Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE-ENVIRONNEMENT

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

Discipline : Bioingénierie

Présentée et soutenue publiquement par

Caroline Gaucher

le 14 décembre 2007

Relation cellules endothéliales/substituts sanguins : Implication des contraintes de cisaillement ou de l'hypoxie, et évaluation de la cytotoxicité d'hémoglobines de nouvelle génération.

DIRECTEUR DE THESE : DR. P. MENU

JURY

Rapporteurs :

A. Gairard	Professeur émérite	ULP-Strasbourg
K. Messmer	Professeur émérite	Université de Munich

Examinateurs :

V. Baudin-Creuza	Chargée de recherche	INSERM Le Kremlin-Bicêtre
P. Labrude	Professeur	UHP-Nancy I
J-F. Stoltz	Professeur	UHP-Nancy I
P. Menu	Maître de conférence	UHP-Nancy I

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet européen EuroBloodSubstitutes du 6ème PCRD.

A Benoît, Mathys, Eliott,…

Remerciements

Mes travaux ont été réalisé au laboratoire de mécanique et ingénierie cellulaire et tissulaire de l'UMR-CNS 7563 de l'Université Henri Poincaré de Nancy. Je tiens à exprimer à Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, Directeur du laboratoire et membre de l'Académie Française de Médecine, ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. La confiance qu'il m'a accordée et ses encouragements m'ont beaucoup aidée à mener à terme le travail. Qu'il soit assuré de mon attachement.

Monsieur **Patrick MENU**, Maître de conférences universitaire à la Faculté de Pharmacie de Nancy, m'a proposé le sujet et a assuré la direction scientifique de cette thèse. Sa grande disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux. Les discussions et les conseils qu'il m'a prodigué m'ont été d'une très grande utilité. Un grand merci pour son humanité et son ouverture d'esprit qui m'ont aussi permis d'avancer dans ma vie professionnelle et personnelle. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Monsieur **Alexis GAIRARD**, Professeur émérite à l'Université de Strasbourg et Monsieur **Konrad Messmer**, Professeur émérite de l'Université de Munich ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Leurs commentaires et leur remarques constituerons sans doute un précieux concours. Je les remercie vivement.

Je suis également très sensible à l'honneur que me fait Madame **Véronique BAUDIN-CREUZA**, Chargée de recherche INSERM et Monsieur **Pierre LABRUDE**, Professeur de l'Université Henri Poincaré de Nancy, en acceptant de juger ma thèse.

Je remercie vivement Monsieur **Patrick LACOLLEY**, Directeur de recherche de l'unité INSERM 684, ainsi que toute son équipe, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et mis à ma disposition tous les équipements nécessaires à la PCR quantitative.

Je tiens à remercier Madame **Marie-Christine BENE**, PU-PH, et Monsieur **Gilbert FAURE**, PU-PH, chefs du service immunologie de la Faculté de Médecine ainsi que toute leur équipe (Christine Prin-Mathieu essentiellement) pour les conseils et leur aide particulièrement efficace notamment en cytométrie en flux.

Je voudrais remercier le Dr **Abdu ALAYASH** pour m'avoir fourni l'Oxyglobin® testée dans cette étude.

Je ne saurais oublier l'ensemble des chercheurs, doctorants et personnel technique du laboratoire pour l'atmosphère amicale qu'ils ont su faire régner et leur soutien efficace.

Un grand merci à tous mes collègues de bureau (Halima, Nicolas, Estelle, Nicolas) pour leur soutien et les rires aux éclats de ces trois dernières années.

Je n'aurais certainement pas pu réaliser ces travaux dans les délais impartis sans le concours du Docteur **Léonardo DI STASIO** et son approvisionnement en Voluven®.

Sommaire

Sommaire

INTRODUCTION 1

LE PROJET EUROBLOODSUBSTITUTES 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 3

I. LE SYSTEME SANGUIN 3

I.1. Les veines 3

I.2. Les artères 4

I.3. Cas particulier : le système ombilical 4

I.4. Composition générale de la paroi vasculaire 5

I.5. L'endothélium 6
I.5.1. Structure 6
I.5.2. Fonctions 6
I.5.3. Contraintes mécaniques et biochimiques 7

II. LE SANG 10

II.1. Les globules rouges 11
II.1.1. La membrane du globule rouge 11
II.1.2. Les enzymes érythrocytaires 12
II.1.3. L'hémoglobine 12
II.1.3.1. Structure 12
II.1.3.2 Fonction 14

II.2. Le transport des gaz 14
II.2.1. Le transport de l'oxygène 14
II.2.2. Transport du CO_2 15
II.2.3. Transport d'autres gaz 15

III. LA TRANSFUSION SANGUINE 16

III.1. Inconvénients de la transfusion sanguine 16
III.1.1. Approvisionnement 16
III.1.2. Incompatibilité 17
III.1.3. Risque infectieux 17
III.1.4. Conservation 18
III.1.5. Coût 18
III.1.6. Perception de la transfusion par la population 18

III.2. Stratégies de substitution à la transfusion sanguine homologue 19

III.2.1. La transfusion autologue 19
III.2.2. Les substituts de restauration de la volémie ou « plasma expanders » 19
III.2.3. Les transporteurs d'oxygène 22
III.2.3.1. Cahier des charges des substituts érythrocytaires 22
III.2.3.2. Historique du développement 23

III.3. Les PerFluoroCarbures (PFC) 23
III.3.1. Structure 23
III.3.2. Propriétés 24

III.4. Les transporteurs à base d'hémoglobine 24
III.4.1. Origine de l'hémoglobine 25
III.4.2. Modifications de l'Hb 26
III.4.2.1. Augmentation de la rétention vasculaire 26
III.4.2.2. Diminution de l'affinité pour l'oxygène 27
III.4.2.3. L'encapsulation 28
III.4.3. Perception du public vis-à-vis des substituts sanguins 28
III.4.4. Produits développés et en cours d'évaluation clinique 28
III.4.5. Interaction des substituts à base d'Hb avec l'endothélium, réactions adverses 29
III.4.5.1. Stress oxydatif engendré par les HBOC 29
III.4.5.2. L'inflammation 33

IV. HYPOXIE CELLULAIRE ET TISSULAIRE 38

IV.1. Définition et causes de l'hypoxie 38

IV.2. Conséquences et adaptations physiologiques de l'hypoxie 40

V. HYPOXIE & METABOLISME CELLULAIRE ENDOTHELIAL VASCULAIRE 40

V.1. Fermentation lactique et glycolyse anaérobie 40

V.2. Mitochondrie et espèces réactives à l'oxygène 42

V.3. Vasomotricité et NO 43

VI. HYPOXIE ET INFLAMMATION 44

VI.1. Les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales 44

VI.2. L'hème oxygénase-1 44

***BUT DE L'ETUDE* 46**

***MATERIELS & METHODES* 47**

I. SOLUTIONS UTILISEES 47

II CHOIX DES CELLULES ET DES SOLUTIONS TESTEES 47

II.1 Choix des cellules 47

II.2. Solutions testées 48
II.2.1. Etudes en conditions dynamiques et/ou études en hypoxie 49
II.2.2. Evaluation de la cytotoxicité de nouvelles hémoglobines 50

III. RECUPERATION DES HUVEC 51

III.1. Isolement des HUVEC 51

III.2. Entretien des cultures 52

IV. LES DIFFERENTS MODES DE CULTURE 53

IV.1. Culture sous contraintes de cisaillement 53
IV.1.1. Présentation du système de flux 53
IV.1.2. Calibration du système de flux 54
IV.1.3. Préparation et ensemencement des lames 55

IV.2. Culture en hypoxie 55

V. METHODES D'INVESTIGATION DES MILIEUX SUITE A LA CULTURE SOUS CISAILLEMENT OU HYPOXIE 56

V.1. Mesure de l'état d'oxydation de l'Hb par spectrophotométrie 56

V.2. Dosage des métabolites dans les milieux 57
V.2.1. Comptage cellulaire et traitement des milieux 57
V.2.2. Mesure de la production d'H_2O_2 57
V.2.3. Mesure de la production de lactate 58
V.2.4. Mesure indirecte de la production de NO 59

V.3. Quantification par HPLC de l'Hb modifiée par oxydation 60
V.3.1. L'Hb modifiée par oxydation 60
V.3.2. Principe de l'HPLC 60

V.4. Résonance paramagnétique électronique (RPE) 61
V.4.1. Principe général 61
V.4.2. Application à l'Hb 62
V.4.3. Méthode 64

VI. METHODES D'ETUDE DES DIFFERENTES REPONSES DES CELLULES 64

VI.1. Réarrangement du cytosquelette sous contraintes de cisaillement 64
VI.1.1. La microscopie confocale 64
VI.1.2. Marquage du cytosquelette et du noyau 65

VI.2. Variation de l'expression de différents gènes 65
VI.2.1. Les ARN totaux 65

VI.2.1.1. Extraction 65
VI.2.1.2. Quantification 66
VI.2.1.3. Contrôle de l'intégrité des ARN par électrophorèse sur gel d'agarose 66
VI.2.2. La Reverse transcription (RT) 67
VI.2.3. La Réaction de Polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) 67

VI.3. Quantification de l'expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine 69
VI.3.1. Principe de la Cytométrie en Flux (CMF) 69
VI.3.2. Normalisation des résultats, Kit de calibration Qifikit 71
VI.3.3. Immunomarquage de cellules pour ICAM-1 et E-sélectine 71

VII. EVALUATION DES NOUVELLES SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE 72

VII.1. Mode opératoire 72

VII.2. Evaluation de la cytotoxycité 73
VII.2.1. Morphologie cellulaire 73
VII.2.2. Mesure de la viabilité cellulaire 73
VII.2.2. Mesure du taux d'apoptose/nécrose *vs* viabilité cellulaire 74

VIII. ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS 76

***RESULTATS & DISCUSSIONS* 77**

PARTIE I : COMPORTEMENT DES CELLULES ENDOTHELIALES CULTIVEES SOUS CONTRAINTES DE CISAILLEMENT EN ABSENCE OU EN PRESENCE D'UN SUBSTITUT SANGUIN 77

PARTIE I-A : VALIDATION DES TECHNIQUES D'INVESTIGATION ET DU SYSTEME DE CULTURE DES CELLULES ENDOTHELIALES SOUS CONTRAINTES DE CISAILLEMENT. 77

I. CONTROLES POSITIFS 78

I.1. Evaluation du taux de transcription par RT-PCR quantitative 78

I.2. Evaluation de l'expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine par CMF 80

II. INFLUENCE DES CONTRAINTES DE CISAILLEMENT SUR LE COMPORTEMENT DES CELLULES ENDOTHELIALES 81

II.1. Modification de la morphologie et du profil d'expression des gènes 81

II.2. Modification de l'expression des protéines membranaires inflammatoires 82

II.3 Production de NO 83

III. DISCUSSION 84

PARTIE I-B : CONTRAINTES DE CISAILLEMENT & INTERACTION CELLULE ENDOTHELIALE/SUBSTITUT SANGUIN A BASE D'HEMOGLOBINE 87

I. STABILITE DE L'HEMOGLOBINE SOUMISE AUX CONTRAINTES DE CISAILLEMENT VIS-A-VIS DE L'OXYDATION 87

I.1. Détermination de l'état d'oxydation de l'hémoglobine ou concentration en metHb 87

I.2. Quantification de l'hème modifiée par oxydation (HPLC) 88

I.3. Détermination de la conformation du fer hémique 89

II. COMPORTEMENT DES CELLULES ENDOTHELIALES SOUMISES AUX CONTRAINTES DE CISAILLEMENT EN PRESENCE D'HBOC 91

II.1. Régulation du tonus vasculaire et de la concentration d'Hb libre 91
II.1.1. Régulation du tonus vasculaire 91
II.1.2. Variation de la transcription de HO-1 93

II.2. Régulation des marqueurs d'inflammation 94

III. DISCUSSION 97

PARTIE II : EVALUATION DE L'INTERACTION CELLULES ENDOTHELIALES/SUBSTITUTS SANGUINS A BASE D'HEMOGLOBINE SOUS HYPOXIE MODEREE/REOXYGENATION 101

I. MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'HYPOXIE CELLULAIRE 101

I.1. Contrôle des paramètres hypoxiques 101

I.2. Observations morphologiques des HUVEC 103

I.3. Viabilité cellulaire 104

I.4 Production des marqueurs de l'hypoxie (H_2O_2, lactate, nitrite) 104
I.4.1. H_2O_2 104
I.4.2. Acide L-lactique ou lactate 105
I.4.3. Nitrite (dosage indirect de NO) 106

I.5. Hypoxie et transcription 108
I.5.1. Hypoxie et induction de l'inflammation 108
I.5.2. Hypoxie et facteurs de vasomotricité/stress oxydatif 109

II. IMPACT DE LA REOXYGENATION PAR DIFFERENTS SUBSTITUTS SANGUINS DE CELLULES ENDOTHELIALES SOUMISES A 4 H D'HYPOXIE MODEREE (5% O_2) 110

II.1. Hypoxie/réoxygénation et stress oxydatif 110
II.1.1. Production de lactate 110

II.1.2 Production d'H_2O_2 111
II.1.3. Autooxydation de l'hémoglobine 112
II.1.4. Transcription de HO-1 112

II.2. Hypoxie/réoxygénation et facteurs de vasomotricité 112
II.2.1. Production de nitrite/nitrate 112
II.2.2. Transcription de la eNOS 113

II.3. Hypoxie/réoxygénation et inflammation 114
II.3.1. Transcription des gènes ICAM-1 et E-sélectine 114
II.3.2. Expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine 115

III. DISCUSSION : REOXYGENATION PAR DIFFERENTS SUBSTITUTS SANGUINS D'HUVEC SOUMISES A 4 H D'HYPOXIE 116

IV. IMPACT DE LA REOXYGENATION PAR DIFFERENTS SUBSTITUTS SANGUINS DES CELLULES ENDOTHELIALES SOUMISES A 24 H D'HYPOXIE MODEREE (5% O_2) 119

IV.1. Hypoxie/réoxygénation et stress oxydatif 119
IV.1.1. Production de lactate 119
IV.1.2. Production d'H_2O_2 119
IV.1.3. Autooxydation de l'hémoglobine 119
IV.1.4. Transcription du gène HO-1 120

IV.2. Hypoxie/réoxygénation et facteurs de vasomotricité 120
IV.2.1. Production de nitrite/nitrate 120
IV.2.2. Transcription du gène de la eNOS 121

IV.3. Hypoxie/réoxygénation et inflammation 122
IV.3.1 Transcription d'ICAM-1 et E-sélectine 122
IV.3.2. Expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine 123

V. DISCUSSION : REOXYGENATION PAR DIFFERENTS SUBSTITUTS SANGUINS D'HUVEC SOUMISES A 24 H D'HYPOXIE 124

VI. CONCLUSION 125

PARTIE III : EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE DE NOUVELLES HEMOGLOBINES 126

I. OBSERVATION DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE 126

II. MESURE DE L'ACTIVITE METABOLIQUE CELLULAIRE 129

III. VIABILITE CELLULAIRE 130

IV. IMPACT DE L'OCTAMERE SUR LA TRANSCRIPTION DE GENES IMPLIQUES DANS L'INFLAMMATION, LA VASOMOTRICITE ET LE STRESS OXYDATIF **131**

IV.1. Hémoglobine octamérique et inflammation **131**

IV.2. Hémoglobine octamérique et facteurs de vasomotricité **132**

IV.3. Hémoglobine octamérique et stress oxydatif **133**
IV.3.1. Hémoglobine octamérique et autooxydation 133
IV.3.2. Hémoglobine octamérique et transcription du gène de HO-1 133

V. DISCUSSION **135**

VI.CONCLUSION **136**

DISCUSSION GENERALE **138**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **144**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **146**

ANNEXES **157**

ANNEXE 1 **157**

ANNEXE 2 **158**

ANNEXE 3 **159**

ANNEXE 4 **160**

PUBLICATIONS **161**

Liste des publications & communications orales et affichées

Liste des publications

"Oxygen therapeutics: Current issues and new challenges"
Gaucher C., Boura C., Stoltz J-F., Menu P.
Actas de Bioquimica. 2006, 7: 67-71.

"In vitro impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile"
Gaucher C., Boura C., Stoltz J-F., Menu P.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 2007, 37:99-107.

Review: "Behaviour of endothelial cells face to hypoxia"
Paternotte E., **Gaucher C.**, Labrude P., Stoltz J-F., Menu P.
Bio-med. Mater. Eng.-acceptée.

"Oxygen therapeutics: current issues and new challenges".
Menu P., Boura C., **Gaucher C.**, Stoltz J-F.
J. Biomed. Eng. 2005, 22 3:31-32.

Editorial: "How to evaluate blood substitutes for endothelial cell toxicity?"
Gaucher C., Menu P.–soumise à antioxidants and redox signaling.

"Endothelial cells/blood substitutes: Involvement of shear stress in the inflammatory response."
Gaucher C., Prin-Mathieu C., Poitevin G., Stoltz J-F., Menu P.– soumise dans Transfusion.

