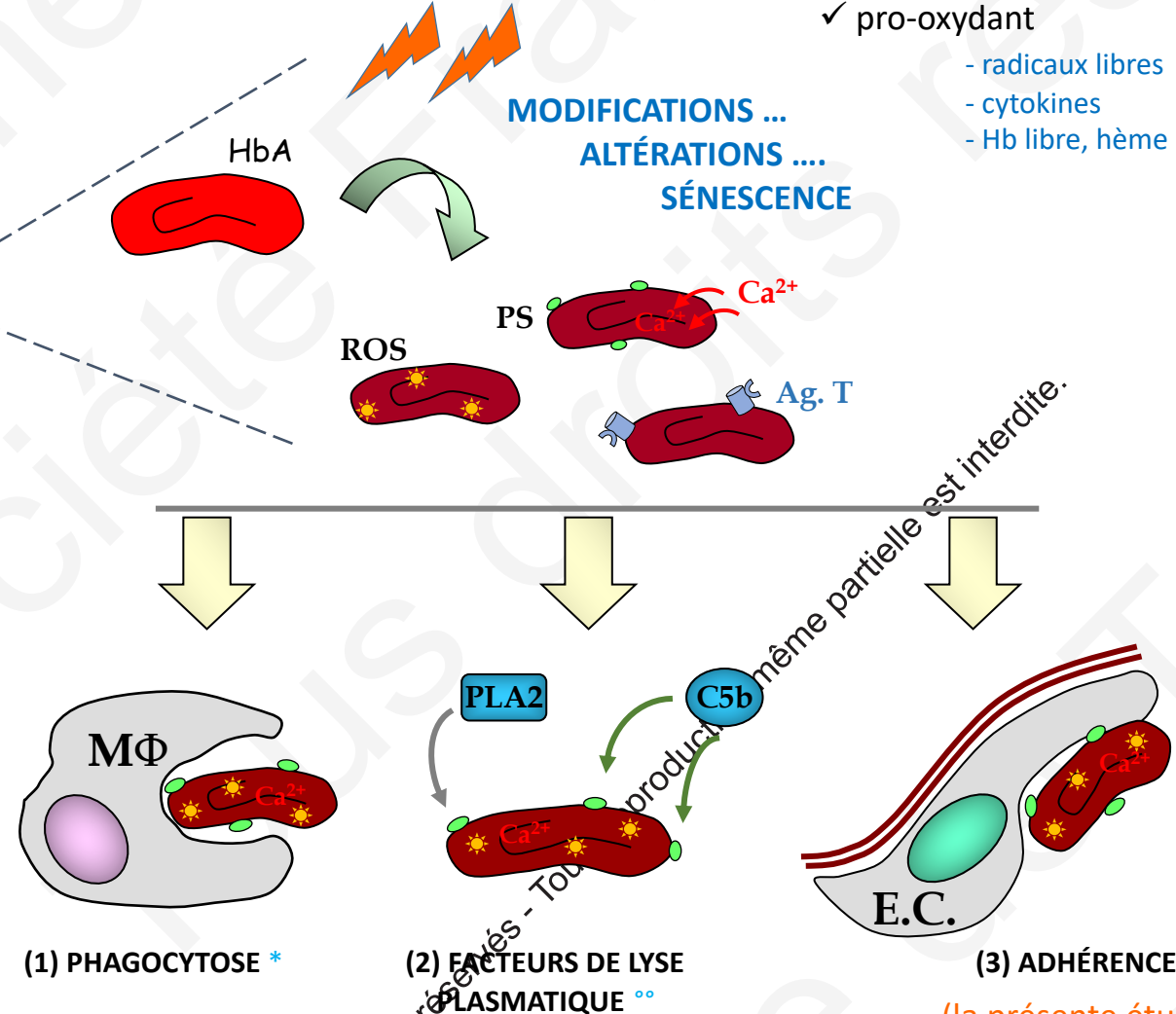


- Impact de l'âge du CGR
- Patients transfusés, contextes cliniques étudiés :
 - Drépanocytaires
 - Sepsis sévère
 - SHU

Contexte transfusionnel : ✓ pro-inflammatoire
✓ pro-oxydant

MODIFICATIONS ...
ALTÉRATIONS ...
SÉNESCENCE

- radicaux libres
- cytokines
- Hb libre, hème



Chadebech P., Transfusion **2009***, **2016**, **2017**
 Burin des Rozières N., Transfusion **2011°°**, **2015**
 Moh-Klaren J., Transfusion **2017**
 Roumenina L.T., Am J Hematol **2020°°**
 Domingues-Hamdi E., Blood Trf **2021**

2021 © Société Française de Transfusion Sanguine. Tous droits réservés - Tous droits réservés - Tous droits réservés

PROBLÉMATIQUE / OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

• Objectifs principaux

- ⇒ Valider la sénescence des GR plasma-induite sur 1 large cohorte
- ⇒ Caractérisation approfondie des GR sénescents

• Objectifs secondaires

- ⇒ Conséquences de l'apparition de GR (AA) sénescents ?
- ⇒ Contribution aux événements occlusifs chez les patients

MÉTHODOLOGIE

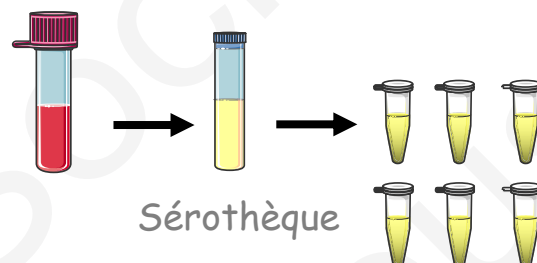


Etude SCD-TRANSFU
(ANR 2012-2016)

Cohorte : patients drépanocytaires SS adultes

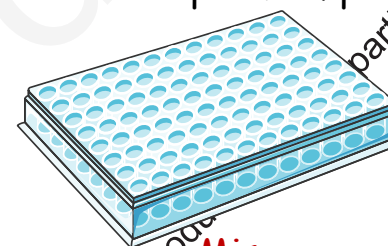
- ⇒ suivi transfusionnel (694 inclusions)
 - 312 cas individuels, 27 DHTR documentées
- ⇒ indications cliniques
 - protocole transfusionnels (PT), chirurgies,
 - crises algiques, CVO, STA, HTR, femmes enceintes

Prélèvements patients / donneurs



Sérothèque

Co-incubations :
GR de poches / plasmas



Mise en contact
24 - 48 heures à +37°C



- Analyses :
- Sénescence par marquages C.flux,
 - Rhéologie, densité, résistance osmotique,
 - Adhérence en flux sur Biochip

PROBLÉMATIQUE / OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

- Objectifs principaux

- ⇒ Valider la sénescence des GR plasma-induite sur 1 large cohorte
- ⇒ Caractérisation approfondie des GR sénescents

- Objectifs secondaires

- ⇒ Conséquences de l'apparition de GR (AA) sénescents ?
- ⇒ Contribution aux événements occusifs chez les patients

RÉSULTATS

- (1) Détection des marqueurs de sénescence
- (2) Analyse des propriétés d'adhérence

- Exposition de la phosphatidylsérine (PS) à la surface des GR sénescents

- ⇒ PS externalisée : prothrombotique et attractif pour les phagocytes /cellules endothéliales activées
- ⇒ contribue à l'anémie + complications ischémiques dans la Drépanocytose
- ⇒ suite à une cascade d'événements, qui suit l'augmentation du Ca^{2+} intra-globulaire.