"Polyelectrolyte Films boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers"

Berthelemy N., Kerdjoudj H., **Gaucher C.**, Schaaf P., Stoltz J.-F., Lacolley P., Voegel J.-C. & Menu P.-soumise à Advanced Materials

Communications orales

Réunions du consortium européen « Euroblood substitutes » présentation des résultats :

"Behavoiur endothelial cells submitted to shear stress"
Gaucher C., Boura C., Omouessi S.T., Menu P.
Appenzell, Switzerland, juin 2005

"Modification of genes expression in endothelial cells submitted to shear stress and environmental variations"
Gaucher C., Boura C., Omouessi S.T., Menu P.
Leiden, Netherlands, juin 2006

"Impact of shear stress on inflammatory proteins expression on endothelial cells"
Gaucher C., Boura C., Omouessi S.T., Menu P.
Budapest, Hungary, janvier 2007

Communications affichées

"Endothelial cells, Blood substitutes: Which kind of interaction"
Gaucher C., Boura C., Toussaint-Hacquard M., Stoltz J-F., Menu P.
3rd international meeting on "medical engineering and therapy, Nancy 2006 (poster et résumé)

"Oxidative end shear stresses on endothelial cells-a potential major cause of vasoconstriction"
Gaucher C., Boura C., Devaux C., Stoltz J-F., Menu P.
First international symposium on "cardiovascular biology", Praha, Czech Republic, 2006 (poster et résumé)

"Screening HBOC infusions in vitro: a novel approach to attempt physiological situation"
Gaucher C., Boura C., Omouessi T., Stoltz J-F., Menu P.
International visions on blood substitutes, Parma, Italy 2006 (poster et résumé)

"Advantage of microdialysis technique coupled to tissue oxygen pressure to evaluate in vivo effects of hemoglobin solutions"
Boura C., Omouessi S.T., **Gaucher C.**, Menu P.
International visions on blood substitutes, Parma, Italy 2006 (poster et résumé)

"Behaviour of endothelial cells face to hypoxia"
Paternotte E., **Gaucher C.**, Stoltz J-F., Menu P.
4ème séminaire en ,"Bioingénierie et biothérapies", Nancy, 2007.

Polyelectrolyte Films boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers
Berthelemy N., Kerdjoudj H., **Gaucher C.**, Schaaf P., Stoltz J.F., Lacolley P., Voegel J.C & Menu P.
Chemical and physical nanobiology for medicine. Japan society for the promotion of science, Strasbourg, 2007.

Abréviations

Liste des Abréviations

°C : Degré Celsius
2-3 DPG : 2-3 diphosphoglycérate
A. niger : Aspergilus niger
Ac II^R : Anticorps secondaire
Ac I^R : Anticorps primaire
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Ag : Antigène
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BSA : Albumine de sérum bovin
CE : Cellules endothéliales
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
Cl^- : Ion chlorure
CMF : Cytométrie en Flux
CML : Cellules musculaires lisses
CO : Monoxyde de carbone
CO_2 : Dioxyde de carbone
Ct : Cycle seuil
DAG : Diacylglycérol
DEPC : diethylpyrocarbonate
e^- : Electron
E. coli : Escherichia coli
EBS : Euro Blood Substitutes
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique
EFS : Etablissement du Sang Français
eNOS : Forme constitutive de la NO Synthase
ENSIC : Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
ERO : Espèces Réactives à l'Oxygène
ESL-1 : E-sélectine ligand-1
FDA : Food and Drug Administration
Fe^{2+} : Ion fer ferreux
Fe^{3+}: Ion ferrique
Fe^{4+}: Ion ferryl
Fig. : Figure
FSC : Forward Scatter ou lumière diffractée
GPT : Glutamate-pyruvate-transaminase
GR : Globule rouge
H^+ : Proton
H_2O : Eau
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
Hb : Hémoglobine
Hb-Dex-BTC : Hémoglobine dextran-benzène-tétracarboxylate
HBOC : Haemoglobin based oxygen carrier
HBSS : Hank's Balanced Salts Solution
HEA : Hydroxyéthylamidon
HLA : Human Leukocyte antigen
HO : Hème oxygénase
HOCl : Acide hypochlorique
HPLC : Chromatographie liquide sous haute pression
HRP : Horseradish peroxidase
HUVEC : Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine
ICAM : Intercellular adhesion molecule
IFNγ : Interferon γ
Ig : Immunoglobuline
IHP : Inositol hexaphosphate
Il : Interleukine
IMT : 2-iminothiolane
iNOS : Forme inductible de la NO Synthase
IP : Iodure de propidium
IP3 : Inositol-3-phosphate
K : Kelvin
K^+ : Ion potassium
$K_3(FeCN_6)$: Ferricyanate de Potassium
KCN : Cyanate de Potassium
kDa : Kilo Dalton
KOH : Hydroxyde de Potassium
LDH : Lactate déshydrogénase
L-LDH : L-lactate déshydrogénase
LPC : Lysophosphatidylcholine
LPS : Lipopolysacharride
MadCAM-1 : mucosal addressin
MAL-PEG : Maléimide Polyéthylène Glycol
MetHb : Methémoglobine
mmHg : Millimètre de Mercure
Mn SOD : Manganèse superoxyde dismutase
MP : Membrane plasmique
N_2 : Azote
NaCl : Chlorure de Sodium
NAD^+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

$NaHCO_3$: Carbonate de Sodium
NAT : Nucleic acid testing
NEM : N-éthyl maléimide
NER: Niveau d'expression relatif
NFκB : Nuclear factor-κB
nNOS : Forme neuronale de la NO Synthase
NO : Monoxyde d'azote
NO_2^- : Nitrite
NO^{3-} : Ion nitrate
NOS : NO synthases
NPA : N-Propionyl maléimide
O_2 : Oxygène
$O_2^{\bullet-}$: Radical superoxyde
OxHm : Hb modifiée par oxydation
P_2 : Passage 2
P_{50} : Pression de demi-saturation
Pa : Pascal
PAF : Paraformaldéhyde
Pb : Paire de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCO_2 : Pression partielle en CO_2
PCR : Réaction de Polymérisation en chaîne
PECAM-1 : Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PEG : Polyéthylène glycol
PEG-Hb : Hémoglobine pégylée
PFC : perfluorocarbure
pH : Potentiel Hydrogène
PIC : Pression intracrânienne
PM : Poids moléculaire
PMm : Poids moléculaire moyen
PMT : Photomultiplicateur
PO_2 : Pression partielle en O_2
PS : Phosphatidylsérine
PSGL-1 : P-sélectine glycoproteine ligand-1
qPCR : Réaction de Polymérisation en chaîne quantitative
Qsp : Quantité suffisante pour
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPE : Résonance paramagnétique électronique
RPMI 1640 : Roswell Park Memorial Institute
S. cerevisiae : Saccharomyces cerevisiae
SNP : Single nucleotide polymorphisme
SSC : Side Scatter ou lumière réfractée et réfléchie
SSH : Solutés de sérum salé hypertoniques
SSRE : Shear Stress Response Element
TA : Température ambiante
TFA : Acide trifluoroacétique
TGFβ : Transforming growth factor-β
TNFα : Tumor necrosis factor α
UV : Ultra-violet
VCAM : Vascular cell adhesion molecule
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
Vs : Versus
VST : Volume de sang total

Table des illustrations

Table des illustrations

Liste des figures :

Fig. 1 : Schéma de la paroi vasculaire et de ses différentes tuniques. 5

Fig. 2 : Schéma modélisant la contrainte de cisaillement (tangentiellement à la surface endothéliale), la pression hydrostatique (perpendiculairement à l'endothélium) et l'étirement cyclique exercés par le flux sanguin sur l'endothélium. Modifié de Chien 2006. 8

Fig. 3 : Réponses, en fonction du temps, de cellules endothéliales soumises à une contrainte de cisaillement. 9

Fig. 4 : Modélisation 3D de la structure quaternaire de l'hémoglobine A humaine. 13

Fig. 5 : Représentation schématique d'un hème. 13

Fig. 6 : Courbe de Barcroft de dissociation de l'hémoglobine. 15

Fig. 7 : Différents types de substituts érythrocytaires envisagés pour la transfusion. 22

Fig. 8 : Formules chimiques de perfluorocarbures. 24

Fig. 9 : Schéma de l'hémoglobine octamérique. 27

Fig. 10 : Dégradation de l'hème libre en biliverdine et CO par l'hème oxygénase-1. 30

Fig. 11 : Influence des HBOC sur la quantité de NO libre et sur l'état de vasoconstriction. 32

Fig. 12 : Réactions possibles entre l'Hb et NO. 33

Fig. 13 : Représentation schématique des différentes étapes de la transmigration des polynucléaires à travers l'endothélium. 34

Fig. 14 : Localisation des différents types d'hypoxie au niveau physiologique 39

Fig. 15 : Mécanisme de production d'ATP. 41

Fig. 16 : Chaîne respiratoire présente dans la membrane de la mitochondrie. 42

Fig. 17 : Schéma du système de culture sous contraintes de cisaillement. 54

Fig. 18 : Courbes de calibration de la pompe péristaltique en présence des différentes solutions étudiées. 55

Fig. 19 : Spectres des différents standards d'état d'oxydation de l'Hb. 56

Fig. 20 : Principe du dosage d'H_2O_2. 58

Fig. 21 : Principe de dosage du lactate. 59

Fig. 22 : Principe du dosage des nitrites par le réactif de Griess. 59

Fig. 23 : Comparaison de la structure de l'Hb (A) et de l'OxHm (B). 60

Fig. 24 : Spectres RPE de trois types d'hème ferrique en *high* spin. Hstetr. 63

Fig. 25 : Signaux RPE de trois types d'hème ferrique en *low* spin coordinés à un OH. 63

Fig. 26 : Trois types de signaux RPE générés par les espèces *low* spin His-hémichrome de l'Hb. 64

Fig. 27 : Révélation de la présence et de l'intégrité d'ARN totaux. 66

Fig. 28 : Cytogramme d'intensité de fluorescence des billes de calibration du Qifikit (Dako, France) en fonction du nombre d'événements. 71

Fig. 29 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes inflammatoires ICAM-1 et E-sélectine suite à la stimulation des cellules endothéliales par du TNF-α. 78

Fig. 30 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS suite à la stimulation des cellules endothéliales par la LPC. 79

Fig. 31 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 suite à la stimulation des cellules endothéliales par de l'hémine. 80

Fig. 32 : Nombre de site d'expression des récepteurs membranaires ICAM-1 et E-sélectine avant et après stimulation au TNF-α. 80

Fig. 33 : Nombre de site d'expression des récepteurs membranaires ICAM-1 et E-sélectine en condition statique et sous contraintes de cisaillement. 82

Fig. 34 : Production de nitrite dans le milieu de culture pour 10^6 HUVEC cultivées 6 h en condition statique ou dynamique (1 Pa). 83

Fig. 35 : Chromatogramme à 400 nm obtenu par HPLC d'un échantillon d'Hb-Dex-BTC après incubation 6 h, en condition statique, au contact d'HUVEC. 88

Fig. 36 : Evolution du pourcentage d'hémoglobine modifiée par oxydation (OxHm) en conditions statique ou dynamique. 89

Fig. 37 : Production de nitrite pour 10^6 HUVEC cultivées 6 h en condition statique ou dynamique (1 Pa) en présence de milieu ou de substitut sanguin. 92

Fig. 38 : Production de nitrate pour 10^6 HUVEC cultivées 6 h en condition statique ou dynamique (1 Pa) en présence de milieu ou de substitut sanguin. 92

Fig. 39 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS après culture des cellules endothéliales en conditions statique pendant 6 h ou dynamique (1 Pa, 6 h) en présence de différents substituts sanguins. 93

Fig. 40 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 après culture des cellules endothéliales en conditions statique pendant 6 h ou dynamique (1 Pa, 6 h) en présence de différents substituts sanguins. 94

Fig. 41 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène d'ICAM-1 (A) et E-sélectine (B) après culture des cellules endothéliales en condition statique ou dynamique 6 h à 1 Pa. 95

Fig. 42 : Nombre de site d'expression des récepteurs membranaires ICAM-1 et E-sélectine en condition statique et sous contraintes de cisaillement. 96

Fig. 43 : Evolution de la PO_2 du milieu mesurée à l'aide d'une électrode de Clark. 102

Fig. 44 : Evolution du pH de 0 à 72 h d'hypoxie. 102

Fig. 45 : Observation au microscope inversé à contraste de phase d'HUVEC cultivées en hypoxie (5% d'O_2). 103

Fig. 46 : Activité métabolique mitochondriale des HUVEC mesurée par un test MTT, après différentes périodes d'hypoxie (5% d'O_2). 104

Fig.47 : Production d'H_2O_2 par des HUVEC soumises à différentes durées d'une hypoxie (5% O_2) suivies d'une heure de réoxygénation. 105

Fig.48 : Production d'acide L-lactique par des HUVEC soumises à différentes périodes d'hypoxie (5% d'O_2) suivies d'une heure de réoxygénation. 106

Fig.49 : Production de nitrite par des HUVEC soumises à différentes durées d'hypoxie (5% d'O_2). 106

Fig.50 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes d'ICAM-1 et de la E-sélectine après culture des cellules endothéliales sous hypoxie (5%O_2) pendant différentes durées. 108

Fig.51 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS après culture des cellules endothéliales sous hypoxie (5%O_2) pendant différentes durées. 109

Fig.52 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 après culture des cellules endothéliales sous hypoxie (5%O_2) pendant différentes durées. 109

Fig.53 : Production de lactate par des HUVEC placées 4 h en hypoxie (5%O_2) et réoxygénées 1 h avec différents substituts sanguins. 111

Fig.54 : Production d'H_2O_2 par des HUVEC soumises à 4 h hypoxie (5% O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 111

Fig.55 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 après culture de cellules endothéliales pendant 4 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 112

Fig.56 : Production de nitrite pour 10^6 HUVEC cultivées 4 h en hypoxie et réoxygénées avec différents substituts sanguins. 113

Fig.57 : Production réelle de nitrate pour 10^6 HUVEC cultivées 4 h en hypoxie et réoxygénées avec différents substituts sanguins. 113

Fig.58 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS après culture des cellules endothéliales pendant 4 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 114

Fig.59 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène d'ICAM-1 après culture des cellules endothéliales pendant 4 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 114

Fig.60 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la E-sélectine après culture des cellules endothéliales pendant 4 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 115

Fig.61 : Expression membranaire d'ICAM-1 après une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins de cellules endothéliales cultivées 4 h sous hypoxie (5%O_2). 115

Fig. 62 : Expression membranaire de la E-sélectine après une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins de cellules endothéliales cultivées 4 h sous hypoxie (5%O_2). 116

Fig. 63 : Production d'H_2O_2 par des HUVEC soumises à 24 h hypoxie (5% O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 119

Fig. 64 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 après culture des cellules endothéliales pendant 24 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 120

Fig. 65 : Production de nitrite pour 10^6 HUVEC cultivées 24 h en hypoxie et réoxygénées avec différents substituts sanguins. 120

Fig. 66 : Production de nitrate pour 10^6 HUVEC cultivées 24 h en hypoxie et réoxygénées avec différents substituts sanguins. 121

Fig.67 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS après culture des cellules endothéliales pendant 24 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 121

Fig. 68 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène d'ICAM-1 après culture des cellules endothéliales pendant 24 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 122

Fig. 69 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la E-sélectine après culture des cellules endothéliales pendant 24 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. 122

Fig. 70 : Expression membranaire d'ICAM-1 après une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins de cellules endothéliales cultivées 4 h sous hypoxie (5%O_2). 123

Fig. 71 : Expression membranaire de la E-sélectine après une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins de cellules endothéliales cultivées 4 h sous hypoxie (5%O_2). 123

Fig. 72 : Observations par microscopie inversée d'HUVEC incubées 16 h à 37°C, 5% CO_2 avec différents substituts sanguins. 128

Fig. 73 : Observations par microscopie inversée d'HUVEC incubées 16 h à 37°C, 5% CO_2 avec la solution de PEG-Hb S1 purifiée (B), PEG-Hb S2 (C), PEG-Hb S3 129

Fig. 74 : Mesure de la viabilité cellulaire par le test Alamar Blue^{TM} (AbD serotec, France). Les HUVEC ont été incubées 16 h en présence de substituts sanguins. 129

Fig. 75 : Mesure de la viabilité cellulaire d'HUVEC incubées 16 h (à 37°C, 5% CO_2) en présence de différents substituts sanguins. 130

Fig. 76 : Niveau d'expression relatif des ARNm d'ICAM-1 pour des HUVEC incubées 16 h (37°C sous 5% de CO_2) avec différents substituts sanguins. 131

Fig. 77 : Niveau d'expression relatif des ARNm de la E-sélectine pour des HUVEC incubées 16 h (37°C sous 5% de CO_2) avec différents substituts sanguins. 132

Fig. 78 : Niveau d'expression relatif des ARNm de la eNOS pour des HUVEC incubées 16 h (37°C sous 5% de CO_2) avec différents substituts sanguins. 133

Fig. 79 : Niveau d'expression relatif des ARNm d'HO-1 pour des HUVEC incubées 16 h (37°C sous 5% de CO_2) avec différents substituts sanguins. 135

Liste des tableaux :

Tableau I : Risques de transmission du VIH, de l'hépatite B et C et de bactéries lors de transfusion en France et aux Etats-Unis. 17

Tableau II : Descriptif de substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine produits à l'heure actuelle. 29

Tableau III : Présentation des caractéristiques des 3 types de sélectines. 35

Tableau IV : Présentation des caractéristiques de différentes protéines de la superfamille de Ig. 37

Tableau V : Présentation des différents types d'hypoxie. 39

Tableau VI : Caractéristiques physicochimiques des différentes Hb testées. (N.D. : non déterminé) 48

Tableau VII : Viscosité des milieux utilisés mesurée à 37°C. 54

Tableau VIII : Pourcentage de metHb présent dans les solutions d'Oxyglobin® et d'Hb-Dex-BTC incubées avec des cellules endothéliales cultivées 6 h en conditions statique ou sous contraintes de cisaillement à 1 Pa. 88

Tableau IX : Résultats de RPE. 90

Tableau X : Pourcentage de metHb présente dans chaque échantillon de substitut sanguin avant et après réoxygénation d'HUVEC placées préalablement 4 h en hypoxie. 112

Tableau XI : Pourcentage de metHb présent dans chaque échantillon de substitut sanguin avant et après réoxygénation d'HUVEC placées préalablement en hypoxie 24 h. 119

Tableau XII : Concentrations en metHb dans les différentes solutions testées avant et après incubation 16 h à 37°C, 5% CO_2 au contact d'HUVEC. 134

Introduction

Le projet EuroBloodSubstitutes :

Le projet EuroBlood Subsitutes (EBS) coordonné par Kenneth C. Lowe est un multi-centre de compétences composé d'équipe académique et industrielle. En 2004, ce consortium a initié un projet de trois ans de recherche intitulé « génomiques et substituts sanguins pour le 21ème siècle en Europe ». Ce consortium a été financé par l'union européenne au travers du 6ème PCRD et est composé de 13 équipes européennes, dont une seule en France (laboratoire d'hématologie, faculté de pharmacie, Nancy). Le but du projet EBS est une recherche intensive menant au développement d'une plateforme technologique pour produire un substitut sanguin à base d'hémoglobine génétiquement modifiée et produite par des microorganismes comme les bactéries et les champignons.

Le projet EBS associe des équipes aux compétences complémentaires allant du *design* de l'hémoglobine à son évaluation sur l'animal. L'EBS utilise les microorganismes comme usine de production d'hémoglobine, ce qui permettrait de limiter les risques de contamination liés à la transfusion sanguine (VIH, hépatite..), de parer les problèmes de disponibilité et finalement, rendrait l'Europe indépendante face à ses besoins en sang.

Composition du consortium EBS :

- Université de Nottingham, UK

Dr K.C.Lowe, Pr D.Archer

- Université d'Essex, UK

Pr C.Cooper, Pr M.Wilson

- Université technique du Danemark

Pr J.Nielsen

- Université de Nancy, France

Dr P.Menu

- Université Semmelweis, Hongrie

Pr A.Eke

- Université de Rome, Italie

Pr A.Bellelli

- Université de Parme, Italie

Pr A.Mozzarelli

- Université de Milan, Italie

Pr M.Perrella, Pr M.Samaja

- Université de Lund, Suède

Pr L.Bülow

- LCC Engineering & Trading GmbH, Suisse

Dr W.Glettig

- Alligator Bioscience, AB, Suède

Dr M.Andersonn

- Service national écossais de transfusion du sang, UK

Dr C.Prowse

- Sanquin bloodbank, Pays-Bas

Pr A.Brand

Toutes ces équipes se sont rencontrées régulièrement pour faire le point sur les avancées de chacun, discuter des résultats et échanger sur les directions à donner au projet. Ces réunions nous ont donné l'opportunité de présenter nos résultats et d'échanger nos points de vue sur leur(s) interprétation(s), et de suivre l'évolution du travail des autres équipes.

Au sein de ce projet, notre travail a consisté en l'élaboration de systèmes d'étude *in vitro* et *in vivo* des substituts sanguins.

Introduction Bibliographique

I. Le système sanguin :

Le sang qui transporte l'oxygène (O_2) et les nutriments nécessaires à la vie de toutes les cellules du corps, circule entre le cœur, les poumons et les organes par un réseau très dense d'artères et de veines. La caractéristique commune de ces deux réseaux est la présence d'une couche de cellules endothéliales à l'intérieur des deux types de vaisseaux ; cependant la structure des veines et des artères est très différente.

I.1. Les veines :

Les veines ramènent au cœur le sang périphérique, appauvri en oxygène et enrichi en dioxyde de carbone. Elles présentent quelques particularités qui les différencient des artères : outre le fait qu'elles soient supérieures en nombre, leurs parois sont moins épaisses et leurs possibilités de dilatation sont plus importantes, d'où une capacité volumique plus grande du réseau veineux. Les veines possèdent des valvules qui jouent un rôle de clapets antireflux, surtout au niveau des membres inférieurs.

Au fur et à mesure que l'on s'éloigne du lit capillaire, la structure microscopique de la paroi veineuse évolue. Il en résulte une autre classification des veines, plus classique que la précédente, fondée cette fois sur la nature même de la paroi. Les veinules post-capillaires, d'environ 2 µm de diamètre, ont une couche endothéliale qui repose sur une fine couche de fibres collagènes orientées longitudinalement avec de rares fibroblastes. Dans les veinules, d'environ 5 µm de diamètre, des cellules musculaires lisses apparaissent entre l'endothélium et le tissu conjonctif. Quand leur diamètre atteint 20 µm, les cellules musculaires lisses commencent à former un tapis continu et l'adventice devient plus épaisse avec des fibres élastiques éparpillées en plus des fibres de collagène orientées axialement. Pour de plus gros calibres, les trois tuniques s'individualisent pour former une intima, une média et une adventice. Dans les petites veines (de 0,5 à 1 mm de diamètre), le muscle lisse devient multicouche, chaque couche étant séparée par une nappe de collagène. La structure pariétale des veines est alors comparable à celle des artères mais, dans les veines, la média est beaucoup plus mince et l'adventice, composée principalement de fibres de collagène, constitue la majeure partie de la paroi.

Les parois d'une veine d'un calibre supérieur à 1 mm sont alimentées par un réseau de vaso-vasora et de nerfs.

I.2. Les artères :

Les artères distribuent un sang à haute pression éjecté des ventricules cardiaques vers les différents tissus du corps. Les artères doivent résister à de grandes variations de pression engendrées par l'activité cardiaque. Pour y parvenir, les fibres musculaires lisses qui les entourent sont capables de se contracter (vasoconstriction) ou de se relâcher (vasodilatation) en fonction des pressions exercées et des signaux nerveux et hormonaux reçus.

Les artères pulmonaires sont issues du tronc pulmonaire, lui-même en continuité du ventricule droit du cœur. Elles conduisent un sang pauvre en oxygène vers la microcirculation pulmonaire pour l'oxygéner lors de son passage autour des alvéoles pulmonaires.
Les artères systémiques sont celles qui apportent un sang riche en oxygène (et en nutriments) vers les cellules pour leur permettre d'assurer leur survie.

I.3. Cas particulier : le système ombilical

Le système sanguin du cordon ombilical est constitué de deux artères et d'une veine. Il relie le placenta à l'embryon, et présente une grande particularité quant à l'attribution du rôle des vaisseaux.

Les veines ombilicales : les veines ombilicales transportent le sang riche en nutriments et en oxygène des villosités placentaires vers l'embryon en passant par le cordon ombilical. Normalement, il n'existe qu'une veine dans le cordon ombilical.

Les artères ombilicales : les artères ombilicales véhiculent du sang appauvri en oxygène et chargé en dioxyde de carbone. Elles cheminent dans le cordon ombilical avec la veine ombilicale. Elles naissent des artères iliaques communes et se dirigent vers le placenta, pour y permettre des échanges gazeux et métaboliques.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux cellules endothéliales (CE) de veine ombilicale, pour leur grande disponibilité et parce qu'elles forment une primoculture qui nous permet d'être au plus proche des conditions cliniques. De plus, contrairement aux cellules endothéliales d'artères ombilicales, elles sont perpétuellement en contact avec un sang oxygéné.

I.4. Composition générale de la paroi vasculaire :

La paroi vasculaire est composée de trois couches (Fig. 1), appelées tuniques, disposées de façon concentrique : l'adventice, la média et l'intima.

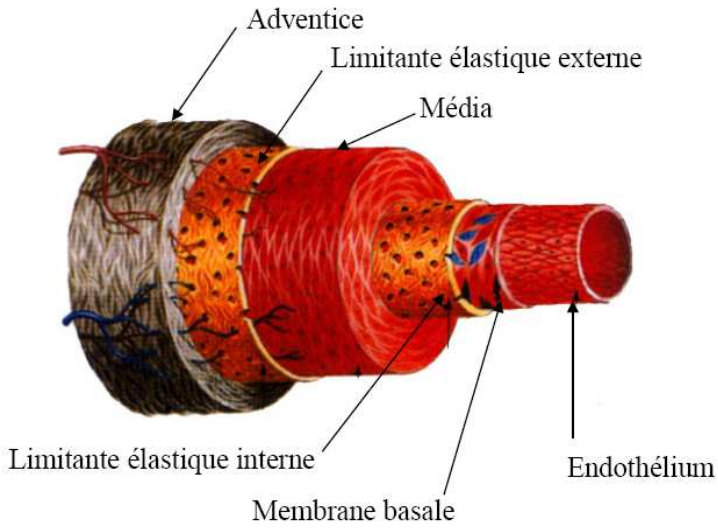


Fig. 1 : Schéma de la paroi vasculaire et de ses différentes tuniques.

L'épaisseur des tuniques et la proportion relative des constituants composant chaque tunique varient selon le type de vaisseau considéré (veine, artère) et sa situation (distance) par rapport au cœur.

L'adventice : l'adventice est essentiellement composée de collagène entrelacé de manière lâche et parcourue de fibres nerveuses, de petits vaisseaux sanguins appelés vasa vasorum, de fibres d'élastine et de fibroblastes. Cette tunique, la plus externe, assure la protection, l'innervation et la nutrition des tissus externes des gros vaisseaux. L'adventice constitue une interface avec les tissus avoisinants.

La média : il s'agit de la couche moyenne. Elle est riche en cellules musculaires lisses (formant un fuseau de 50 à 80 µm) et est enclavée dans un complexe extracellulaire de fibres d'élastine et de collagène.

Les cellules musculaires lisses constituent la majorité des cellules de la paroi vasculaire. Elles se contractent en réponse à des signaux physico-chimiques en provenance des systèmes sanguins et sympathique, à leur propre étirement (contraction myogène) ou à des vibrations mécaniques.

L'intima : l'intima, d'épaisseur moyenne, est la tunique la plus interne au contact de la lumière vasculaire. Elle se compose, de la lumière vers la média : d'une couche de cellules endothéliales, d'une membrane basale et d'une couche de cellules sous-endothéliales.

A l'interface «paroi-sang», la couche endothéliale joue un rôle important dans plusieurs fonctions physiologiques. En effet, elle ne constitue pas uniquement une barrière d'étanchéité, mais elle contrôle sélectivement les échanges, l'activation plaquettaire, l'activité contractile du muscle lisse et synthétise, ou active, des facteurs de croissance. Parmi les nombreux facteurs qui modulent l'activité de l'endothélium, on notera l'importance des contraintes mécaniques qui résultent de l'écoulement sanguin.

I.5. L'endothélium :

I.5.1. Structure :

L'endothélium, principal objet de notre étude, est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) pavimenteuses, de 25 à 50 µm de long sur 10 à 15 µm de large, allongées dans le sens du flux sanguin, par déformation de leur cytosquelette et riches en filaments d'actine. Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions cellulaires serrées permettant la formation d'une barrière étanche. Leur membrane plasmique est pourvue de nombreuses molécules d'adhésion, qui sont le siège d'interactions entre l'endothélium et les cellules sanguines. Une des principales caractéristiques des CE, qui permet aussi leur identification en microscopie confocale, est la sécrétion du facteur von Willebrand, nécessaire à la coagulation des plaquettes (Wall *et al*., 1980 ; Groot *et al*., 2007).

Il existe une grande hétérogénéité de CE (taille, forme, emplacement du noyau, …) selon leur emplacement au niveau de l'arbre vasculaire, des vaisseaux dont elles proviennent, i.e. veines ou artères (Aird, 2003). C'est ainsi que, par exemple, le noyau de la plupart des CE aortiques est placé sous l'axe longitudinal de la cellule, alors que dans la majorité des CE de veine cave inférieure, il est placé au dessus (Silkworth *et al*., 1975). De plus, le noyau des CE d'aortes sont orientés parallèlement au flux sanguin et se réalignent si celui-ci change de direction (quand les vaisseaux sont remplacés chirurgicalement) (Flaherty *et al*., 1972).

I.5.2. Fonctions :

Véritable interface entre le sang et les cellules musculaires lisses de la média, l'endothélium occupe une position anatomique stratégique dans la paroi vasculaire. Ces cellules exercent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques fondamentales.

L'endothélium forme une surface d'échange considérable (5000 m^2) qui module l'homéostasie (Pries *et al*., 2006) des vaisseaux en intervenant, notamment, sur la perméabilité (Stehbens, 1965), le tonus vasculaire, le système de coagulation (Stassen *et al*., 2004) et l'angiogénèse (Otrock *et al*., 2007). Les cellules endothéliales saines maintiennent une balance très fine entre :

- Vasoconstriction et vasodilatation. La régulation de la vasotonicité se fait *via* la sécrétion de substances vasoconstrictrices comme l'endothéline, et *via* la sécrétion de substances vasorelaxantes comme le monoxyde d'azote (NO).
- Hémostase et thrombose, c'est-à-dire entre l'anti-coagulation et la pro-coagulation.
- Adhésion et libre circulation des cellules sanguines, c'est-à-dire dans l'équilibre de la réponse immunitaire, par son implication dans la réponse inflammatoire (Sahni, 2007).

De par leur contact avec le sang, les CE sont soumises à 2 types de contraintes : un *stimulus* biomécanique et un *stimulus* biochimique, capables de moduler l'expression de certains gènes de la cellule. On parle alors d'activation de la cellule endothéliale.

Les CE sont perpétuellement soumises à des contraintes mécaniques et biochimiques engendrées par le flux sanguin et les molécules qu'il transporte. Ces contraintes engendrent différentes réponses des CE, différentes selon le type de contrainte, ceci afin de s'adapter aux conditions environnementales.

I.5.3. Contraintes mécaniques et biochimiques :

Les contraintes mécaniques :

Le flux pulsatile du sang génère trois types de forces hémodynamiques (Fig. 2) : la pression hydrostatique générée par le liquide, l'étirement cyclique ou *cyclic stretching* et les contraintes de cisaillement ou *shear stress*.

- L'étirement cyclique (Fig. 2) correspond à une distension de la paroi induite par un gradient de pression transmural. Il est fonction de l'épaisseur du vaisseau, de sa composition et de la capacité de contraction des cellules musculaires lisses. Le principal effet de l'étirement cyclique est l'induction d'un stress oxydatif au niveau des CE.

- La contrainte de cisaillement (Fig. 2) correspond aux forces frictionnelles exercées par le flux sanguin contre la paroi vasculaire. Elle est déterminée par le débit sanguin, par la viscosité du sang et par le diamètre du vaisseau. La valeur moyenne de cette contrainte, dans une portion droite de vaisseau, est comprise entre 1 et 2 Pa, selon le type de vaisseaux. La contrainte de cisaillement agit sur des mécanosenseurs qui activent la CE (White *et al*., 2007). Si la contrainte de cisaillement est laminaire et stable, elle est essentielle à la protection engendrée par les CE contre l'athérosclérose, mais, si elle est laminaire faible ou oscillatoire avec recirculation du sang, elle peut aboutir à des disfonctionnements endothéliaux.

L'étirement cyclique, ainsi que la contrainte de cisaillement, engendrent une cascade de signalements au niveau de l'endothélium qui, selon le type, la force et la durée de la contrainte, réagira de façons différentes (Busse *et al*., 2006) pour s'adapter et ramener le système vers une situation proche de l'homéostasie.

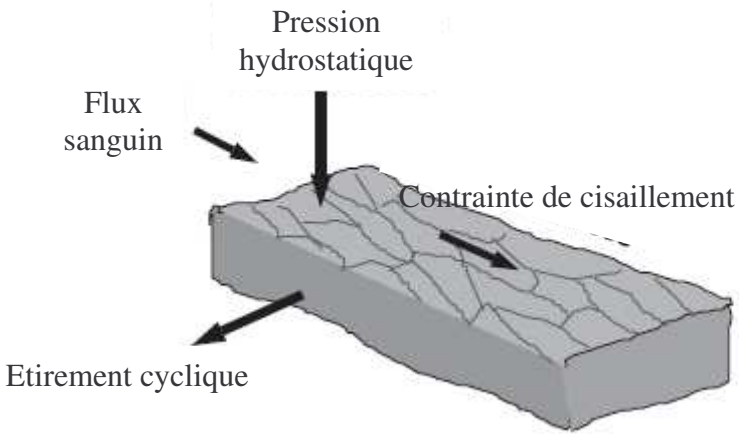


Fig. 2 : Schéma modélisant la contrainte de cisaillement (tangentiellement à la surface endothéliale), la pression hydrostatique (perpendiculairement à l'endothélium) et l'étirement cyclique exercés par le flux sanguin sur l'endothélium. Modifié de Chien 2006.

A l'échelle macroscopique, l'écoulement du sang dans les artères est généralement laminaire. Cependant, la géométrie des vaisseaux à proximité des singularités vasculaires (bifurcations, régions courbe, ...) prédispose à l'apparition de tourbillons.

Réponses des cellules endothéliales :

In vitro, en réponse à ces *stimuli*, deux phases de réponses des CE sont à distinguer :

- Une réponse précoce qui se déclenche dans les secondes qui suivent le début des contraintes liées au flux. Elle est liée à la force mécanique imposée par le flux. On parle de *sensing* mécanique.
- Une réponse tardive correspondant à l'adaptation des cellules à un flux soutenu.

Ainsi, des variations métaboliques précoces et des variations morphologiques plus tardives (Fig. 3) apparaissent en réponse aux *stimuli*, afin de permettre à la cellule de s'adapter à la modification de son environnement (Davies *et al*., 1997) :

- Variation métabolique précoce (≤6h) : modification du transcriptome et du protéome des gènes possédant, dans leur promoteur, une séquence spécifique appelée *Shear Stress Response Element* (SSRE). Certains gènes impliqués dans la vasoactivité, l'adhésion cellulaire, la coagulation et des facteurs de croissance voient ainsi leur expression modifiée.
- Variation morphologique tardive (≥6h) : réorientation des cellules, dans le sens du flux, avec une réorganisation du cytosquelette, et plus particulièrement des filaments d'actine.