Simon R. and Lewis L. PLOS Comput. Biol. **2021**

Walud R. et al. Scientific Reports **2020**

Klei T.R. et al., Blood Adv **2020**

Kuck L. et al., BBA **2020**

Résultats (1) : Sénescence

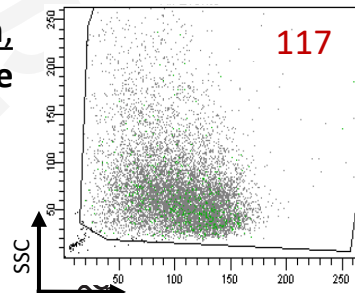
✓ Cinétique d'apparition des marqueurs durant la sénescence plasma-induite des GR (AA)

Taille des GR
(FSC GeoMean)

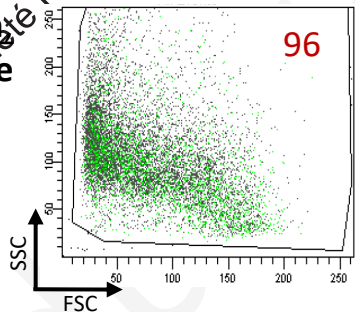
Exposition de PS
(Annexin V FITC)

Influx de Ca^{2+}
(Fluo3/AM)

T 48h,
Basal state



T 48h,
Acute phase



- ⇒ Contrôles négatifs préalables (déjà publiés), non-représentés ici :
- GR co-incubés 24 et 48h à +37°C sans plasmas
 - GR co-incubés 24 et 48h face aux plasmas de donneurs sains

Résultats (1) : Sénescence

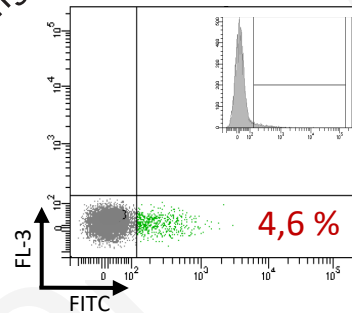
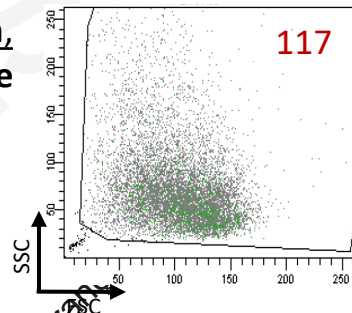
✓ Cinétique d'apparition des marqueurs durant la sénescence plasma-induite des GR (AA)

Taille des GR
(FSC GeoMean)

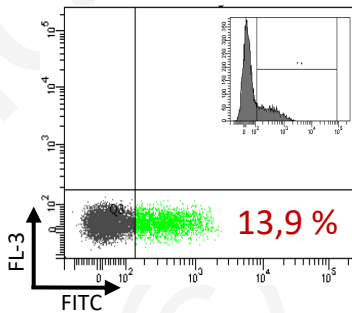
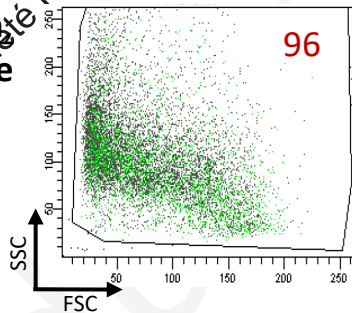
Exposition de PS
(Annexin V FITC)

Influx de Ca^{2+}
(Fluo3/AM)

T 48h,
Basal state



T 48h,
Acute phase

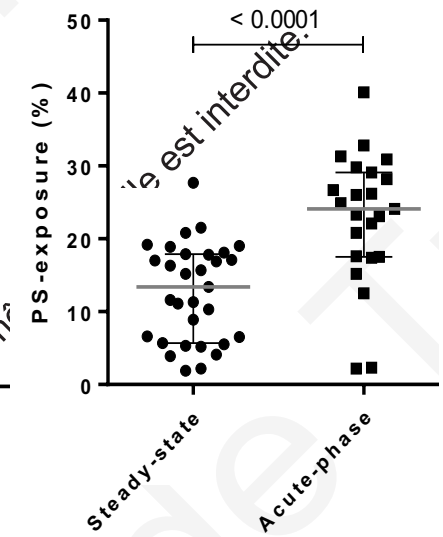
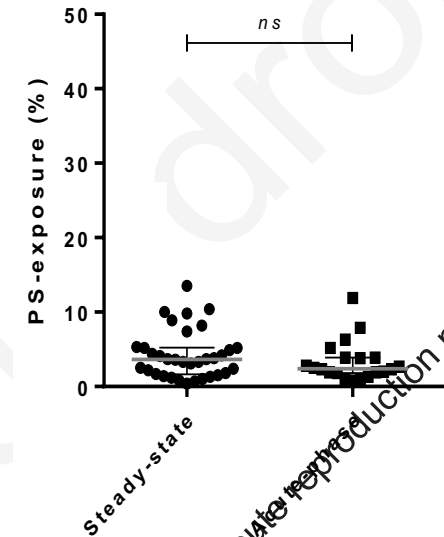


Marqueur de sénescence (n=54)

Exposition de PS (%)

T 24h

T 48h

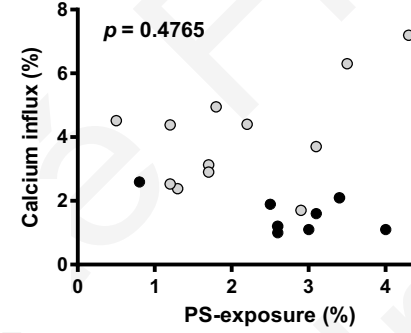
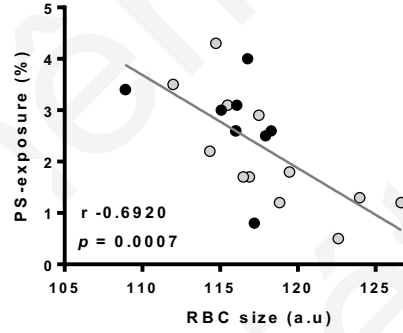
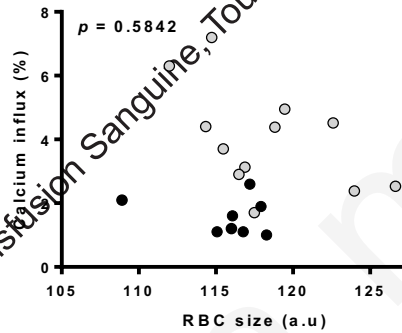


- ⇒ Contrôles négatifs préalables (déjà publiés), non-représentés ici :
- GR co-incubés 24 et 48h à +37°C sans plasmas
 - GR co-incubés 24 et 48h face aux plasmas de donneurs sains

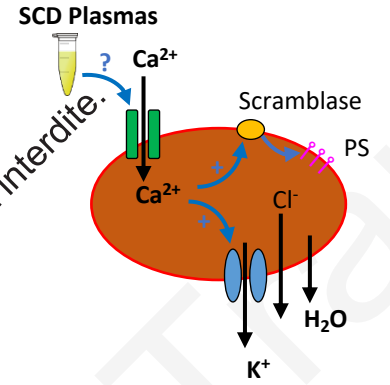
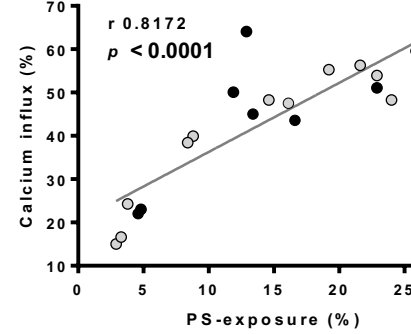
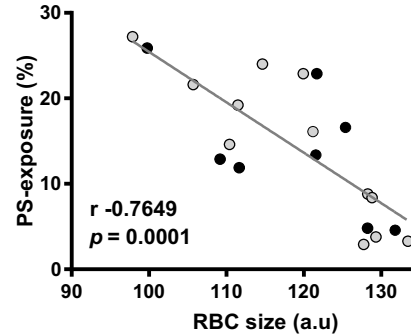
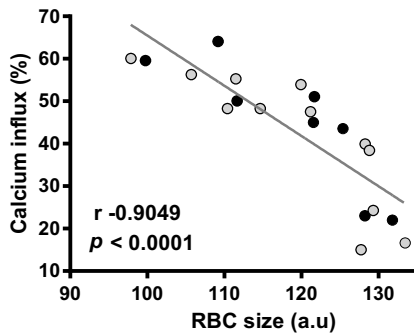
Résultats (1) : Sénescence