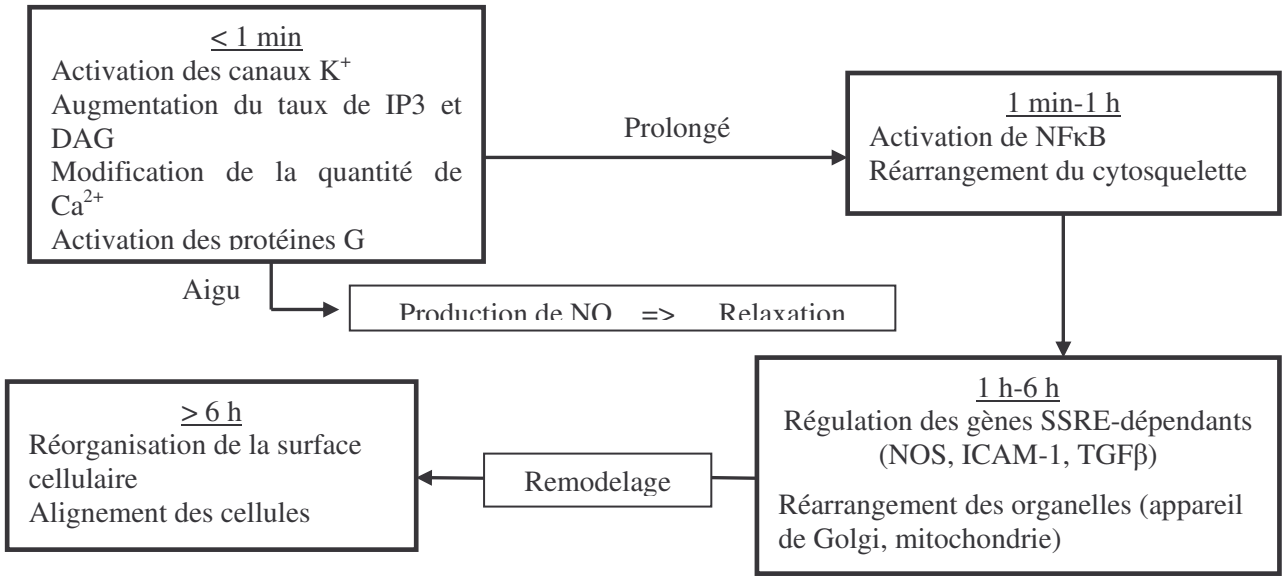


Fig. 3 : Réponses, en fonction du temps, de cellules endothéliales soumises à une contrainte de cisaillement. Adapté de Davies et coll., 1997. IP3 : Inositol-3-phosphate, DAG : Diacylglycérol

Il apparaît donc que 6h est une durée clé dans l'étude de l'interface précoce/tardif des réponses engendrées par la contrainte de cisaillement.

Les contraintes biochimiques :

L'activation endothéliale, générée par les contraintes biochimiques, est principalement due à des médiateurs humoraux tels que les cytokines comme le *tumor necrosis factor* α

(TNFα), les hormones ou les facteurs de croissance. Ces substances sont apportées par le sang ou produites localement par les cellules endothéliales elles-mêmes, ou par des cellules du compartiment vasculaire.

Les cellules endothéliales sont aussi sensibles au stress oxydatif provoqué par la présence accrue de dérivés oxygénés, tels que les ions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles, débordant le système anti-oxydant (superoxydismutase) (M. Toussaint-Hacquard, 2002). Ce stress aboutit à l'acquisition par la cellule d'un phénotype pro-inflammatoire et à une modification des interactions entre l'endothélium, les leucocytes et les plaquettes.

L'addition des contraintes mécaniques et biochimiques est le point phare de notre étude puisque nous étudierons les implications éventuelles au niveau de l'endothélium de l'injection d'une substance biochimique dans la circulation sanguine.

II. Le sang :

Le sang est un liquide très complexe nécessaire à la vie, hautement symbolique dans de nombreuses cultures. C'est un tissu conjonctif particulier, composé de cellules en suspension (éléments figurés) dans une matrice extracellulaire très fluide (plasma). Il représente environ 8 % du poids d'un individu, le plasma 55 % du volume de sang total (VST) et les éléments figurés 45 % du VST.

Le plasma est composé de 91 % d'eau et d'environ 9 % de molécules, dont 7 % de protéines, telles que l'albumine, les globulines ou le fibrinogène, et 2 % de molécules autres comme les gaz dissous, les nutriments, les hormones et les électrolytes.

Les éléments figurés se classent selon leur fonction en trois catégories :

- Les globules rouges, ou hématies, riches en hémoglobine assurant le transport des gaz respiratoires (O_2 des poumons vers les tissus et CO_2 des tissus vers les poumons).

- Les globules blancs, ou leucocytes, impliqués dans la réaction immunitaire. On y retrouve les polynucléaires (basophiles, éosinophiles et neutrophiles) et les mononucléaires (monocytes, lymphocytes et granulocytes).

- Les plaquettes, ou thrombocytes, participant à l'hémostase.

Chaque lignée cellulaire sanguine est très spécialisée. La quasi-totalité des cellules sanguines, à l'exception de certains types de lymphocytes, naît dans la moelle osseuse (hématopoïèse). Les cellules sanguines et leurs précurseurs sont présents dans le sang, la moelle osseuse et certains organes. Il s'agit essentiellement de l'ensemble du système lymphatique : ganglions, canaux lymphatiques, rate, amygdales. Le foie n'est habituellement pas rattaché aux organes hématopoïétiques, mais son rôle dans l'hématopoïèse lors de l'embryogénèse fait qu'il est souvent impliqué dans les maladies hématologiques.

II.1. Les globules rouges :

Le globule rouge mature est une cellule anucléée circulant dans les vaisseaux sanguins. Il fixe l'oxygène sur l'hémoglobine au niveau des poumons pour donner l'oxyhémoglobine et libère le CO_2, puis il « traverse » les capillaires des différents organes, où l'hémoglobine libère l'oxygène (désoxyhémoglobine) et se charge en CO_2 (carboxyhémoglobine).

Le globule rouge naît et achève sa maturation dans la moelle osseuse : c'est l'érythropoïèse. Après une durée de vie moyenne de 120 jours dans la circulation sanguine, le globule rouge meurt, c'est l'érythrolyse (ou hémolyse physiologique).

Les hématies sont les cellules les plus abondantes du sang. Le globule rouge peut être comparé à un "sac" contenant de l'hémoglobine et les molécules énergétiques indispensables à sa survie. Sa structure se décompose schématiquement en trois éléments : la membrane, les enzymes, et l'hémoglobine.

II.1.1. La membrane du globule rouge :

On distingue la membrane à proprement parler et le squelette membranaire.

La membrane : sa structure est celle d'une membrane cellulaire classique. Elle est constituée d'une bicouche lipidique où s'intercalent des protéines. Ces protéines sont de plusieurs types, certaines sont des transporteurs d'ions chlore et bicarbonate, d'autres des récepteurs membranaires. Une partie de ces protéines est porteuse des fonctions antigéniques du globule rouge et des groupes sanguins érythrocytaires (ABO, Rhésus, etc.).

Le squelette membranaire ou squelette érythrocytaire : il est responsable des propriétés mécaniques du globule rouge. Il est formé d'un réseau bidimensionnel de protéines qui tapissent la face interne de la membrane. Le principal constituant de ce réseau est la spectrine

(α et β). Les molécules de spectrine sont associées entre elles et arrimées à la membrane érythrocytaire par l'intermédiaire de l'ankyrine et d'autres protéines importantes.

L'injection de molécules exogènes peut modifier le comportement des globules rouges, par exemple leur déformabilité.

II.1.2. Les enzymes érythrocytaires :

Le globule rouge est une cellule simplifiée dont les besoins énergétiques sont faibles. Le rôle des enzymes est d'assurer les fonctions vitales du globule rouge :

- Apport d'énergie : destiné à maintenir la forme biconcave du globule rouge (importante pour la déformabilité), ainsi que les échanges transmembranaires.

- Lutte contre les agents oxydants.

II.1.3. L'hémoglobine :

Elle est le principal constituant du contenu érythrocytaire. C'est le pigment responsable de la coloration rouge du sang. Elle est constituée d'hème et de globine.

II.1.3.1. Structure

L'hémoglobine (Fig. 4) est une hémoprotéine de 64 kDa. Chaque molécule est un hétérotétramère formé de 4 chaînes de globine et de 4 molécules d'hème.

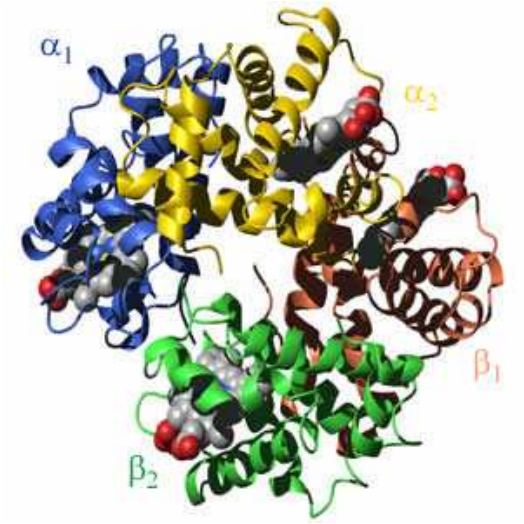


Fig. 4 : Modélisation 3D de la structure quaternaire de l'hémoglobine A humaine. C'est une protéine constituée de 4 chaînes de globine (2α et 2β) contenant chacune un hème pouvant se lier chacun à une molécule d'O_2.

L'hème : l'hème est une protoporphyrine de type IX (Fig. 5). Il comporte un atome de fer Fe^{2+} (ferreux). Le fer a cinq coordinations stables : quatre avec les atomes d'azote des noyaux

pyrrole de l'hème et une avec l'atome d'azote d'un résidu histidine de la globine. La sixième valence fixe l'oxygène de façon réversible : c'est la forme oxygénée (oxyhémoglobine).

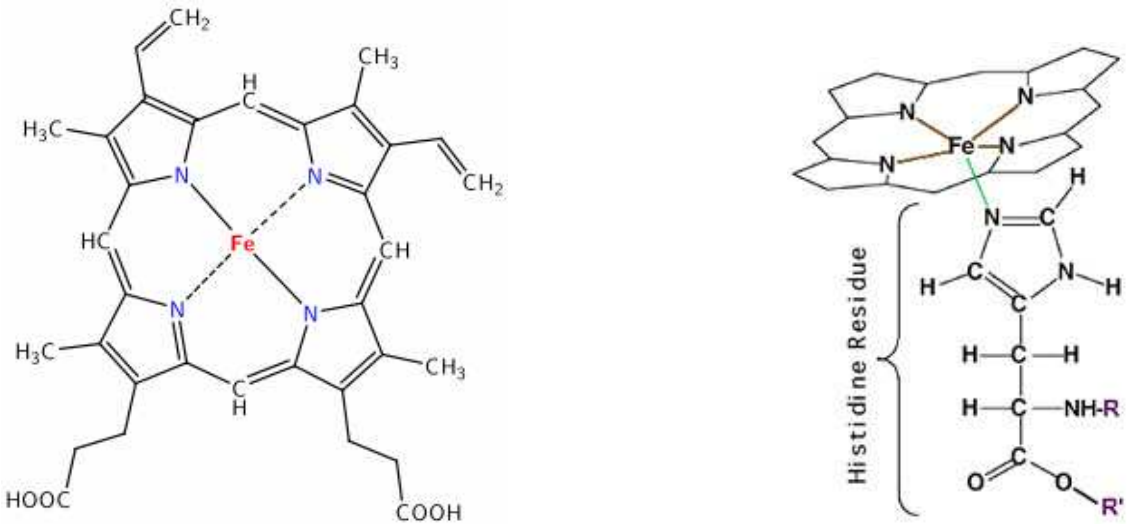


Fig. 5 : Représentation schématique d'un hème composé d'une porphyrine contenant un atome de fer ainsi que ces cinq coordinations.

La globine : c'est la partie protéique de l'hémoglobine. Chaque molécule d'hémoglobine est formée de 4 chaînes de globine : 2 de type α, et 2 de type β. La structure des chaînes de globine α ou β est très similaire. La structure de la chaîne bêta-globine qui entre dans la composition de l'hémoglobine A adulte, majoritaire, est, par exemple, la suivante :

- Structure primaire : 146 acides aminés,
- Structure secondaire : hélicoïdale,
- Structure tertiaire : globulaire, compacte, ménageant en son centre une cavité : la poche de l'hème,
- Structure quaternaire complexe.

Cette structure quaternaire de l'hémoglobine A consiste en des chaînes alpha et bêta associées entre elles pour former le tétramère de globine. Cette association est assurée par des ponts salins (interactions faibles) entre les chaînes homologues (α1α2 et β1β2) alors que les chaînes hétérologues (α-β) sont liées plus fortement, notamment au moyen de liaisons électrostatiques. Chaque globine porte en son centre une molécule d'hème. Au centre de la molécule d'hémoglobine se trouve une molécule de 2-3 diphosphoglycérate (2-3 DPG), molécule intermédiaire de la glycolyse anaérobie, présente dans les érythrocytes. Cette molécule de liaison assure le passage de la forme oxygénée à la forme désoxygénée, et donc la libération de l'oxygène dans les tissus.

II.1.3.2 Fonction :

L'hémoglobine est responsable du transport de l'oxygène, du monoxyde d'azote et du dioxyde de carbone, ainsi que de leurs échanges des poumons aux tissus pour l'oxygène (O_2) et le monoxyde d'azote (NO), et des tissus vers les poumons pour le CO_2 dont elle assure l'élimination.

II.2. Le transport des gaz :

II.2.1. Le transport de l'oxygène :

La fonction principale de l'hémoglobine est d'assurer le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et de le délivrer à ces derniers. Dans les poumons, l'oxygène se fixe de façon réversible sur le fer de l'hème par formation d'une liaison de coordination. La fixation de l'O_2 est coopérative, c'est-à-dire que la fixation de la première molécule d'O_2 provoque un changement de conformation de l'Hb qui permet une fixation plus facile et rapide des trois autres molécules d'O_2. A l'instar de cette association, la dissociation d'une molécule d'O_2 facilite la dissociation de la suivante. Ainsi l'hémoglobine existe sous deux formes principales : la déoxyhémoglobine ou forme T (tendue), de faible affinité pour l'O_2 et l'oxyhémoglobine ou forme R (relâchée) à haute affinité.

De plus, l'affinité de l'Hb pour l'O_2 dépend de différents facteurs, allant de la pression atmosphérique, à la présence d'un effecteur allostérique, le 2,3 DPG, en passant par le pH, la température et le type d'Hb considéré (fœtale, S,…).

Dans les conditions physiologiques (pH 7,4 à 37°C), la fixation de l'O_2 sur l'Hb dépend directement de la pression partielle en O_2 (PO_2) du milieu. Ainsi au niveau des alvéoles pulmonaires où la PO_2 est élevée (environ 100 mmHg), la fixation de l'O_2 va se faire facilement car l'affinité est forte, alors que dans les tissus où la PO_2 atteint seulement 40 mmHg, l'affinité pour l'O_2 est faible, donc favorise le relargage des molécules d'O_2 aux cellules. Ce comportement particulier (coopératif) se traduit sur la courbe de fixation de l'O_2 à l'Hb par une allure sigmoïdale caractéristique (Fig. 6). La P_{50} (pression de demi-saturation) est une valeur particulière représentant la pression partielle pour laquelle l'Hb cède la moitié de l'O_2 qu'elle transporte. L'Hb normale a une P_{50} de 26 mmHg.

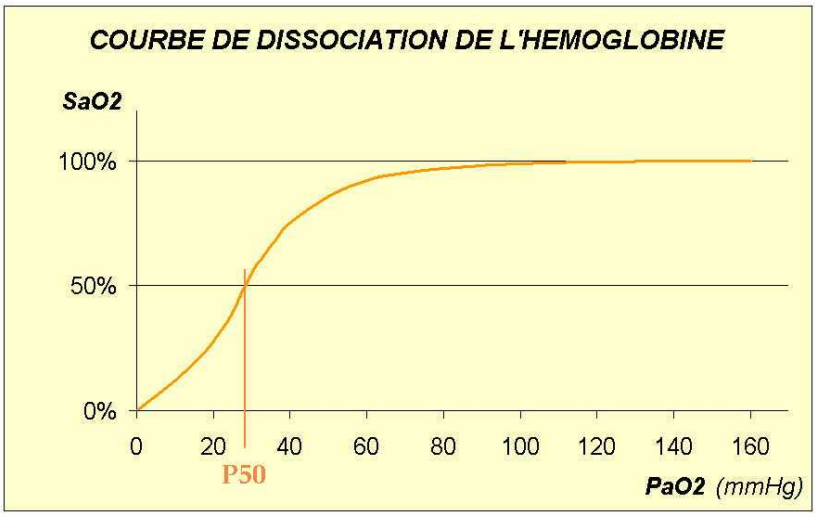


Fig. 6 : Courbe de Barcroft de dissociation de l'hémoglobine. Représentation de la fixation de l'O_2 sur l'hémoglobine en fonction de la PO_2. (http://www.ednes.com)

II.2.2. Transport du CO_2 :

Outre sa fonction de transport de l'O_2, l'Hb a aussi pour rôle d'éliminer environ 30% du CO_2, produit par le métabolisme des cellules, en assurant son transport des tissus vers les poumons. La fixation du CO_2 est dépendante de la PCO_2 sanguine. Elle transporte aussi les protons, ce qui lui donne un rôle majeur de tampon dans l'organisme.

II.2.3. Transport d'autres gaz :

L'Hb est aussi impliquée dans le transport du monoxyde de carbone (CO), pour lequel elle est très affine, assurant ainsi un système de détoxification de l'organisme.

Elle assure également le transport et le relargage du monoxyde d'azote (NO), molécule assurant la relaxation des cellules musculaires lisses dans le système cardiovasculaire. Elle contribue par ce biais à la régulation du tonus vasculaire basal (Veeramachaneni *et al.,* 1999).

III. La transfusion sanguine :

Les perturbations de l'apport en oxygène tissulaire dans des situations de défaillance respiratoire, de trouble circulatoire (état de choc) ou d'hémorragie sévère conduisent à une hypoxie ou à une ischémie à l'origine de lésions biochimiques qui peuvent être irréversibles si la durée de cette perturbation est longue. Dans les cas de pertes sanguines importantes, la transfusion rapide de concentrés érythrocytaires à pour but de restaurer le volume circulant, mais aussi d'améliorer l'apport tissulaire en oxygène et donc de limiter les conséquences de

l'hypoxie-réoxygénation. Les hémorragies importantes peuvent se présenter dans différents cas de figure :

- Accident de la route
- Opération chirurgicale (orthopédie, cardiaque…).

Cependant, la transfusion sanguine homologue est une pratique qui présente des limites détaillées ci-dessous.

III.1. Inconvénients de la transfusion sanguine :

III.1.1. Approvisionnement :

Chaque année, près de 100 millions d'unités de sang sont transfusées lors d'interventions chirurgicales (www.dondusang.net). Or, les dons de sang sont de moins en moins nombreux. De plus, le nombre de donneurs jeunes diminue, tout comme le nombre de donneurs sains. Le vieillissement de la population entraîne également la multiplication d'opérations chirurgicales comme la chirurgie orthopédique, grandes consommatrices d'unités globulaires impliquant un besoin croissant de sang. Parallèlement, le prix de revient associé aux tests de dépistage (VIH, hépatite) est de plus en plus élevé. Un enjeu médical majeur de ce début de siècle est donc de pallier le manque chronique de sang et d'en réduire le coût.

III.1.2. Incompatibilité :

Les globules rouges présentent différents types d'antigènes à leur surface comme le système ABO, le groupe rhésus, le facteur Kell, etc. La présence de ces marqueurs nécessite l'établissement du phénotype sanguin du donneur avant perfusion, ce qui impose un délai trop long dans certaines situations d'urgence. De plus certains groupes rares peuvent être momentanément indisponibles.

Par ailleurs, il existe, chez certains patients, des anticorps irréguliers (anti-rhésus et anti-Kell) susceptibles de provoquer des accidents hémolytiques post-transfusionnels. Ceux liés au risque immunologique par conflit allo-immun dans le système ABO sont passés de 1/50 000 à 1/100 000 en 2004. Plus de la moitié des incidents ABO sont strictement imputables à la responsabilité humaine au cours du phénotypage ; le reste est représenté par des erreurs techniques et organisationnelles grandement dépendantes du facteur humain (Rouger, 2004).

III.1.3. Risque infectieux :

Le risque infectieux se traduit par la transmission de virus (VIH, hépatite C, B...) et de bactéries. Il existe beaucoup de techniques de dépistage qui permettent de diminuer significativement les risques de leur transmission lors de perfusion. Ceux propres à la transmission de chaque maladie sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : Risques de transmission du VIH, de l'hépatite B et C et de bactéries lors de transfusion en France et aux Etats-Unis.

Risque de transmission	France (2001-2003) d'après Pillonel *et al*., 2005 et Rouger, 2004	Etats-Unis (2001) D'après Brecher *et al*., 2005 et Sandler *et al*., 2003
VIH	1/1 700 000	1/2 400 000
Hépatite C (VHC)	1/1 560 000	1/1 700 000
Hépatite B (VHB)	1/640 000	1/149 000
Bactéries	1/182 000 (2002)	1/500 000

Actuellement, une nouvelle technique de dépistage des bactéries vient de faire son apparition, il s'agit du « nucleic acid testing » (NAT). Elle consiste en l'amplification des acides nucléiques des bactéries éventuellement présentes dans les échantillons par PCR en temps réel (Dreier *et al*., 2007). Ceci permet de détecter de faibles quantités de bactéries éventuellement présentes au début de la conservation des concentrés globulaires. Le NAT utilisé pour détecter les bactéries dans les échantillons de sang présente un fort potentiel, cependant des études doivent encore être menées pour prouver son applicabilité aux techniques de dépistage de routine des infections par les services de transfusion.

III.1.4. Conservation :

Les concentrés érythrocytaires se conservent 42 jours à 4°C. Cette courte période de conservation peut engendrer des pénuries de sang, surtout pour les groupes les plus rares. De plus, la nécessité de conservation à 4°C complique le stockage et le transport du sang sur les lieux d'accidents par exemple.

III.1.5. Coût :

Afin d'améliorer la sécurité transfusionnelle, le nombre de tests de dépistage a augmenté et certaines mesures ont été imposées comme la déleucocytation en 1998 (EFS). De nombreuses

études ont montré l'intérêt médical et scientifique de l'épuration des globules blancs dans les produits sanguins :

-Réduction efficace de l'incidence de l'allo-immunisation HLA,

-Prévention de la transmission d'agents infectieux vectorisés par les leucocytes (virus, bactéries),

-Limitation de la sécrétion par les leucocytes de cytokines inflammatoires pendant la conservation des produits sanguins,

-Prévention de l'induction d'une immunosuppression, en particulier chez les malades atteints de pathologie cancéreuse,

-Prévention, dans de nombreux cas, du syndrome " frissons-hyperthermie " lié à la transfusion de produits sanguins non déleucocytés.

Ceci a pour conséquence directe une augmentation du coût de la transfusion.

III.1.6. Perception de la transfusion par la population :

La religion ou les traditions de certaines populations comme les témoins de Jéovah, conduisent au refus de la transfusion sanguine. Devant ces différents inconvénients, il s'est avéré nécessaire de développer une alternative à la transfusion sanguine homologue afin d'en limiter l'usage.

III.2. Stratégies de substitution à la transfusion sanguine homologue :

III.2.1. La transfusion autologue :

La transfusion autologue, lors d'interventions chirurgicales, est une alternative efficace qui permet de pallier ces inconvénients. Elle peut être mise en œuvre de trois façons différentes :

- Autotransfusion du patient pour intervention programmée. Le mois précédent l'opération, plusieurs poches de sang sont prélevées chez le patient, et seront perfusées, selon les besoins, au cours de l'opération.

- Hémodilution normovolémique péri-opératoire : immédiatement avant l'opération, plusieurs unités de sang sont prélevées sur le patient de façon à atteindre une concentration en hémoglobine dans le sang de 70 g/L à 90 g/L. La normovolémie est alors maintenue par perfusion de colloïdes ou de cristalloïdes. Cette technique permet une perte de globules rouges moindre lors des saignements liés à la chirurgie. Le propre sang du patient lui est ensuite transfusé à la fin de l'opération ou avant, si le seuil de transfusion est atteint.

- Récupération de sang intra-opératoire : cette méthode est la plus fréquemment utilisée, en particulier pour les opérations induisant d'importantes perte de sang. Elle consiste à récupérer le sang épanché au cours de l'opération et de le reperfuser immédiatement. Elle est bien tolérée mais nécessite certaines précautions afin d'éviter une contamination bactérienne ou la transmission de cellules malignes par l'intermédiaire du champ opératoire.
Ces alternatives ne sont toutefois envisageables que pour des interventions programmées et ne conviennent pas aux situations d'urgence.

III.2.2. Les substituts de restauration de la volémie ou « plasma expanders » :

Le maintien de la volémie, ou masse sanguine totale, est indispensable au bon fonctionnement des organes. Toute hypovolémie, qu'elle soit absolue, par diminution de la masse sanguine, ou relative, par diminution du retour veineux au cœur, expose au risque d'effondrement du débit cardiaque, de la pression artérielle et par conséquent du transport et de la délivrance tissulaire en oxygène, à l'origine d'un syndrome de défaillance multiviscérale. Le remplissage vasculaire a donc pour objectifs la restauration d'une volémie efficace, ainsi que le maintien d'une pression de perfusion et d'un apport d'oxygène adéquats. Différents solutés de remplissage sont à la disposition des cliniciens. Ils se répartissent en deux grandes catégories, les cristalloïdes et les colloïdes. Le choix d'un produit de remplissage doit prendre en compte les propriétés physico-chimiques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du soluté, ses effets secondaires, ainsi que le contexte et l'indication du remplissage vasculaire. Cependant, ils ne peuvent pas être utilisés en cas de pertes sanguines massives puisqu'ils ne transportent pas l'O_2 et conduiraient à l'anémie.

Les cristalloïdes :

Ringer lactate et sérum salé isotonique (9 g/l de NaCl) : leur volume de diffusion est l'ensemble du compartiment extracellulaire, ce qui explique leur faible pouvoir d'expansion volémique. En moins d'une heure, 20 à 25% des volumes perfusés resteront dans le secteur vasculaire et 75 à 80% iront dans le secteur interstitiel. Il semble cependant que cette diffusion extracellulaire soit ralentie chez le sujet hypovolémique. Néanmoins, en cas de pertes sanguines, le volume de cristalloïde nécessaire au maintien de la volémie est très supérieur (généralement trois fois) au volume à compenser.

Les solutés hypertoniques :

Ces solutés possèdent une osmolarité supérieure à celle du plasma (300 mosmol/kg) et leur espace de diffusion est limité au compartiment extracellulaire. Ces solutions peuvent être salées ou non, le chlorure de sodium hypertonique à 7,5% étant le soluté de référence (75 g/l de NaCl). Son pouvoir d'expansion immédiat est élevé (environ huit fois plus important que celui du sérum salé isotonique) mais transitoire.

Différentes études expérimentales et cliniques ont été réalisées avec les solutés de sérum salé hypertoniques (SSH). Sur des modèles animaux de choc hémorragique, les SSH améliorent les conditions hémodynamiques chez les sujets en état de choc hypovolémique (Kreimeier *et al*., 1997). Leur perfusion s'accompagne d'une chute de la pression intracrânienne (PIC) chez les traumatisés crâniens et en cas de choc hémorragique (Qureshi *et al*., 2000). Un effet « rebond » sur la PIC a été observé à l'arrêt de la perfusion de SSH, mais il est difficile de l'attribuer à un effet secondaire propre, compte-tenu de leur brève durée d'action.

Les colloïdes :

La pression colloïdale exercée par ces solutions est fonction du nombre de molécules ne franchissant pas la barrière capillaire, du fait de l'importance de leur taille (reflétée par le poids moléculaire). Leur efficacité dépend également de leur devenir métabolique et de leur élimination rénale. On distingue les colloïdes naturels (albumine) et les colloïdes de synthèse (dextrans, gélatines et hydroxyéthylamidons).

L'albumine : Colloïde d'origine humaine (plasmatique), elle est obtenue par fractionnement du plasma. Son pouvoir d'expansion volémique est de 18 à 20 mL/g. La solution à 4% possède une pression colloïde légèrement inférieure à celle du plasma et de ce fait, l'expansion volémique représente seulement 80% du volume d'albumine perfusé. La solution à 20%, en créant un transfert d'eau du secteur interstitiel vers le secteur vasculaire, détermine une expansion volémique égale à environ quatre fois le volume perfusé. La durée d'action des perfusions d'albumine est conditionnée par la perméabilité capillaire. Chez un sujet sain, le taux de transfert d'albumine à travers le capillaire vers le secteur interstitiel est de 5% par heure, mais il peut augmenter dans les états pathologiques, induisant une réponse inflammatoire d'origine systémique importante.

Les dextrans : Ce sont des polymères glucidiques d'origine bactérienne. En fonction de leur poids moléculaire (PM), on distingue les dextrans 40 (PM = 40 kDa), 60 (PM = 60 kDa) et 70 (PM = 70 kDa). Le pouvoir d'expansion volémique varie selon les solutions : un gramme de dextran 40 retient 30 ml d'eau dans le compartiment intravasculaire contre environ 25 ml pour les dextrans 70. La voie d'élimination principale est le rein, par filtration glomérulaire, les voies secondaires sont lymphatiques et digestives, sous forme de sécrétions intestinales et pancréatiques. Les dextrans ne sont plus utilisés en France depuis dix ans car ils présentent de trop grands risques de réactions anaphylactiques.

Les gélatines : Ce sont des polypeptides d'origine animale obtenus par hydrolyse de collagène osseux de bœuf. On distingue les gélatines fluides modifiées (Plasmion®, Gélofusine® et Plasmagel®), contenant du calcium en plus grande quantité, et les gélatines à pont d'urée (Hæmacel®). L'élimination est essentiellement rénale, par filtration glomérulaire (Forestier *et al*., 2000).

Les hydroxyéthylamidons (HEA) : Ce sont des polysaccharides naturels (extraits de l'amidon de maïs) dont les unités de glucose ont subi une hydroxyéthylation au niveau des atomes de carbone en position C2 et C6, retardant leur hydrolyse plasmatique et augmentant l'hydrophilie des molécules. L'élimination des molécules de poids moléculaire moyen (PMm) inférieur à 50-60 kDa s'effectue rapidement par filtration rénale. Les molécules de PMm élevé sont hydrolysées par l'α-amylase plasmatique en molécules de plus petites tailles qui sont ensuite éliminées lentement par le système réticulo-endothélial et par le rein. Le pouvoir d'expansion volémique est de 100 à 140 % par rapport au volume perfusé (Forestier *et al*., 2000). L'exemple le plus connu, utilisé dans ce travail, est le Voluven®.

Quand l'hémorragie est trop importante (> à 40%), en plus de la restauration de la volémie, il faut rétablir le transport de l'oxygène et donc l'oxygénation des organes. Parmi les solutions qui transportent l'oxygène (Oxygen Carriers), on distingue deux catégories majeures, les perfluorocarbures (PFC) et les substituts à base d'hémoglobine (HBOC : hemoglobin based oxygen carriers).

III.2.3. Les transporteurs d'oxygène :

Une autre alternative au traitement de l'hémorragie sévère est la mise au point de substituts érythrocytaires capables de restaurer la volémie et d'assurer la réoxygénation des tissus (Fig. 7).

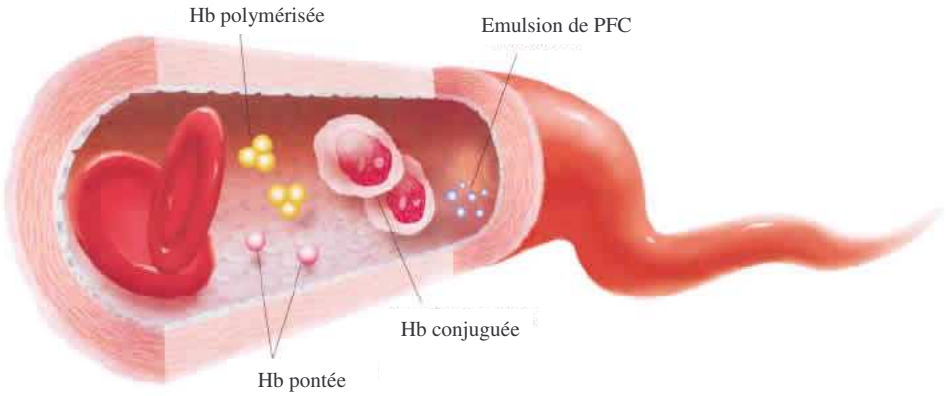


Fig. 7 : Différents types de substituts érythrocytaires envisagés pour la transfusion (adapté de www.eurobloodsubstitutes.com)

III.2.3.1. Cahier des charges des substituts érythrocytaires :

En 2004, la FDA a établi un nouveau cahier des charges concernant l'évaluation des critères de sécurité et d'efficacité des « oxygen therapeutics » utilisés comme substituts capables de transporter l'O_2 (Guidance for industry, 2004). Différents points y sont abordés, allant de :

- La pureté du produit (élimination des débris membranaires),
- La stabilité dans le temps et la facilité de conservation,
- L'efficacité dans le transport et le relargage de l'oxygène,
- L'innocuité cardiaque, rénale, gastro-intestinale,
- La sécurité bactériologique (endotoxine, non activation du système inflammatoire),
- La maîtrise du stress oxydant,
- La maîtrise de la vasoactivité.

III.2.3.2. Historique du développement :

Le premier essai clinique utilisant des hémolysats d'érythrocytes administrés en solution saline a été réalisé par Amberson en 1949 (Amberson *et al.*, 1949). Il s'est traduit par une toxicité sévère au niveau des reins mais démontra aussi les propriétés de transport de l'oxygène de ce genre de solutions. Dès lors, la purification des solutions d'hémoglobine libre, l'élimination des membranes globulaires et la modification chimique de l'hémoglobine

ont permis de diminuer la toxicité et d'augmenter la stabilité ainsi que la rémanence vasculaire, et donc l'efficacité de ces solutions.

Parallèlement, dans les années 1960, d'autres équipes démontraient la capacité des perfluorocarbures (PFC) à transporter l'oxygène (Geyer *et al*., 1968). Mais ce n'est réellement qu'à partir du milieu des années 1980, avec l'émergence de la contamination du sang, avec les virus du SIDA et de l'hépatite C notamment, que de réels progrès ont été faits dans le développement de ces transporteurs d'O_2 aboutissant à l'élaboration de produits de nouvelle génération.

III.3. Les PerFluoroCarbures (PFC) :

En 1966, Clark et Gollan découvrent qu'une souris complètement immergée dans un fluorocarbure liquide (le fluorobutyltétrahydrofurane), saturé en O_2 à pression atmosphérique, peut survivre pendant quelques heures en extrayant l'O_2 dissous dans l'émulsion (Clarck et Gollan, 1966).