- ✓ Les marqueurs de sénescence *plasma induite* des GR (AA) issus de CGR sont corrélés

24h co-incubations



48h co-incubations



- Canal calcique
- Scramblase
- Canal Gardos
- Phosphatidylsérine

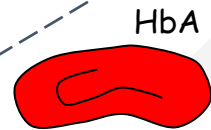
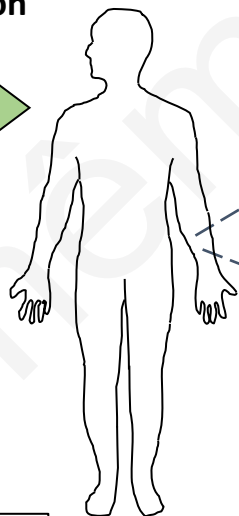
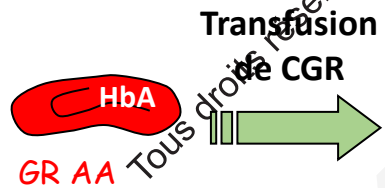
CONCLUSIONS (1)

- Impact des plasmas de patients drépanocytaires sur les GR (AA) issus de poches

- ⇒ sénescence des GR (AA) : marqueurs spécifiques, apparition séquentielle (taille partielle PS+ $\nearrow$ Ca^{2+} , ROS $\nearrow$)
- ⇒ marqueurs de sénescence corrélés 2 à 2
- ⇒ "grade" de sénescence détecté = lié à la sévérité clinique du plasma considéré



Résultats (2) : Adhérence



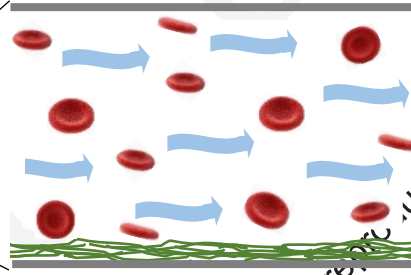
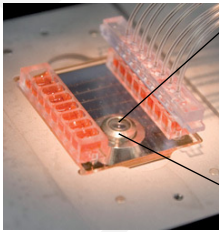
MODIFICATIONS ...
ALTÉRATIONS ...
SÉNESCENCE



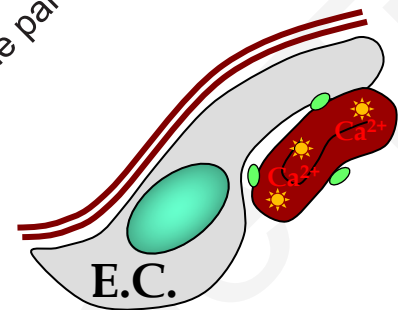
microfluidic KIMA pump



Cellix Vena8

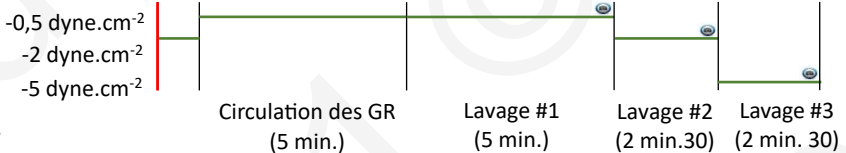


TSP-1



(3) ADHÉRENCE

Programme



Pas d'adhérence

GR en flux

GR adhérent



Shear stress

- TSP-1 et adhérence des GR

- ⇒ vieillissement en poches de sang : ↗ adhésion des GR à la thrombospondine
- ⇒ patients Drépâno. durant crises algiques (CVO) → augmentation du taux en TSP-1 plasmatique

- Canaux membranaires régulant la physiologie des GR

- ⇒ Gardos (KCa3.1) :
 - canal régulant l'efflux de K^+ / conduit à la sénescence des GR
 - activateurs : TRAM34 et Senicapoc

- ⇒ Piezo1 :
 - canal mécanosensible ; entrée de Ca^{2+} dans les GR
 - activation par Yoda 1 → déshydratation

- ⇒ Gardos et Piezo1 : possibles cibles thérapeutiques pour contrôler l'homéostasie du GR

Jansen J. et al., *Blood Adv.* **2021**

Klei T.R. et al., *Blood Adv.* **2020**

Kuck L. et al., *BBA* **2020**

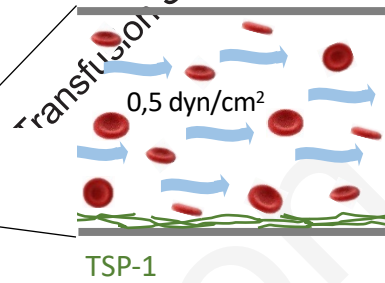
Rogers S. and Lew V.L., *PLOS Com. Biol.* **2021**

Klei T.R. et al., *Blood Adv.* **2020**

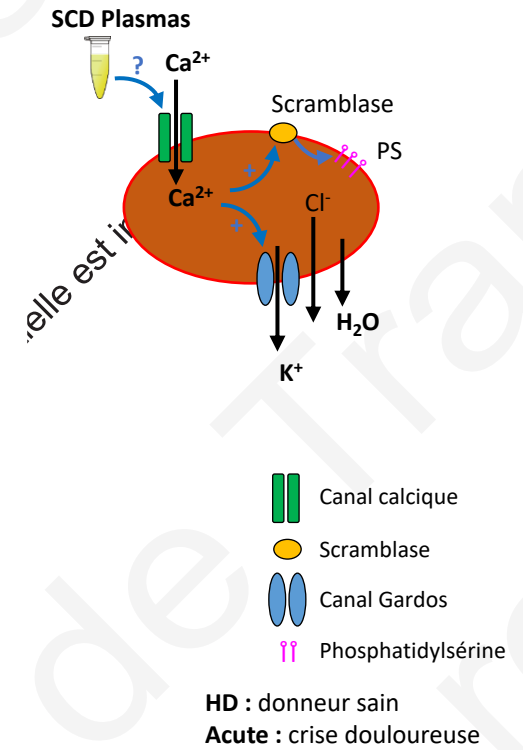
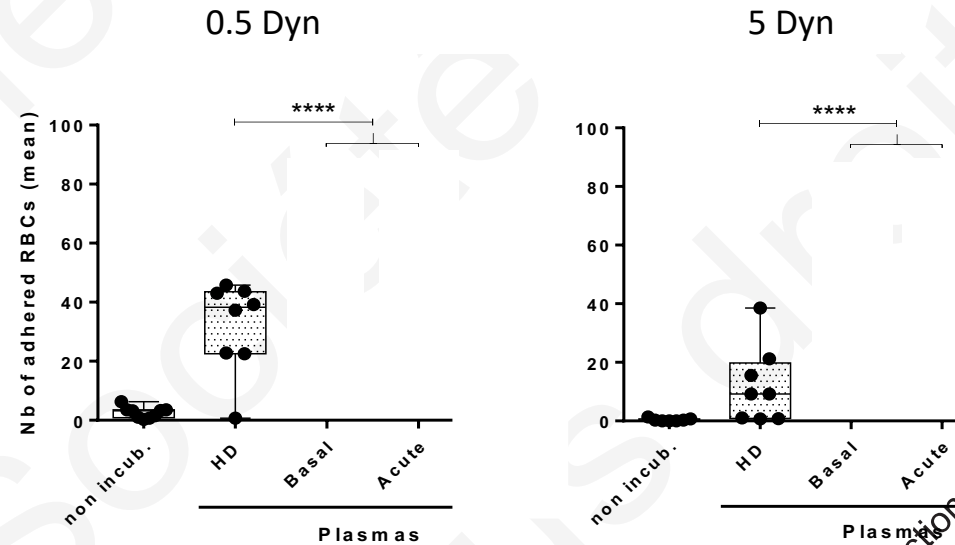
Calahan S.M. et al., *eLife* **2015**