III.3.1. Structure :

Les PFC sont des produits de synthèse, chimiquement et biologiquement inertes, qui dérivent des hydrocarbures par la substitution partielle ou totale des atomes d'hydrogène par des atomes de fluor ou de brome (Faithfull, 1994).

Parmi ces dérivés, on trouve notamment le bromure de perfluoro-octyle, le perfluoro-octyléthane et le perfluorodichloro-octane.

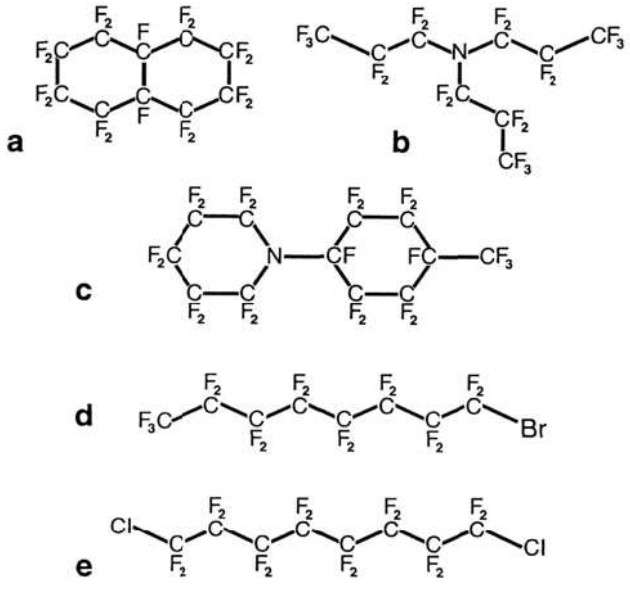


Fig. 8 : Formules chimiques de perfluorocarbures : a) perfluorodécaline, b) perfluorotripropylamine, c) perfluorométhylcyclohexylpipéridine, d) bromure de perfluoro-octyle, e) α,ω-dichloroperfluoro-octane, d'après Riess, 1998.

III.3.2. Propriétés :

L'inertie des PFC provient de leur structure géométrique : les atomes de carbone se trouvent au centre d'arrangements compacts de fluor, formant un manchon protecteur. Leur intérêt en tant qu'*oxygen therapeutics* découle de leur capacité à dissoudre de grandes quantités de gaz tels qu'O_2 et CO_2, en fonction de la pression partielle de ce gaz. Contrairement à l'hémoglobine, il n'existe pas de liaison entre l'oxygène et les PFC, le transport de l'O_2 s'effectue par dissolution dans l'émulsion formée par les PFC.

Néanmoins, le produit phare de cette méthode, Oxygent ^{tm} produit par Alliance, s'est vu refuser sa mise sur le marché américain par la FDA en février 2005 en raison de problème de sûreté. Cependant, ce problème serait imputé à un protocole expérimental inapproprié (Riess, 2006). En février 2007, suite à une révision du protocole d'administration, il s'est vu autoriser à entrer dans la phase II des essais cliniques en France et en Chine.

III.4. Les transporteurs à base d'hémoglobine (*Hemoglobin based oxygen carriers* : HBOC) :

De par sa fonction de transporteur naturel de l'O_2, l'Hb est une molécule de choix dans le développement d'un substitut plasmatique capable de transporter l'O_2. L'Hb est extraite des GR, ce qui permet de s'affranchir des risques d'incompatibilité de groupe induits par les marqueurs phénotypiques exprimés sur la membrane.

III.4.1. Origine de l'hémoglobine :

Les transporteurs d'O_2 à base d'hémoglobine actuellement en cours d'évaluation sont de différentes origines :

- Humaine : l'Hb humaine est extraite de concentrés globulaires périmés, permettant ainsi une valorisation des poches de sang en fin de vie. Cependant, cette ressource reste limitée car la gestion des stocks de culots érythrocytaires est optimisée. De plus, l'Hb libre obtenue nécessite d'être modifiée chimiquement du fait de son affinité très élevée pour l'O_2 en absence de 2,3 DPG éliminé lors de la purification, et de sa rapide dissociation en dimères qui franchissent les barrières endothéliales et rénales. Ces phénomènes diminuent sa rémanence vasculaire et donc sa capacité de restauration de la volémie et de réoxygénation.

- Bovine : l'Hb bovine provient de la purification de sang bovin. C'est un matériau peu onéreux dont les stocks sont considérables. Elle nécessite moins de modification chimique que l'Hb humaine du fait que l'affinité et le relargage de l'O_2 sont médiés par les ions chlorure (Cl^-) largement présents dans le plasma et non par le 2,3 DPG, comme pour l'Hb humaine. Cependant, elle peut amener à des problèmes éthiques importants dus à la source même de l'Hb et au risque de transmission associé aux maladies à prion comme celle de Creutzfeld-Jacob (encéphalopathie spongiforme bovine). De plus, on ne connaît pas les effets à long terme, au niveau inflammatoire (choc anaphylactique), d'injections répétées d'Hb xénogène.

- Recombinante : ces hémoglobines représentent le nouvel « eldorado » des chercheurs. En effet, elles sont produites par modification génétique de bactéries (E. coli), de levures (S. cerevisiae ou P. patoris) ou de champignons (A. niger) qui peuvent produire, à long terme, de grandes quantités d'hémoglobine pure exempte de toute contamination et d'autres composants sanguins, et modifiée de façon à réduire les limites de l'Hb naturelle (stabilité du tétramère,…). Elles permettraient aussi de contourner les réticences culturelles et religieuses.
  Cependant, ce type d'Hb engendre encore des coûts de production trop importants, si on envisage de les produire à l'échelle industrielle, sans considérer les difficultés de développement des souches les plus favorables.

C'est pour ce dernier genre d'Hb que le projet *Euroblood substitutes* se proposait de créer une plateforme de techniques de production et d'évaluation.

Afin de limiter les inconvénients de l'Hb libre injectée dans la circulation sanguine et de se rapprocher d'un substitut érythrocytaire idéal, l'Hb libre doit subir des modifications chimiques et/ou génétiques permettant de prolonger sa demi vie plasmatique en stabilisant le tétramère et/ou en augmentant son poids moléculaire, et d'ajuster son affinité pour l'oxygène. Il est aussi possible d'essayer de reconstituer un GR « synthétique » par encapsulation de l'Hb.

III.4.2. Modifications de l'Hb :

III.4.2.1. Augmentation de la rétention vasculaire :

L'hémoglobine native libre dans le plasma se dissocie facilement en dimères (αβ) ou en monomères qui sont rapidement éliminés de la circulation (extravasation et filtration rénale) (Lathem, 1959). Plusieurs types de modifications sont utilisés afin de stabiliser la forme tétramérique :

- *Le pontage intramoléculaire* : afin de limiter la dissociation du tétramère, il est possible de créer des liaisons covalentes grâce à des agents de jonction comme le bis-(3,5-dibromosalicyl)fumarate, qui se lie au niveau des lysine 99 des deux chaînes. C'est le cas de αα-Hb (Diasparin cross-linked Hb, Baxter). Cette hémoglobine sera testée dans une partie de notre étude. Le pontage peut aussi être obtenu par génie génétique comme cela a été proposé par la plateforme technologique du projet européen.

- *La conjugaison ou le couplage à des macromolécules* : la surface de l'Hb est riche en résidus lysine, sites potentiels d'attachement de macromolécules telles que le Polyéthylène glycol (PEG-Hb, M. Perrella, Université de Milan, EBS project) ou le dextran (Hb-Dex-BTC, Pasteur Mérieux, France). Le but recherché est toujours de stabiliser le tétramère et d'augmenter la rétention plasmatique. Ces deux substituts potentiels à base d'Hb seront étudiés dans deux parties distinctes de notre étude, du fait de leur stade différent de développement et de leur disponibilité limitée (PEG-Hb).

- *La polymérisation* : les lysines présentes à la surface de la protéine d'Hb sont également des cibles potentielles de fixation d'agents bifonctionnels, tels que le glutaraldéhyde (Oxyglobin®, Biopure, USA). Ces agents permettent, d'une part, la formation de pontages intramoléculaires et, d'autre part, la polymérisation des tétramères d'Hb, augmentant considérablement la masse moléculaire de l'hémoglobine. Une Hb polymérisée sera utilisée dans notre étude : l'Oxyglobin®.

Une étude a montré que l'utilisation d'Hb polymérisée ou pégylée augmente la rétention et diminue l'extravasation (Haney *et al*., 2000).

- *Mutagénèse dirigée* : une autre possibilité de polymérisation de l'Hb est actuellement à l'étude. Elle fait appel au génie génétique. En effet, il est possible d'introduire un résidu cystéine en position 83 de la chaîne β, par mutagénèse dirigée, comme c'est le cas pour l'Hb Ta-Li, mutant naturel de l'Hb. Cette cystéine permet la formation d'un pont disulfure entre les sous-unités β de deux tétramères, ce qui forme une Hb octamérique (Fig. 9) (Fablet *et al*., 2003).

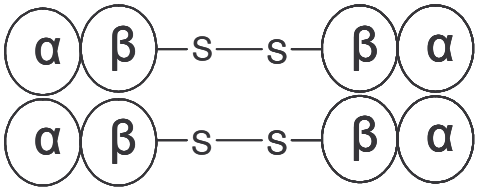


Fig. 9 : Schéma de l'hémoglobine octamérique après formation des deux ponts disulfure entre les sous-unités β des deux tétramères.

III.4.2.2. Diminution de l'affinité pour l'oxygène :

Plusieurs techniques permettent de restaurer la P_{50} à une valeur physiologique (26 à 28 mm Hg). Ainsi le pontage intramoléculaire par certains agents dérivés du pyridoxal 5'-phosphate au niveau des deux sous-unités β, ou par des dérivés benzène carboxylate liant les chaînes αα, ββ, ou αβ en fonction du pH, permet de simuler la fixation du 2,3 DPG et donc de réguler l'affinité pour l'oxygène. L'utilisation de l'Hb bovine est une autre alternative, puisqu'elle est régulée par les ions chlorure présents dans le plasma. Enfin, la technologie recombinante permet de modifier, par mutagénèse dirigée, le site de fixation du 2,3 DPG ou d'introduire des sites de fixation des ions chlorure.

III.4.2.3. L'encapsulation :

Finalement, il est aussi possible d'encapsuler l'Hb dans des vésicules (liposomes ou nanosphères) afin d'essayer de reproduire le structure d'un GR. Ces vésicules sont constituées d'acide polylactique biodégradable ou de lipides recouverts de PEG les rendant furtives. Cette encapsulation peut être associée à l'introduction d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase ou la catalase (Chang, 2006).

III.4.3. Perception du public vis-à-vis des substituts sanguins :

Une étude menée au Royaume Uni en 2005 a mis en évidence que la technique de transfusion considérée comme la moins risquée était la transfusion de concentrés plaquettaires, devant la transfusion de substituts sanguins à base de composés chimiques, puis

des substituts synthétisés par des bactéries et la transfusion de substituts à base d'hémoglobine bovine considérée, de loin, comme la plus risquée (Flemming *et al*., 2007).

III.4.4. Produits développés et en cours d'évaluation clinique :

Les substituts érythrocytaires ont vu leur développement clinique progresser. Cette phase fut suivie d'un léger ralentissement ces dernières années devant les effets secondaires, difficiles à résoudre, engendrés par l'utilisation d'Hb. Cependant, l'arrivée de techniques associées à la biologie moléculaire, comme la mutagénèse dirigée et le perfectionnement des techniques de production dans des microorganismes donnent de nouveaux espoirs dans le développement de tels substituts.

Les principaux domaines d'application de ces solutions sont la chirurgie cardiaque et orthopédique. Seules deux solutions ont été approuvées pour l'utilisation en clinique, dont l'une possède une autorisation de mise sur le marché. Ces deux solutions sont produites par Biopure, l'Oxyglobin® et l'Hemopure®. Elles sont toutes deux des hémoglobines bovines polymérisées. L'Oxyglobin® est préconisée pour une utilisation vétérinaire sur des chiens anémiques. L'Hemopure® a reçu une AMM en Afrique pour le traitement de l'anémie chez des patients pendant les opérations chirurgicales et vient de faire l'objet d'une demande d'AMM en Angleterre (janvier 2007) pour être utilisée en chirurgie orthopédique et en cas d'anémie sévère.

Le tableau II permet de retrouver l'essentiel des solutions développées à l'heure actuelle ainsi que leur stade de développement clinique.

Tableau II : Descriptif de substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine produits à l'heure actuelle détaillant la source d'hémoglobine, le niveau clinique de développement ainsi que leur application potentielle.

Produit	Compagnie	Source	Niveau de développement clinique	Application
Hemopure ™	Biopure Corporation, Cambridge, USA	Hb bovine polymérisée	Utilisation approuvée en 2001 en Afrique du sud	Traitement de l'anémie sévère comme alternative à la transfusion
Hemolink ™	Hemosol Incorporated, Toronto, Canada	Hb humaine pontée	Phase III terminée	Utilisation en chirurgie cardiaque
Hemospan ™	Sangart Incorporated, San Diego, USA	Hb humaine conjuguée	Phases Ib/II initiées en Suède en 2003	Essais en chirurgie orthopédique
Optro™	Baxter International, Deerfield, USA	Hb pontée modifiée génétiquement et produite par E. coli	Phase II terminée	Essais terminés sur des patients subissant une chirurgie en 1999

III.4.5. Interaction des substituts à base d'Hb avec l'endothélium, réactions adverses :

Un éditorial (joint en annexe) concernant les interactions possibles entre les substituts érythrocytaires à base d'Hb et l'endothélium vasculaire a été soumis récemment dans la revue antioxidants and redox signaling.

Editorial: "How to evaluate blood substitutes for endothelial cell toxicity?"-Comment évaluer la toxicité des substituts sanguins vis à visdes cellules endothéliales.

Cet éditorial résume les études menées par différentes équipes internationales et concerne les méthodes d'étude de l'interaction, potentielle, endothélium/HBOC *in vitro*. Nous en résumerons ici les points majeurs.

III.4.5.1. Stress oxydatif engendré par les HBOC :

Le stress oxydatif engendré par l'incubation de substituts sanguins avec des CE est généré essentiellement par l'état d'oxydation de l'hémoglobine libre. En effet, le fer présent sous forme Fe^{2+} dans l'Hb peut s'auto-oxyder en Fe^{3+} et ainsi induire le passage de l'Hb en metHb, toxique pour l'organisme et peu affine pour l'O_2. Cette réaction peut se faire spontanément ou être due à la présence d'H_2O_2 ou d'espèces réactives de l'oxygène

relarguées lors de la réoxygénation après ischémie-reperfusion. L'H_2O_2 peut aussi réagir avec le Fe^{3+} pour produire un état d'oxydation supérieur, Fe^{4+} qui peut initier alors des réactions d'oxydation des membranes cellulaires telle que la peroxydation lipidique.

Ce stress oxydatif, produit par l'état d'oxydation des HBOC, induit l'activation des CE et, en particulier, l'expression de l'hème oxygénase-1 (HO-1) et des NO synthases.

L'Hème-oxygénase :

Structure et rôle de l'hème oxygénase 1 : l'hème oxygénase (HO) est une enzyme qui catalyse la dégradation de l'hème en fer, CO et biliverdine (fig. 10). Il existe 3 formes de HO : HO-1, présente de façon homogène dans tous les types cellulaires, est induite par le stress oxydatif et l'hypoxie (Motterlini *et al*., 2000), HO-2, exprimée de façon constitutive, est présente dans le cerveau et les testicules, et HO-3, que l'on trouve notamment dans la rate et le foie, catalyse la dégradation de l'hème, moins efficacement que HO-1 (Mc Coubrey *et al*., 1997).

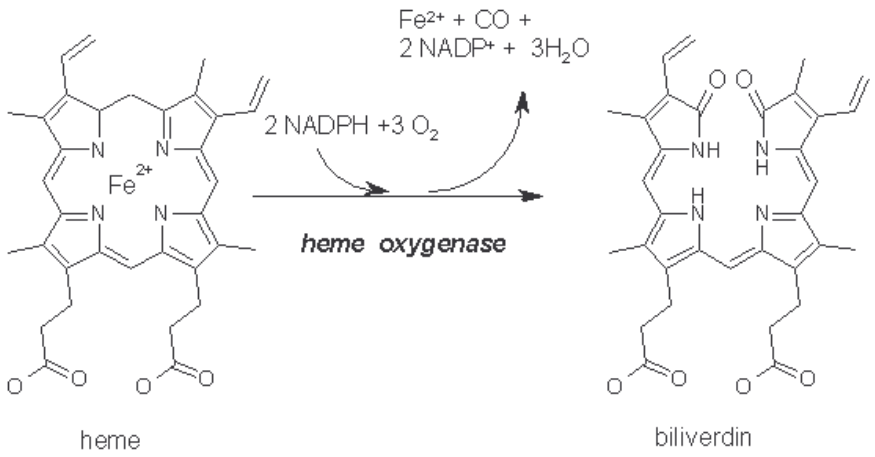


Fig. 10 : Dégradation de l'hème libre en biliverdine et CO par l'hème oxygénase-1. (D'après med.unibs.it)

L'HO-1 est induite par la présence de metHb et permet son catabolisme. Ainsi, en favorisant l'élimination de la metHb, l'HO-1 permet de diminuer la toxicité induite par l'oxydation des HBOC au contact des CE.

La NO synthase :

Biosynthèse de NO : chez les mammifères, la formation de NO est catalysée par une famille d'enzyme appelée NO synthases (NOS). En présence d'O_2 et de NADPH, l'arginine est transformée en citrulline, libérant NO au passage.

Trois isoformes de NOS existent : une forme neuronale (NOS1 ou nNOS), une forme inductible (NOS2 ou iNOS) et une forme constitutive (NOS3 ou eNOS) présente dans les CE (Forstermann *et al*., 1995).

Structure de la eNOS : La eNOS est active sous forme homodimérique. Elle possède un poids moléculaire de 135 kDa. Chaque monomère se compose de plusieurs domaines :

- un domaine réductase, fixant le NADPH.
- un petit domaine de fixation de la calmoduline, indispensable à la dimérisation de l'enzyme et à son activité.
- un domaine oxygénase impliqué dans la formation de NO.

La eNOS est régulée par de nombreux facteurs biochimiques (Harrison *et al*., 2006) modulant son activité ou son expression comme la calmoduline, la concentration de calcium intracellulaire ou les hormones. Des facteurs non biochimiques interviennent également dans la régulation de la eNOS :

- **la contrainte de cisaillement**, imposée par le flux sanguin, provoque l'activation des récepteurs aux contraintes mécaniques et donc l'activation de la NOS (Harrison *et al*., 2006).

- **le piégeage de NO** par certaines substances, telles que les HBOC, provoque une vasoconstriction des vaisseaux. En condition normale, les GR circulent dans la partie centrale du vaisseau (Fig. 11 A). Ainsi, deux zones se mettent en place : une centrale, contenant les GR, encadrée par une zone ténue, dépourvue de GR (Alayash, 2004). C'est dans cette zone que circule NO. Lors de l'injection d'HBOC, les molécules d'Hb modifiée circulent plutôt dans la zone dépourvue de GR (Fig. 11 B).

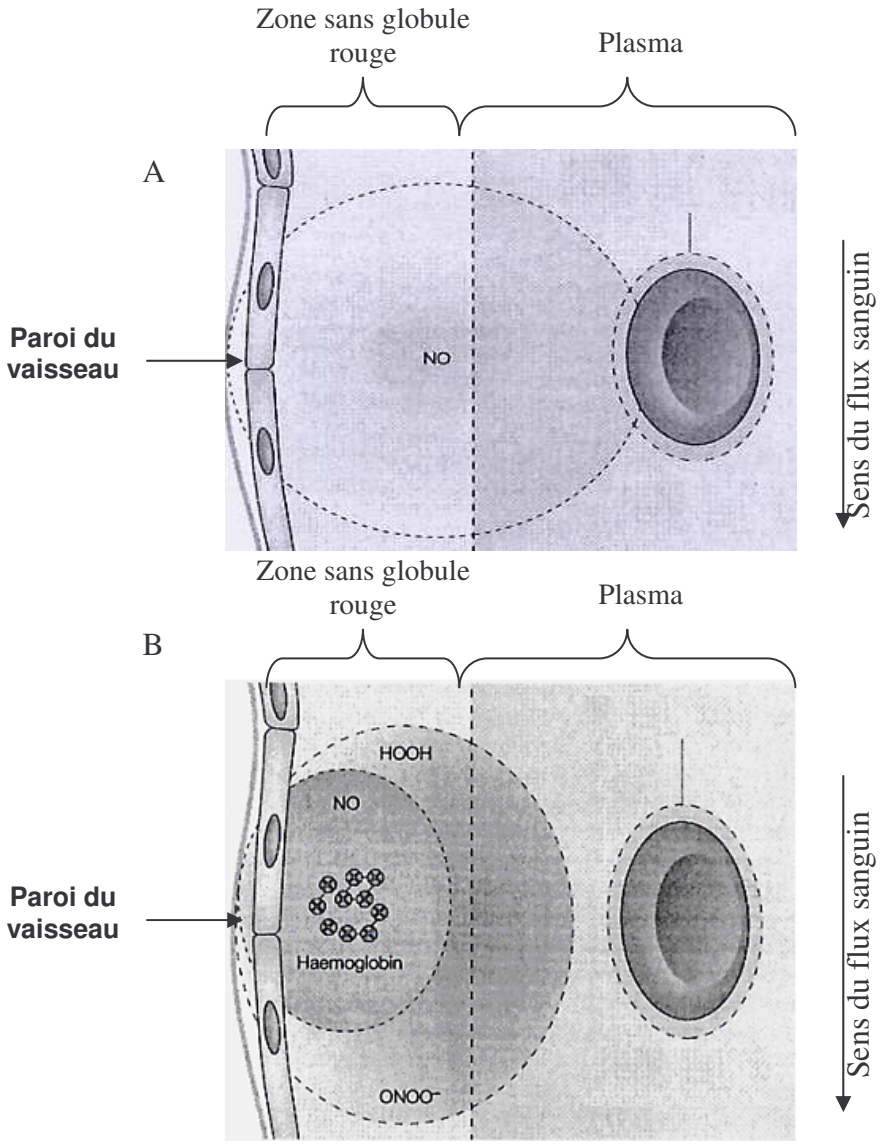


Fig. 11 : Influence des HBOC sur la quantité de NO libre et sur l'état de vasoconstriction. A.) En conditions physiologiques normales ; B.) En présence d'HBOC (modifié d'après Alayash, 2004).

Les HBOC vont alors piéger NO (Fig. 12), induisant une déplétion de sa biodisponibilité et diminuant son activité vasodilatatrice. En réponse, une vasoconstriction, liée à l'injection de HBOC, est observée (Caron *et al.*, 2000). La constante de cette réaction est très élevée ($k = 8{,}9.10^{7} M^{-1}s^{-1}$) et similaire pour la majorité des HBOC. A quantité égale, les HBOC ont une affinité 500 fois plus forte pour NO que l'Hb contenue dans les GR (Alayash, 2004). De plus, NO peut réagir avec l'oxyHb pour former de la metHb et du nitrate (Fig. 12)

Réaction a	$Hb + NO \rightarrow HbNO$
Réaction b	$HbO_2 + NO \rightarrow metHb + NO^{3-}$

Fig. 12 : Réactions possibles entre l'Hb et NO. Réaction a : piégeage de NO par l'Hb ; réaction b : oxydation de l'oxyHb et metHb par NO.

- **l'hypoxie** : par un mécanisme inconnu, l'expression de la eNOS est modulée par la PO_2. Arnet et coll. mettent en évidence, sur des CE de bœufs soumises à une hypoxie, une augmentation de la production de NO et de la transcription de la eNOS (Arnet *et al*., 1996). Par ailleurs, en 2007, Vanin et coll. ont précisé que, même en cas d'anoxie, NO est produit. En effet, en absence d'O_2, la eNOS produirait tout de même NO, non plus à partir d'arginine, mais à partir de nitrite (Vanin *et al*., 2006). En absence d'O_2, la eNOS endosserait alors un rôle de nitrite réductase conduisant à la production de NO.

L'état d'oxydation de l'Hb peut aussi influer sur la cytotoxicité

La cytotoxicité :

L'Hb est une protéine qui présente une activité enzymatique catalase et peroxydase. La cytotoxicité engendrée par tous les types de peroxydase est induite par la triade peroxydase, H_2O_2 généré par les NADH oxydases et les ions chlorures endogènes. Cette triade provoque la formation d'acide hypochlorique (HOCl) qui attaque la cellule dans une série de réactions non-enzymatiques responsables de sa destruction. Comme l'Hb est une peroxydase (Inada *et al*., 1961), elle peut initier le même genre de réactions. La cytotoxycité initiée par l'Hb peut aller de la simple blessure à la mort cellulaire.

De plus, il a été démontré que l'Hb libre ou oxydée pouvait perturber le comportement de la cellule endothéliale et changer l'état d'oxydation des lipides, du glutathion et la production d'H_2O_2, de lactate et de calcium.

L'autre grande catégorie des réactions engendrées par l'administration d'HBOC est l'inflammation.

III.4.5.2. L'inflammation :

Le phénomène inflammatoire que nous développerons ici ne concernera que la CE, nous n'évoquerons pas les cellules sanguines impliquées (leucocytes, monocytes,…).

L'inflammation provoque la synthèse et la libération, par les CE, de cytokines comme les interleukines 6 et 8 (Il-6, Il-8). L'Il-6 est une cytokine nécessaire à l'initiation de la réponse inflammatoire. Ces cytokines activent les cellules sanguines qui, à leur tour, vont potentialiser l'activation des CE. L'activation des CE se manifestera par l'expression, au niveau membranaire, de molécules d'adhésion induisant et favorisant la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium (fig. 13).

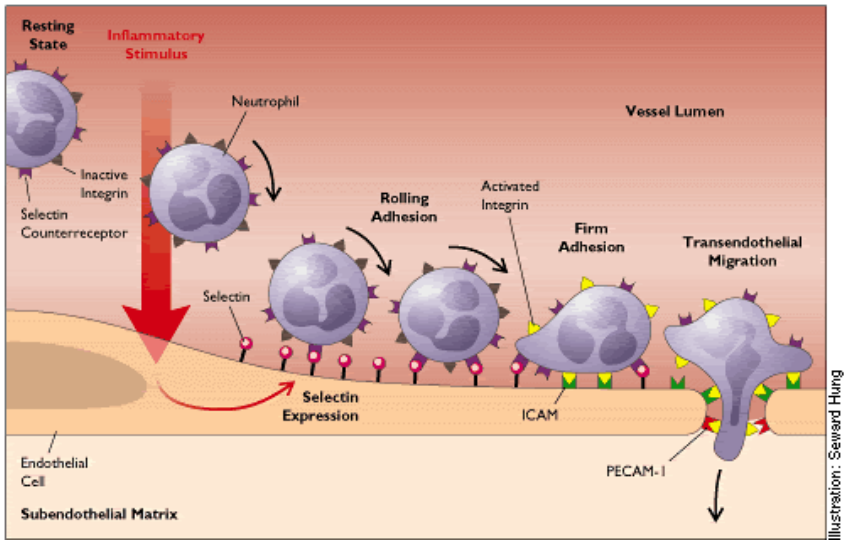


Fig. 13 : Représentation schématique des différentes étapes de la transmigration des polynucléaires à travers l'endothélium. (http://employees.csbsju.edu/HJAKUBOWSKI/classes/ch331/cho/complexoligosacch.htm)

Deux grandes familles composent ces molécules d'adhésion, les sélectines et la superfamille des immunoglobulines.

Les sélectines :

Structure : les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires, principalement impliquées dans les phases d'adhérence et de *rolling* des leucocytes. Il en existe trois types :

- la E-sélectine (ou CD62 E ou ELAM1) sur les cellules endothéliales.
- la L-sélectine (ou CD62 L) sur les leucocytes.
- la P-sélectine (ou CD62P ou GMP 140) sur les cellules endothéliales et plaquettes.

Expression cellulaire et régulation : la E-sélectine n'est synthétisée et exprimée sur les cellules endothéliales qu'après activation de ces dernières par des stimuli tels que l'$IL_1\beta$, le TNFα ou le LPS. Ces principaux stimuli agissent par régulation au niveau transcriptionnel (Carlos *et al*., 1994), par activation du facteur NF-κB (Rahman *et al*., 1998) et induisent alors la synthèse *de novo* d'ARNm et de protéines. Il existe également d'autres stimuli, tels que la thrombine ou les radicaux oxygénés. La E-sélectine a un rôle activateur sur les neutrophiles en induisant la synthèse des β2-intégrines (Carlos *et al*., 1994 ; Crockett *et al*., 1998).

Nous avons résumé les caractéristiques de chaque type de sélectine dans le tableau III.

Tableau III : Présentation des caractéristiques des 3 types de sélectines.

Type	E-Sélectine	P-Sélectine	L-Sélectine
Structure	Antigène de 115 kDa • Domaine cytoplasmique riche en résidus tyrosine ⇨ internalisation protéine transmembranaire ⇨courte ½ vie à la surface de la cellule	Noyau protéique de 86 kDa avec 12 sites de N-glycosylation ⇨ protéine de 122 kDa maximum • Domaine cytoplasmique riche en résidus sérine, tyrosine, thréonine ⇨sites de phosphorylation • Protéine riche en cystéine	Noyau protéique de 37 kDa avec 8 sites de N-glycosylation L-selectine de PM ≠ selon le type de cellule : • 75 kDa sur lymphocytes • 95 à 105 kDa sur neutrophiles • 110 kDa sur monocytes
Expression	Cellule endothéliale Synthèse *de novo* après activation	• Cellule endothéliale (corps de Weibel Palade) • Plaquettes (granule α) Synthèse constitutive et stockage intracellulaire Expression membranaire seulement après activation	• Lymphocytes • Polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles. • Monocytes Expression constitutive au niveau des microvilli Clivage endoprotéolytique après activation cellulaire
Stimuli	IL-1 ; TNFα ; Radicaux libres oxygénés; LPS ; Substance P	Histamine ; Thrombine ; Radicaux libres oxygénés ; Leucotriènes ; Fragments du complément	
Fonction	Adhésion leucocytes/endothélium	Adhésion - leucocytes/endothélium - plaquettes/leucocytes	Adhésion leucocytes/endothélium activé
Ligands	•Lactosamines sialylées fucosylées : sLe^x et sLe^a •L-sélectine •PSGL-1 (leucocytes) •ESL-1	• Lactosamines sialylées fucosylées : sLe^x et sLe^a •L-sélectine •PSGL-1 (leucocytes) •Polysaccharides sulfatés (héparine, fucoïdane)	•Glycoprotéines sulfatées -Sgp^{50} (GlyCAM-1) sur tissus lymphoïdes -Sgp^{90}(CD 34) sur C.E. • MadCAM-1

La superfamille des immunoglobulines :

Les protéines de la superfamille des immunoglobulines sont des protéines de surface de la cellule qui peuvent être impliquées dans la reconnaissance d'antigènes (type C1) ou dans la fixation du complément et dans l'adhésion cellulaire (type C2) (Carlos *et al*., 1994). Elles interviennent essentiellement dans les étapes d'adhésion ferme et de transmigration (Cotran *et al*., 1998).

Structure et expression : les protéines de type C2 ont pour caractéristique structurale commune un nombre variable de domaines « Ig-like » extracellulaires avec des séquences riches en cystéine qui permettent la formation de ponts disulfures stabilisant les feuillets β de la structure tertiaire (Carlos *et al*., 1994). Cinq membres de cette famille, exprimés par les CE, interviennent dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium :

- ICAM-1 (CD54) ou Intercellular adhesion molecule- 1
- ICAM-2 (CD102) ou Intercellular adhesion molecule- 2
- VCAM-1 (CD106) ou Vascular cell adhesion molecule- 1
- PECAM-1 (CD31) ou Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
- MadCAM-1 ou mucosal addressin.

Expression et régulation : l'expression de ces immunoglobulines peut être constitutive, comme c'est le cas pour ICAM-2 ou PECAM-1, ou induite par différents stimuli, comme pour ICAM-1 et VCAM-1. Le principal stimulus, lors de l'inflammation, est la libération de cytokines, telles que IL-$_1$ et TNFα. Ces cytokines agissent au niveau transcriptionnel (activation des facteurs de transcription tels que NF-κB, AP-$_2$) et induisent alors la synthèse *de novo* d'ARNm et de protéines de ICAM-1 et VCAM-1 (Carlos *et al*., 1994 ; Cotran *et al*., 1998). Cependant, l'expression de VCAM-1 semble être induite par ICAM-1 (Lawson *et al*., 1999). Il existe également d'autres stimuli présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Présentation des caractéristiques de différentes protéines de la superfamille de Ig.

Type	ICAM-1 (CD54)	ICAM-2 (CD102)	VCAM-1 (CD106)	PECAM-1
Structure	• noyau protéique de 55 kDa avec 5 domaines Ig-like • 8 sites possibles de N-glycosylation ⇒ protéine de 76 à 114 kDa •région intracytoplasmique riche en lysine et arginine en connexion avec les protéines du cytosquelette	• noyau protéique de 29 kDa avec 2 domaines Ig-like • 6 sites possibles de N-glycosylation ⇒ protéine de 46 kDa si tous occupés	• noyau protéique de 81 kDa avec 7 domaines Ig-like • 7 sites possibles de N-glycosylation ⇒ protéine de 110 kDa	• noyau protéique de 80 kDa avec 6 domaines Ig-like • 9 sites possibles de N-glycosylation ⇒ protéine de 130 kDa
Expression	• endothélium • leucocytes • fibroblastes • épithélium	• endothélium • leucocytes	• endothélium	• cellules endothéliales • plaquettes • monocytes • neutrophiles
Mode d'expression	• basale, faible, sur toute la surface de la cellule endothéliale • surexpression lors de l'activation endothéliale : - par stimuli inflammatoires (IL_1 et TNFα) - par endotoxines bactériennes et LPS	• constitutive non régulée par des cytokines • surface des cellules endothéliales	• induite par IL_1 et TNF α	•constitutive •expression localisée au niveau des jonctions intercellulaires
Fonctions	Adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium et transmigration	Action stimulatrice des leucocytes	Adhésion leucocytes, monocytes, éosinophiles	Recirculation des lymphocytes
Ligand(s)	• CD11a/CD18 • CD11b/CD18	• CD11a/CD18	• VLA-4 • intégrine α4β7	

L'inflammation induite par l'Hb peut aussi stimuler l'expression d'autres protéines, telles que la NO Synthase inductible (iNOS).

La NO Synthase inductible :

La iNOS est induite par les cytokines inflammatoires (Il-1, TNF-α et LPS) ou la contrainte de cisaillement. Elle est calcium indépendante. Elle produit de bien plus grandes quantités de NO (micromoles) qui, de fait, sont bactéricides comparées à la production en NO de la eNOS (picomoles). La iNOS serait aussi impliquée dans la S-nitrosylation de l'Hb.