Résultats (2) : Adhérence

- ✓ Les plasmas de Drépano. induisent l'adhérence en flux à la TSP des GR (AA) rendus sénescents



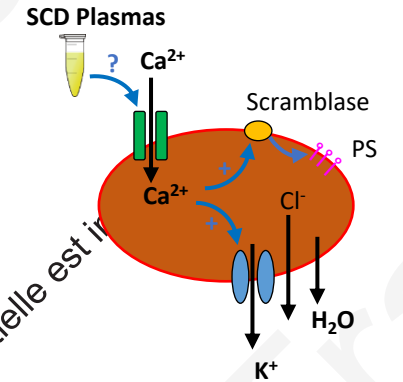
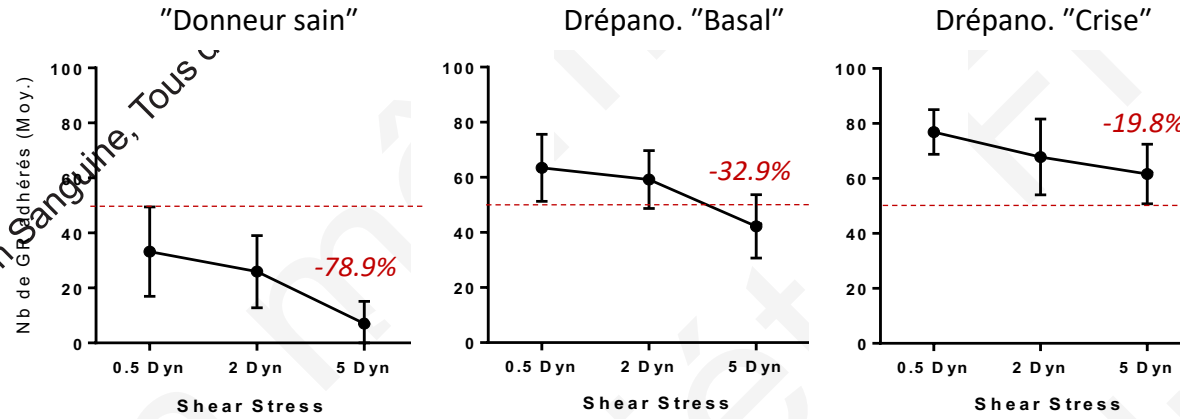
Shear stress appliqué



Résultats (2) : Adhérence

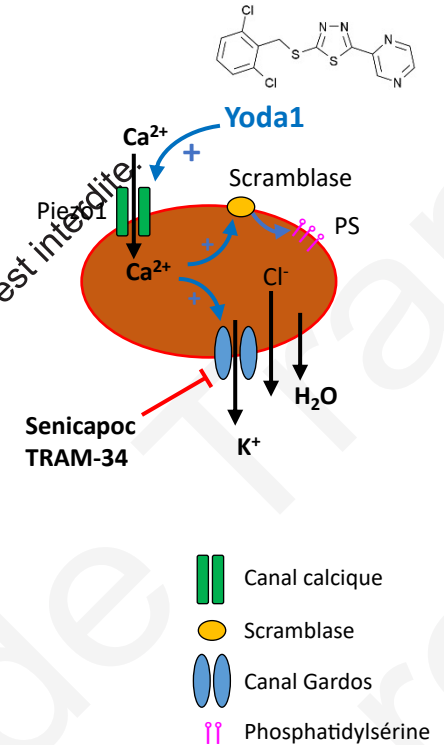
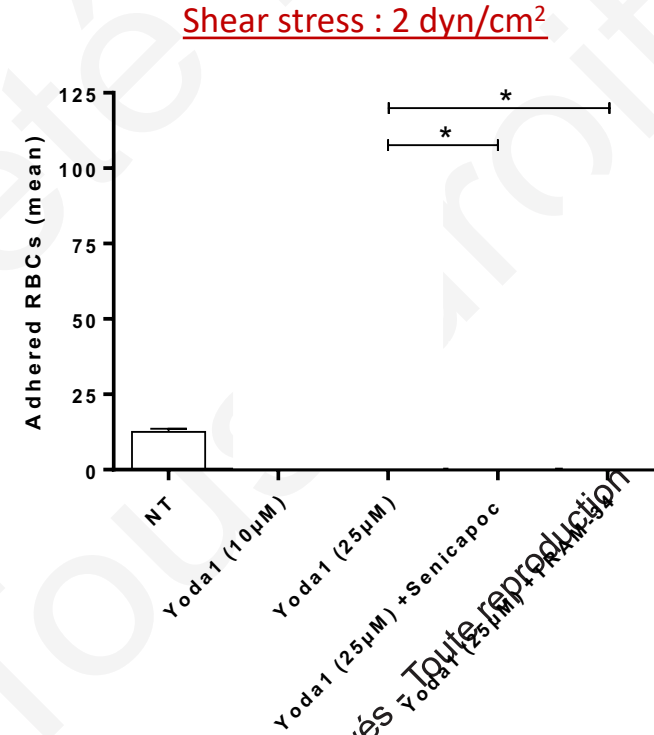
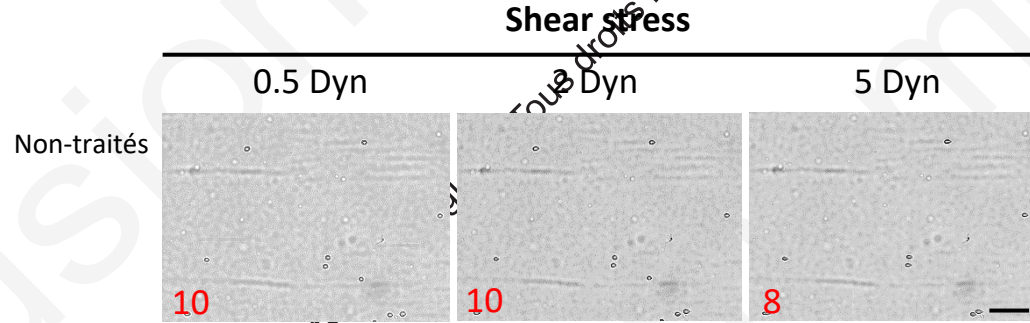
- ✓ Mesure des forces d'adhérence des GR (AA) rendus sénescents

Catégories de plasmas



Résultats (2) : Adhérence

- ✓ Modélisation *in vitro* : effet d'activateurs du canal Gardos sur l'adhérence des GR « natifs »



CONCLUSIONS (2)

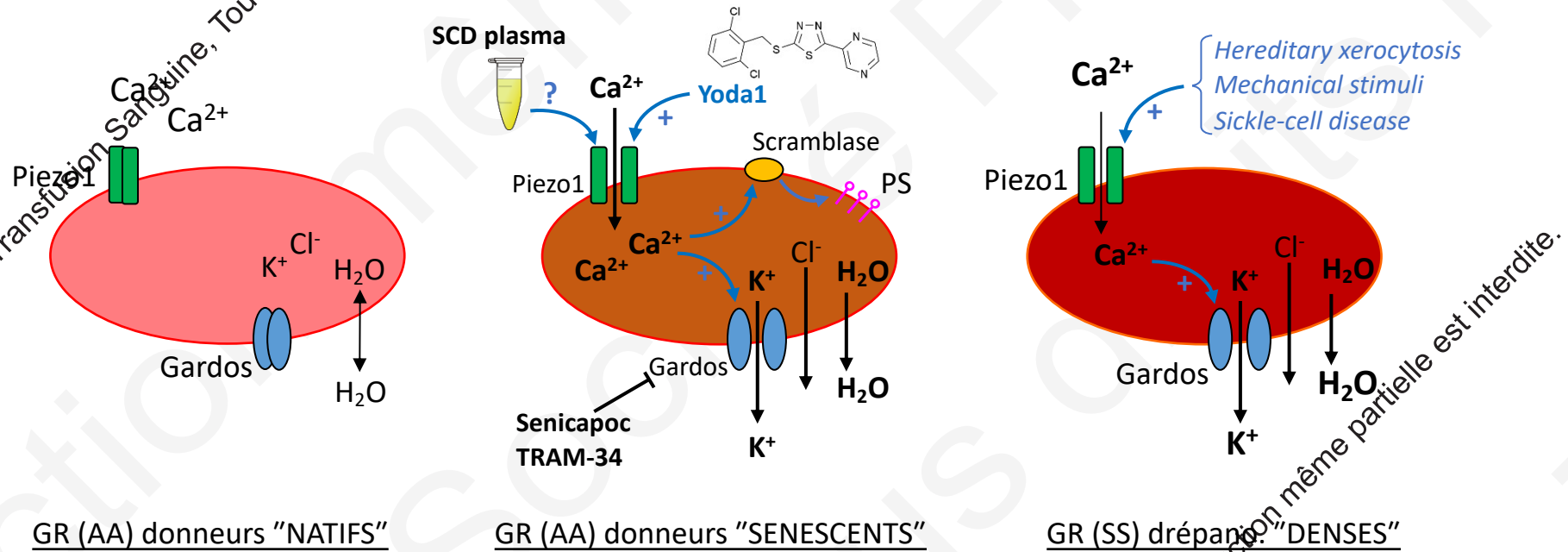
- Plasmas de patients "en phase aiguë" affectent l'adhérence des GR (AA)
 - ⇒ adhérence : **TSP1 +++** pour CVO compliquées de STA
- Bloquer la deshydratation des GR (canaux Gardos) = inhibition d'adhérence
- Conséquences physiopathologiques pour les patients en post-transfusion ?
 - ⇒ idem aux GR SS Drépano. denses durant les CVO
- Partenaires moléculaires qui régulent / médient l'adhérence ?
 - ⇒ **CD36/GPIIIb** ... ? Non, car les GR CD36 (-) adhèrent à la TSP
 - ⇒ **intégrine $\alpha 4\beta 1$** ... ? Non, car exprimée sur les réticulocytes uniquement ⇒ absente dans les CGR !
 - ⇒ **Annexine V** recomb. ? Non !
 - ⇒ **anti-CD47/IAP** natif ou anti-CD47 oxydé 2D3 ... ? Résultats non concluant !



Di Roberto G. et al., Am J. Hematol. 2016

Rakotoson M.G. et al., Orphanet J Rare Dis. 2015

MODÈLE : SÉNESCENCE *EX VIVO* DES GR (AA)



Chadebech P. et al. (vol 11) 963, 2021



biomolecules

Di Liberto G. et al., Am J. Hematol. 2016

Rakotoson M.G. et al., Orph J Rare Dis 2015



Inserm



Etablissement Français du Sang Ile-de-France
Site Henri-Mondor, Inserm U955 & IMRB

Gwellaouen Bodivit
Corinne Vasseur
France Pirenne

Alicia Jouard
Gaétana Di Liberto

Merci pour votre attention ...



AP-HP.
Hôpitaux universitaires
Henri-Mondor



Unité des Maladies Génétiques du Globule Rouge
Médecine Interne, UMGR, AP-HP

Anoosha Habibi

Frédéric Galactéros

Pablo Bartolucci



Financements :



AGENCE NATIONALE DE LA RECHERCHE
ANR

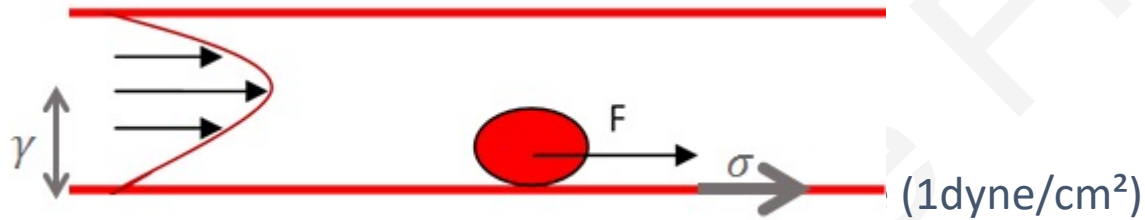


2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

Modélisation de l'adhérence

- Modélisation 2D du flux à travers les capillaires sanguins:



- Shear stress : $\sigma = F/s$
- Shear rate : $\gamma = \frac{8.Q\nu}{D} = \frac{4Q\nu}{\pi r^3}$
- Phénomène critique : $\Phi = \frac{\Delta P}{R\{\phi_i(\sigma, \gamma_i)\}}$

F : Force

s : Surface

$Q\nu$: débit {viscosité}

D : diamètre

Φ : Flux total

ΔP : Différence de pression

R : Résistance

ϕ_i : Flux unitaire

Les hémolyses retardées dans la Drépanocytose



HbA
GR AA

Transfusion
de CGR

Patient transfusé

J8 ... J15

Mauvais rendement
Hémolyses à bas bruit
Hémolyses retardées sévères
Décès avec choc, CIVD

Pronostic vital
Impact sur la maladie

6 % des causes de décès

Habibi A. ASH congress 2021

Hémolyses anticorps-dépendantes

- Anticorps d'allo-immunisation
- Auto-anticorps

Noizat-Pirenne F., Vox sanguinis 2015
Ibanez C., Transfusion 2016
Habibi A., Am. J. hemitol 2016

Incidence :
4,2 % / OTE
6,8 % / patient

Narbey D., Am J Hematol 2017
Chadebech P., Cytokine 2020

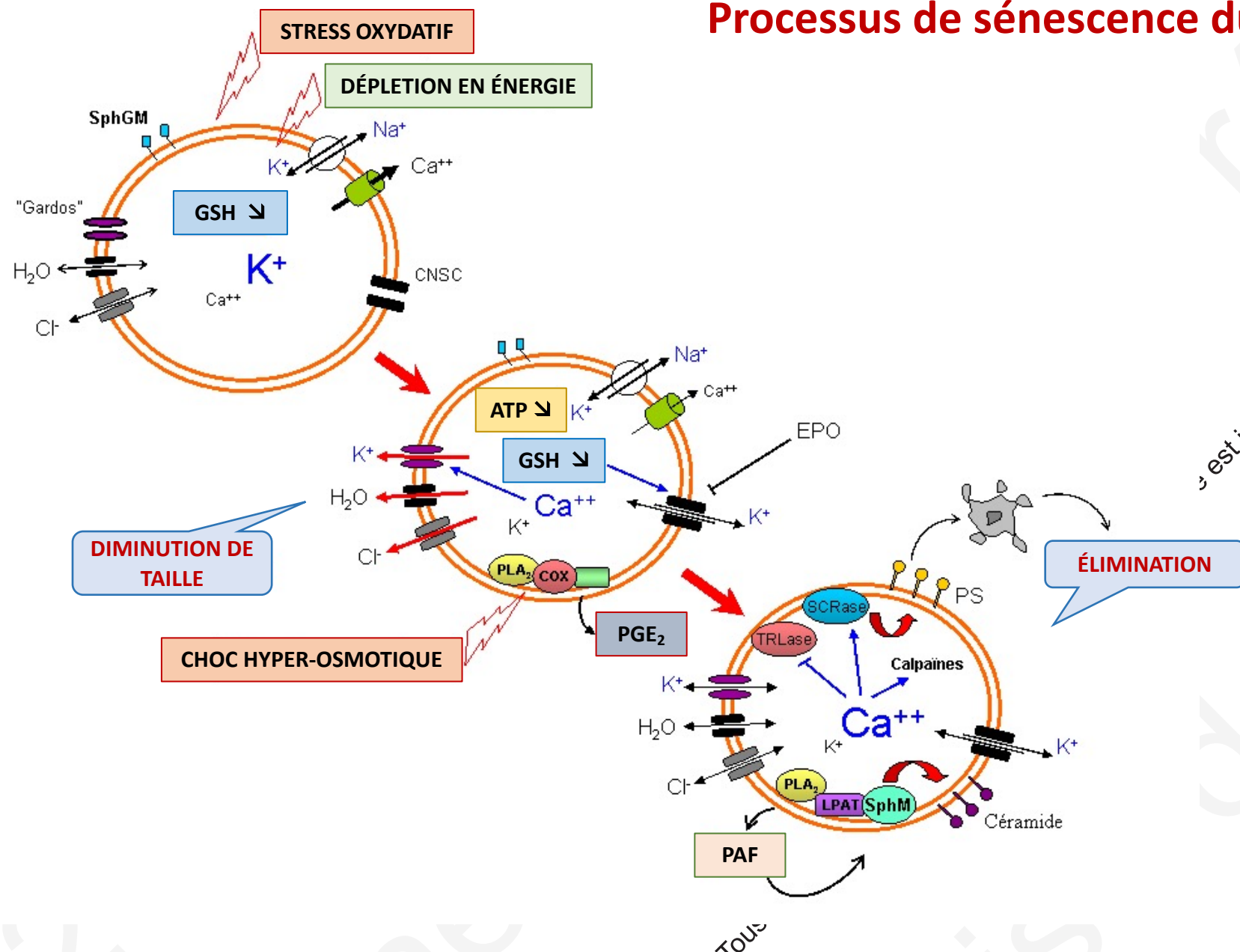
Hémolyses sans anticorps détectable

Chadebech P., Transfusion 2009

Jusqu'à 30 % des cas

Sénescence accélérée ?

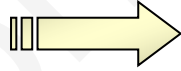
Processus de sénescence du GR



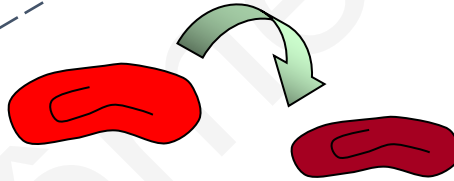
2021 © Société Française de Transfusion Sanguine. Tous droits réservés - Toute reproduction est interdite.



Transfusion



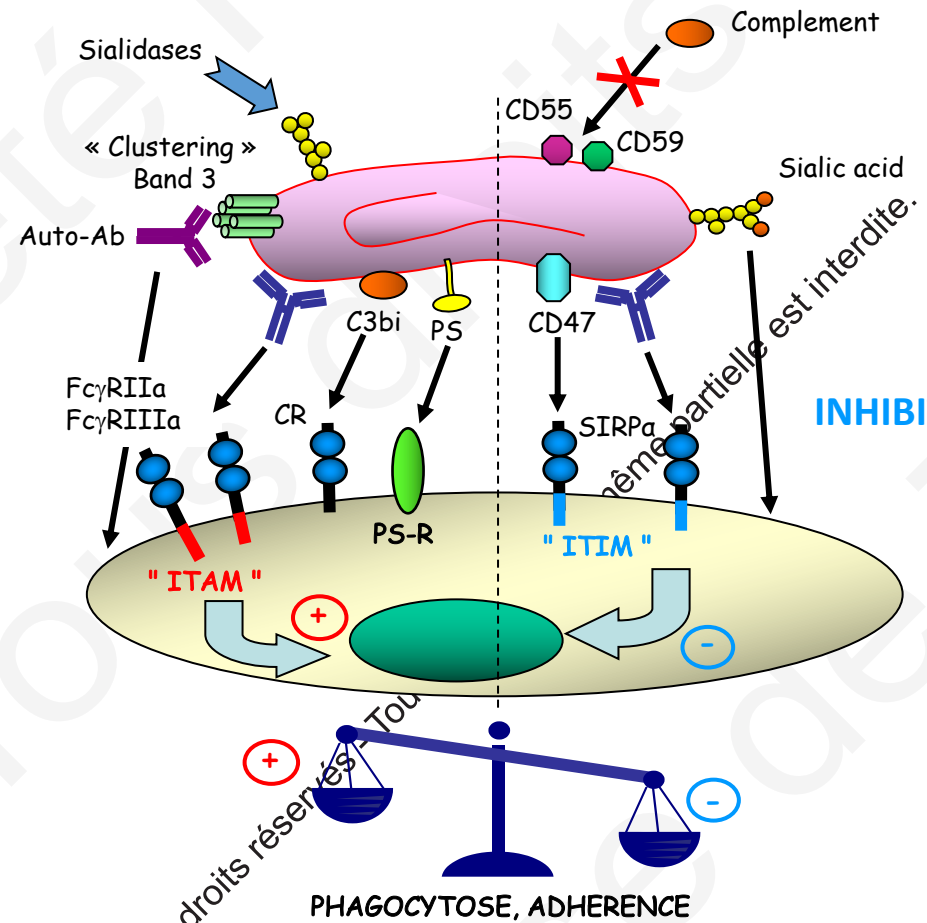
HbA



Processus de sénescence du GR

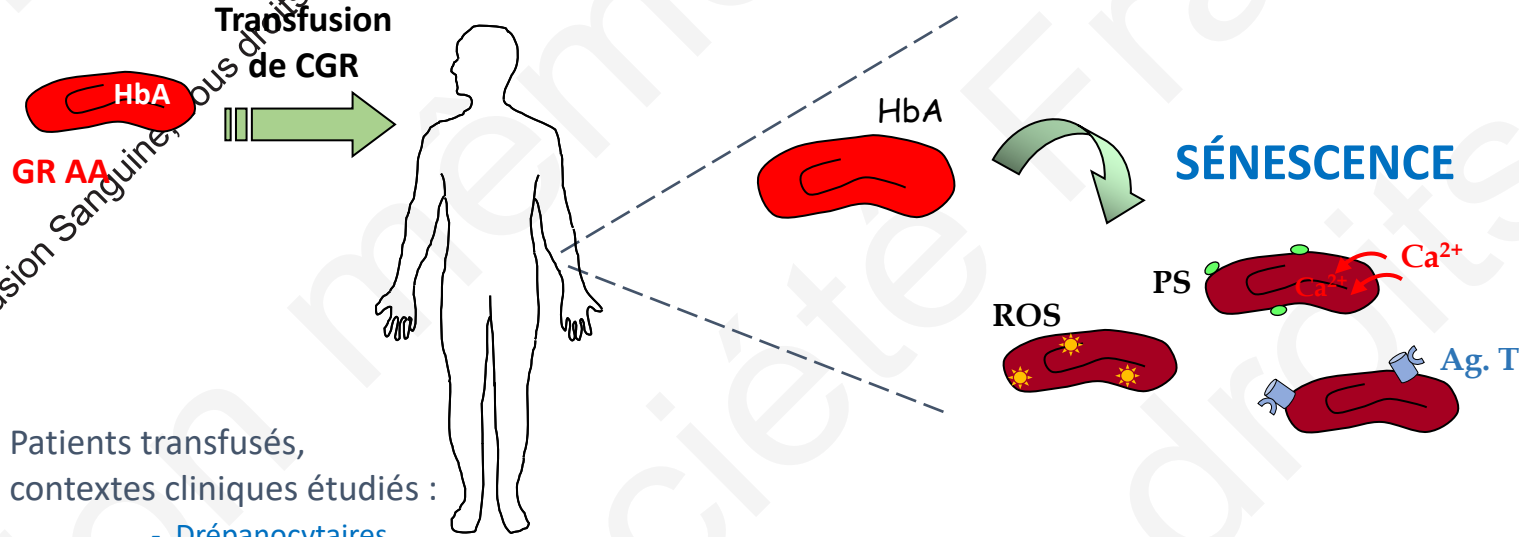
ACTIVATION

INHIBITION



Okazawa et al., 2005
Lang & Qadri, 2012
Lang et al. 2006

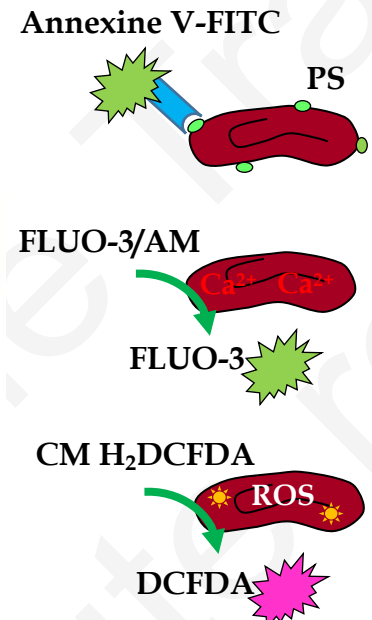
Détection du mécanisme de sénescence



Patients transfusés,
contextes cliniques étudiés :

- Drépanocytaires
- Sepsis sévère
- SHU

FACS Canto II, BD



Chadebech P., *Transfusion* 2009*, 2016, 2017
 Burin des Roziers N., *Transfusion* 2011°, 2015
 Moh-Klaren J., *Transfusion* 2017
 Roumenina LT., *Am J Hematol* 2020°°
 Domingues-Hamdi E., *Blood Trf* 2021

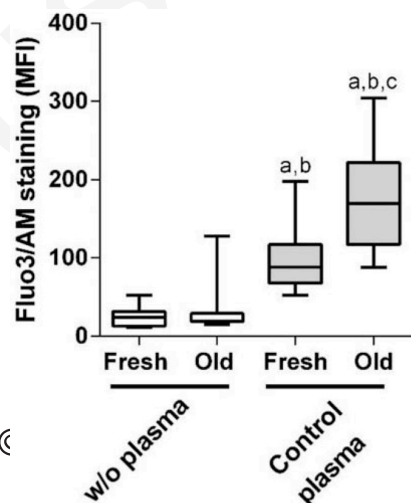
2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, tous droits réservés - Toute reproduction est interdite.

Tous droits réservés

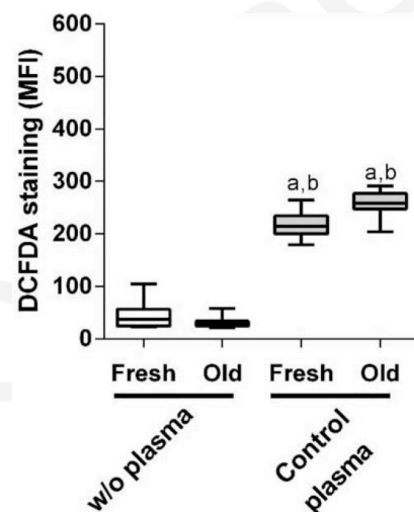
Transfusion partielle est interdite.

Mécanisme de sénescence du GR : contrôles

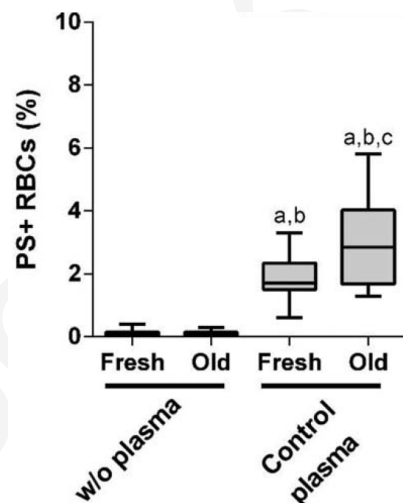
Calcium influx



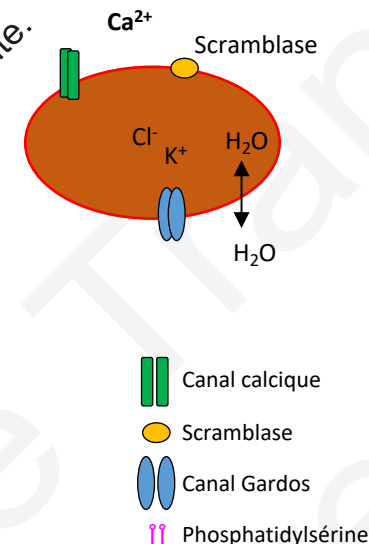
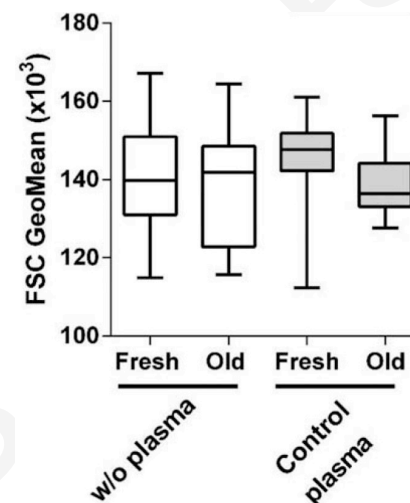
ROS detection



PS-exposure



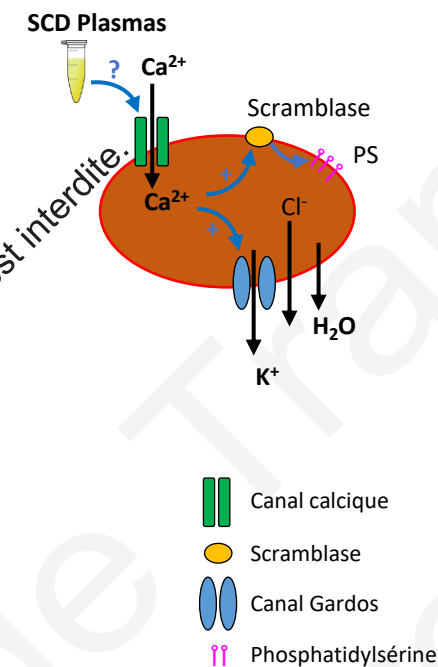
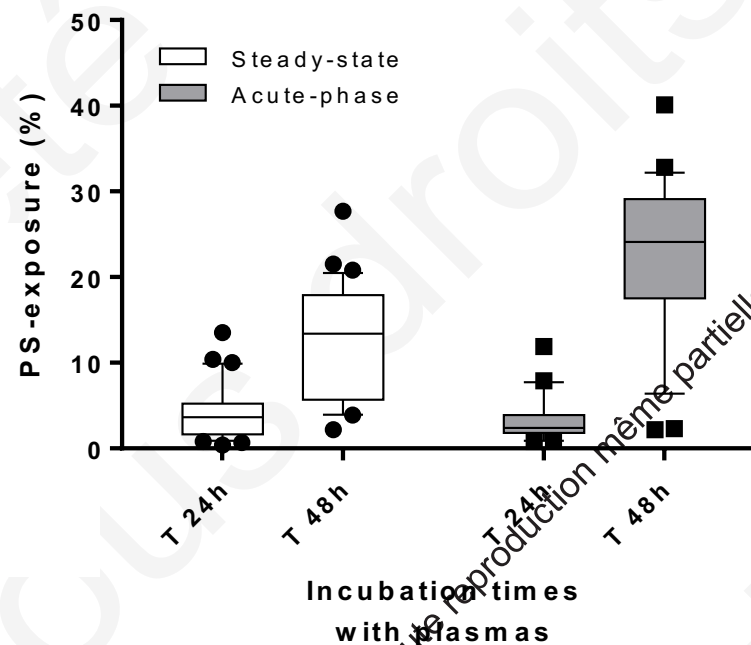
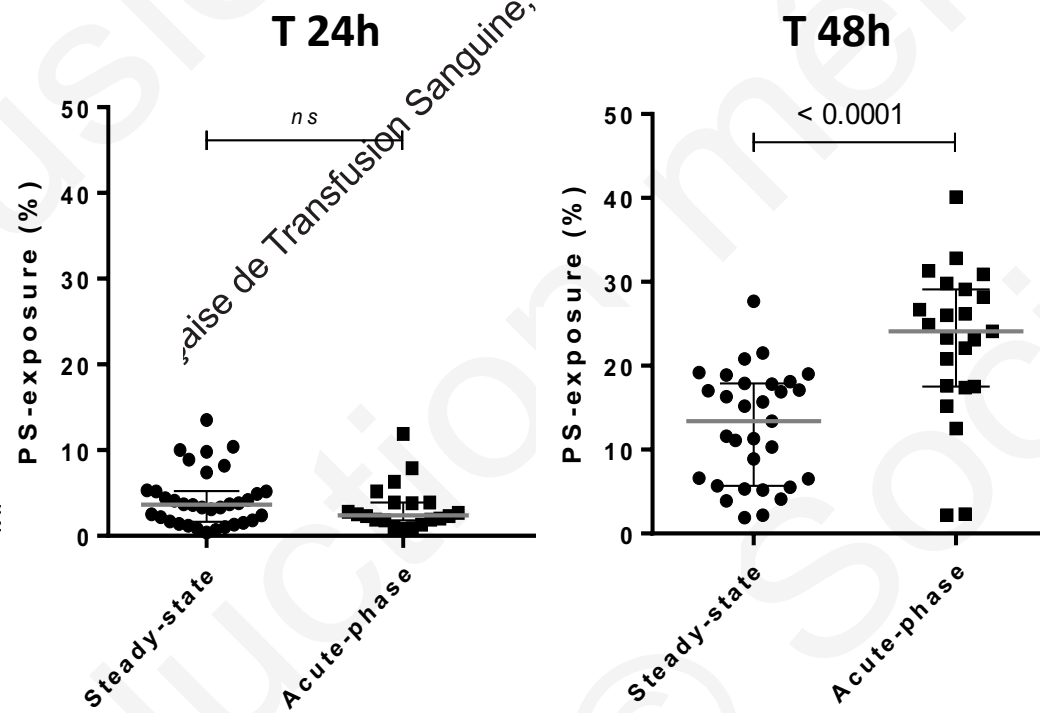
RBC size



2021 ©

Tous droits réservés - Toute reproduction ou utilisation non autorisée sans la permission écrite de l'auteur est formellement interdite.

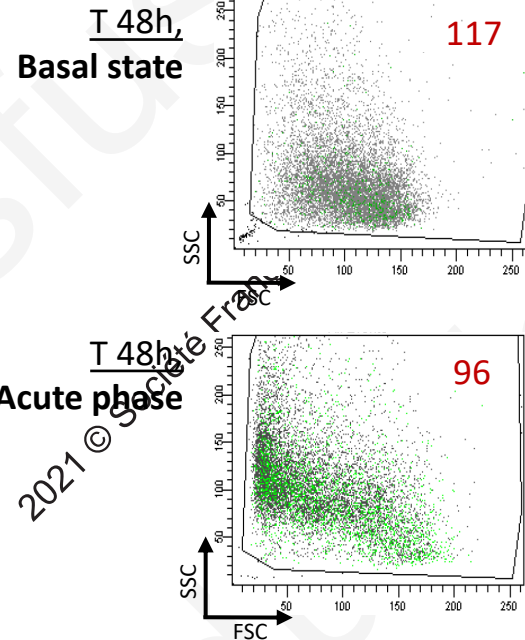
Mécanisme de sénescence du GR : exposition de la PS



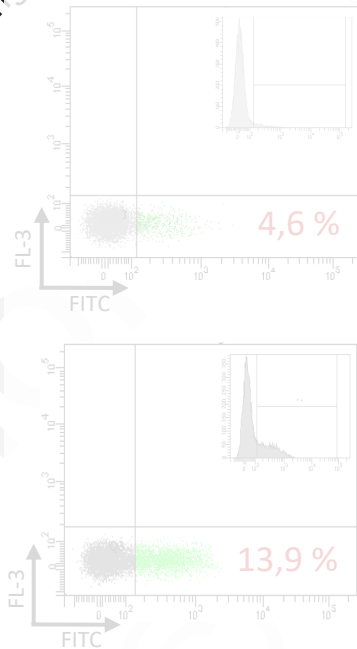
Résultats (1) : Sénescence

- ✓ Cinétique d'apparition des marqueurs durant la sénescence des GR (AA) issus de poches

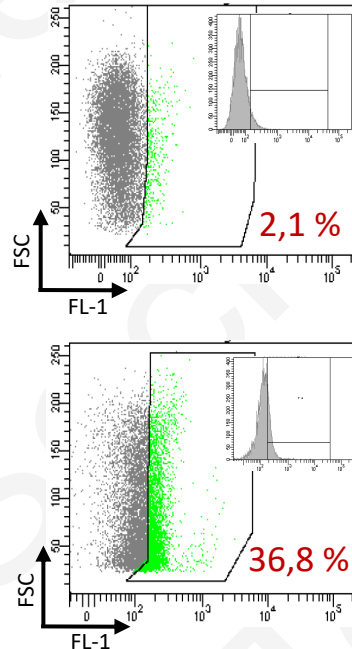
Taille des GR
(FSC GeoMean)



Exposition de PS
(Annexin V FITC)

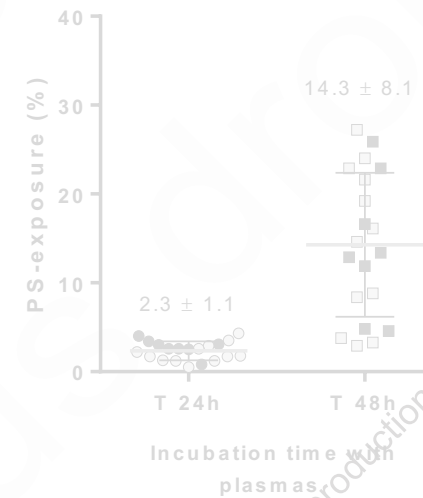


Influx de Ca^{2+}
(Fluo3/AM)

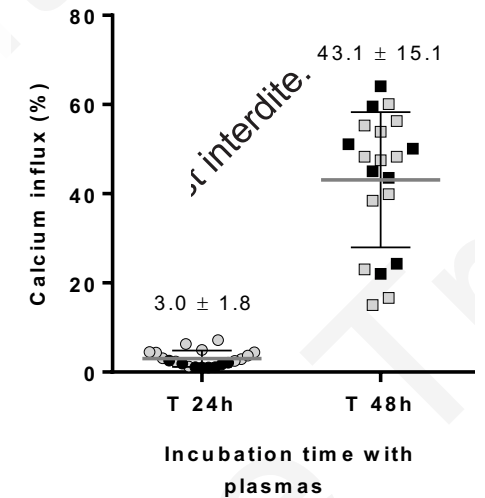


Marqueurs de sénescence ($n=20$)

Exposition de PS (%)



Influx de Ca^{2+} (%)



- Etat basal (stable)
- Etat aigu (algique)



- ⇒ Contrôles négatifs préalables (déjà publiés), non-représentés ici :
- GR co-incubés 24 et 48h à +37°C sans plasmas
 - GR co-incubés 48h face aux plasmas de donneurs sains