Dans une troisième partie, la revue aborde les possibilités que l'Hb a d'interagir physiquement (directement) avec l'endothélium. Elle peut traverser l'endothélium par les jonctions membranaires (Dull *et al*., 2004) ou directement entrer dans la CE (Faivre-Fiorina *et al*., 1999).

IV. Hypoxie cellulaire et tissulaire :

IV.1. Définition et causes de l'hypoxie :

En condition normale (normoxie), la quantité d'O_2 délivrée aux tissus est suffisante pour les besoins cellulaires. Ainsi, la pression en dioxygène (PO_2) dans le sang artériel et dans les tissus est respectivement de 150 et 40 mmHg (Faller, 1999). Au contraire, en cas d'hypoxie, la quantité d'O_2 transportée et délivrée est insuffisante par rapport aux besoins cellulaires.

Les causes d'hypoxie sont nombreuses. Dix sortes d'hypoxie sont répertoriées (Tableau V, Fig. 14) mais deux grands types sont à retenir pour notre étude :

- **L'hypoxie anémique** : due aux dommages du métabolisme de l'O_2 (baisse du nombre de GR).
- **L'hypoxie ischémique** : consécutive à une insuffisance circulatoire dans une zone tissulaire ou un organe.

L'hypoxie cause d'importants troubles physiologiques et cellulaires à divers niveaux de l'organisme. En effet, un choc hémorragique de quelque nature qu'il soit, correspond à une insuffisance circulatoire aiguë entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques et viscéraux consécutifs à une réduction aiguë de la masse sanguine.

Cette diminution de la masse sanguine va entraîner :

- une diminution du transport en oxygène,
- une diminution, du fait de l'hypovolémie résultante, de la pression de remplissage vasculaire qui va entraîner une chute du débit cardiaque.

Ces deux mécanismes vont ainsi entraîner une hypoxie tissulaire.

Tableau V : Présentation des différents types d'hypoxie.

Hypoxies hypoxémiques Types I à V	Hypoxies normoxémiques Types VI à X
Type I **Déficit en oxygène dans l'air inspiré (passage en haute altitude)** ***Type II*** **Hypoventilation alvéolaire globale (Crise d'asthme sévère)** ***Type III*** **Trouble du rapport ventilation/perfusion (Embolie pulmonaire)** ***Type IV*** **Trouble de diffusion alvéolo-capillaire (Œdème pulmonaire)** ***Type V*** **Court-circuit veino-artériel (shunt droit-gauche) (Cardiopathies cyanogènes)**	***Type VI*** **Trouble du transport de l'oxygène (Hémoglobine) (Anémie, Intoxication au CO)** ***Type VII*** **Insuffisances circulatoires (Collapsus cardiovasculaire)** ***Type VIII*** **Trouble de diffusion au niveau interstitiel (Œdème interstitiel)** ***Type IX*** **Hypoxie histotoxique (Intoxication au cyanure)** ***Type X*** **Surconsommation cellulaire (Exercice musculaire intense)**

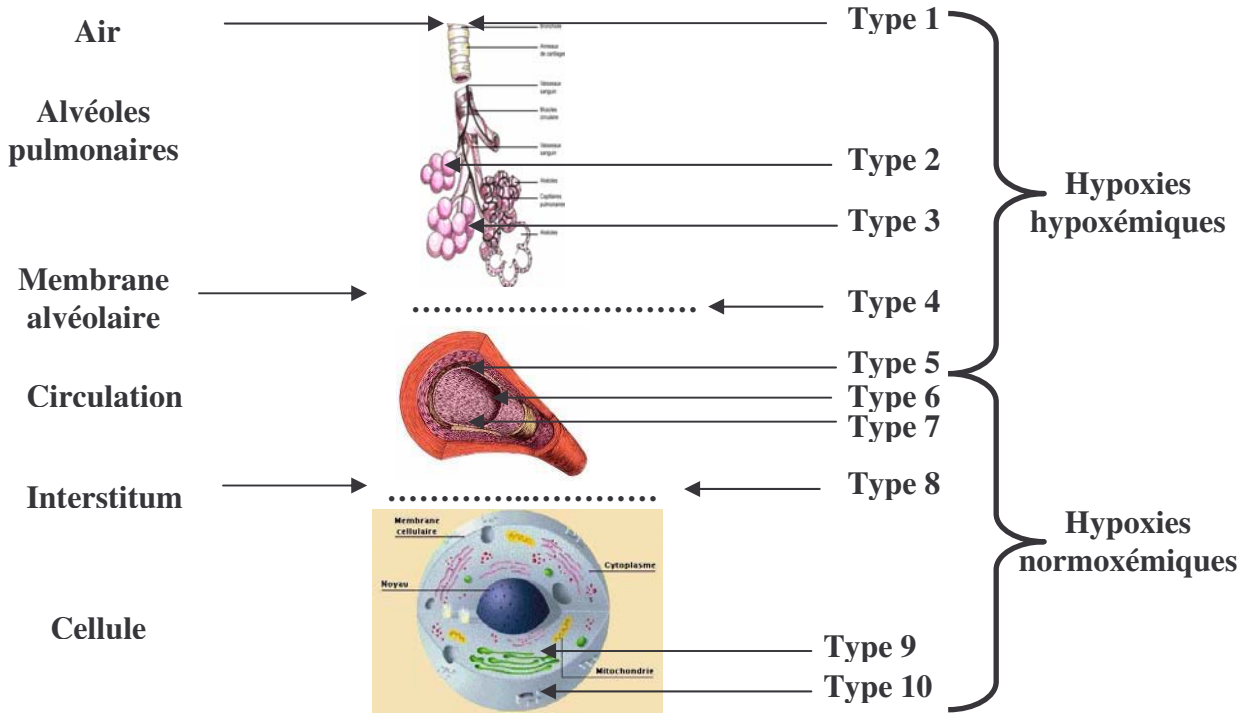


Fig. 14 : Localisation des différents types d'hypoxie au niveau physiologique

IV.2. Conséquences et adaptations physiologiques de l'hypoxie :

Les vaisseaux se dilatent, permettant du même coup aux tissus périphériques d'être davantage vascularisés, et donc mieux oxygénés. Cette vasodilatation se produit immédiatement après le début de l'hypoxie et semblerait se maintenir pendant plusieurs heures (Michiels *et al*., 2000). Le mécanisme moléculaire de la vasodilatation reste actuellement peu clair. Cependant, il semblerait que l'activation des canaux potassiques, la baisse d'ATP, l'acidification du milieu intracellulaire, la baisse de la sécrétion d'éléments vasoconstricteurs (endothéline) et l'augmentation de la sécrétion de puissants vasodilatateurs (NO) jouent un rôle clé dans le phénomène de vasodilatation des vaisseaux, *via* la relaxation des cellules musculaires lisses (CML) (Min *et al*., 2006).

Ainsi, parce que les CE vasculaires constituent la première couche de cellules en contact avec le sang, elles doivent réagir rapidement à toute variation de la PO_2 ou à tout autre stress oxydatif susceptible d'induire une inflammation (Michiels *et al*., 2000).

V. Hypoxie et métabolisme cellulaire endothélial vasculaire :

A la suite d'une hypoxie et parallèlement à la vasodilatation des vaisseaux, un stress oxydatif se met en place et la CE passe en métabolisme anaérobie.

V.1. Fermentation lactique et glycolyse anaérobie :

En condition normale (Fig. 15 A) (normoxie), le pyruvate produit par la glycolyse, intègre le cycle de Krebs pour participer aux réactions d'oxydation de la chaîne respiratoire et produire de l'énergie (ATP).

Lors d'une hypoxie (Fig. 15 B), le pyruvate ne peut intégrer le cycle de Krebs car le Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit (NADH) ne peut plus être régénéré en NAD^+ du fait du manque d'O_2. La production d'énergie nécessaire à la cellule s'effectue alors par fermentation. Le pyruvate est transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). Cette réaction permet en même temps de régénérer le NAD^+ et ainsi de poursuivre la transformation du glucose en pyruvate : c'est la voie de la glycolyse anaérobie. C'est donc l'état «d'oxydo-réduction» de la cellule qui détermine laquelle de ces deux voies sera utilisée.

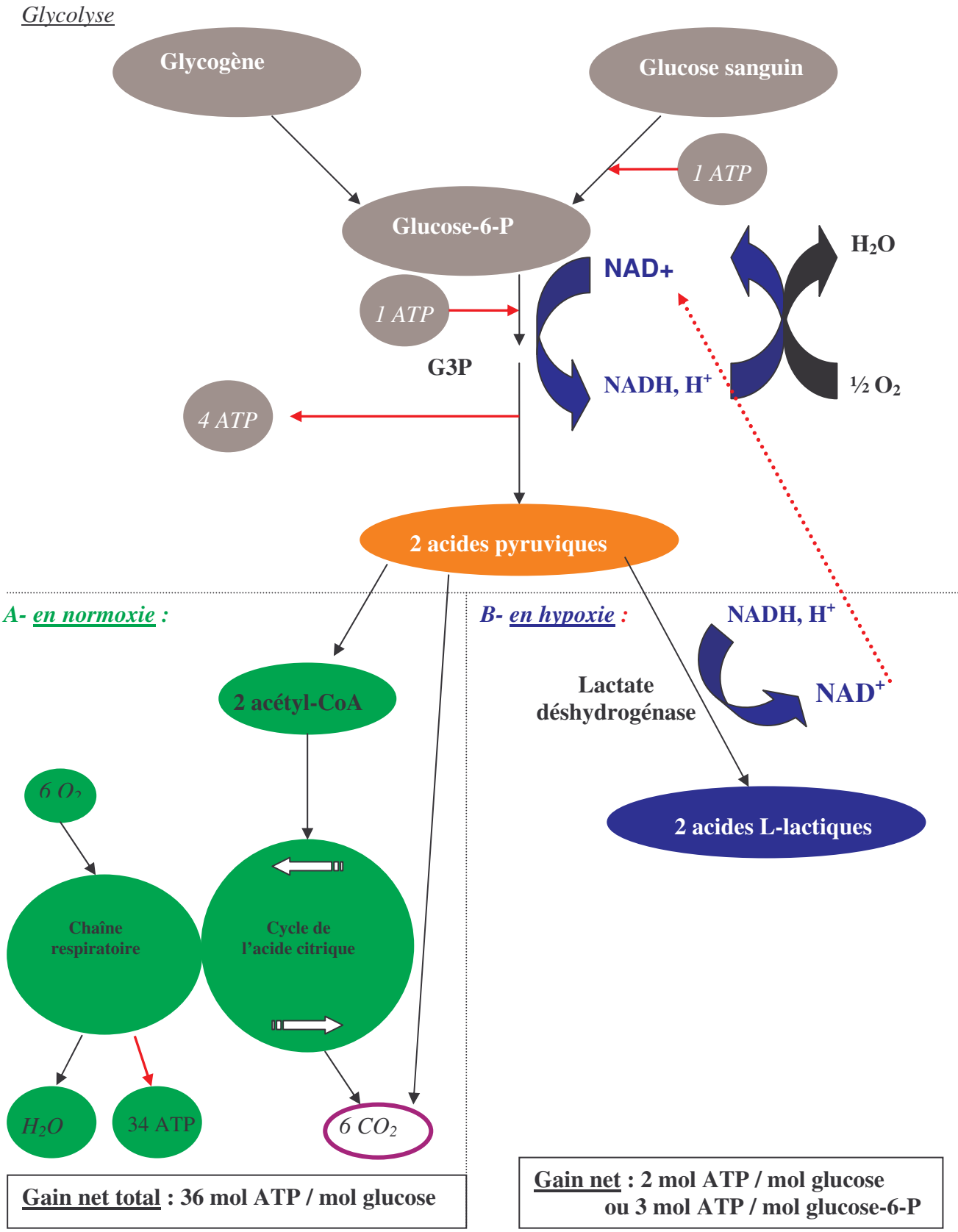


Fig. 15 : Mécanisme de production d'ATP. A : Phosphorylation oxydative se produisant en condition de normoxie. B : Fermentation lactique se produisant en condition d'hypoxie. (modifié d'après Atlas de physiologie, Flammarion)

Cependant, il est important de souligner que ce processus diminue la quantité d'énergie produite par molécule de glucose oxydée par rapport au métabolisme aérobie : en effet, la glycolyse anaérobie s'accompagne de la formation de 2 adénosines triphosphates (ATP) contre 36 produits par la respiration aérobie.

V.2. Mitochondrie et espèces réactives à l'oxygène :

En absence d'O_2, le pyruvate issu de la glycolyse est transformé en lactate. Ainsi, dans la mitochondrie, le cycle de Krebs et le transport des électrons sont bloqués.

• En condition normale, l'O_2 diffuse des GR aux CE. L'O_2 est alors utilisé par la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Fig. 16) afin de produire de l'ATP.

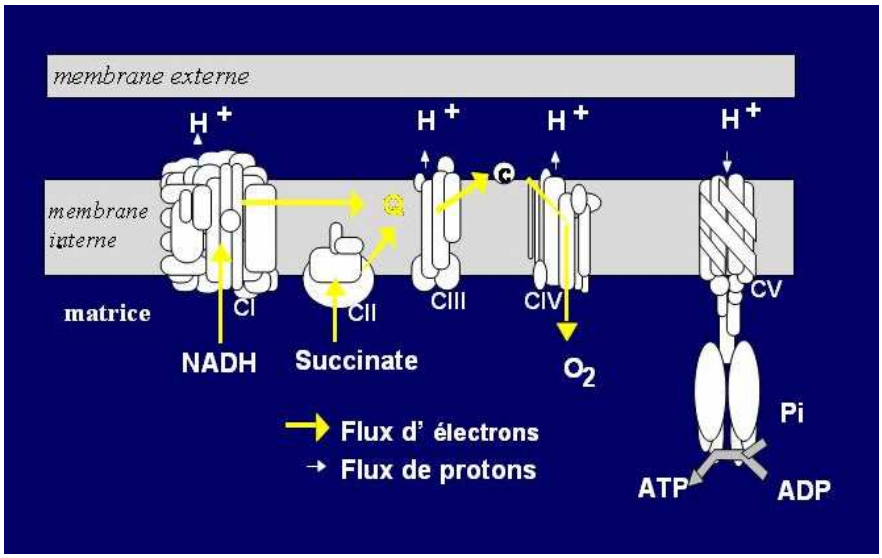


Fig. 16 : Chaîne respiratoire présente dans la membrane de la mitochondrie. En condition normale, tous les électrons sont acheminés jusqu'au complexe IV (cytochrome oxydase) où ils sont alors utilisés pour réduire l'O_2 de façon tétravalente. Quand la chaîne électronique est rompue (c'est le cas lors de l'hypoxie), il y a fuite d'électrons et l'O_2 est réduit de façon monoélectronique et des Espèces Réactives à l'Oxygène (ERO) sont formés. (d'après http://college-genetique.igh.cnrs.fr)

Au cours de ce processus, l'O_2 subit une réduction tétravalente :

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \longrightarrow 2H_2O.$$

Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase présente dans le complexe IV de la mitochondrie. Cependant, il arrive que ce complexe laisse « fuir » une petite portion d'électrons réduisant partiellement l'O_2 (réduction mono- ou bi-électronique), ce qui conduit à la formation de radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). De même, la NADH déshydrogénase du complexe I de la chaîne respiratoire peut également produire des

$O_2^{\bullet-}$. Très nocives pour la cellule (mutation de l'ADN, dénaturation des protéines, peroxydation lipidique), ces espèces réactives à l'oxygène (ERO) sont directement neutralisées grâce à un système anti-oxydant très efficace composé, entre autres, de la manganèse superoxyde dismutase (Mn SOD) et de la glutathion peroxydase. Chez un individu sain, la production d'ERO reste donc limitée et maîtrisée.

- En cas d'hypoxie, la quantité d'O_2 délivrée aux cellules est réduite. La chaîne respiratoire fonctionne au ralenti et la production d'ERO est très faible. Après 60 min d'hypoxie, tous les complexes de la chaîne respiratoire montrent une réduction de leur activité accompagnée de dommages structurels. D'ailleurs, les complexes I (NADH déshydrogénase) et III (CoQH2) semblent plus sensibles à ces altérations (Siemionow *et al*., 2004). Ainsi, lors de la reperfusion qui conduit à une réintroduction de l'O_2, la chaîne mitochondriale de transport d'électrons endommagée laisse fuir des électrons qui, dès lors, peuvent réagir avec l'O_2 pour générer des ERO (Siemionow *et al*., 2004). De plus, lorsque la PO_2 est basse, la capacité du cytochrome C à capter l'O_2 est réduite, conduisant à l'altération du potentiel redox de la cellule, à l'accumulation d'électrons, et donc, à la formation d'ERO par fuite d'électrons (Edmunds *et al*., 2003). Par ailleurs, durant l'hypoxie, l'activité de certaines enzymes mitochondriales impliquées dans la lutte contre le stress oxydant, diminue (Powell *et al*., 2003).

Par conséquent, au cours du processus de reperfusion, la production de ERO déborde le système anti-oxydant des CE ; ce qui se traduit par une quantité accrue de ERO ($O_2^{\bullet-}$et H_2O_2) dans la circulation sanguine. La réoxygénation d'un individu hypoxique conduit donc à la mise en place d'un stress oxydant aigu, délétère pour les CE. C'est ce que Cerra et coll. nomment «la blessure par reperfusion» (Cerra *et al*., 1975).

V.3. Vasomotricité et NO :

Au niveau des vaisseaux, sous l'effet de facteurs physiques ou chimiques, une vasodilatation, conséquence de la relaxation des CML *via* le NO produit par les CE vasculaires, est observée.

Régulation de la eNOS : comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de la eNOS peut être modulée par l'hypoxie.

VI. Hypoxie et inflammation :

Les CE sont sensibles au stress oxydatif (Harrison *et al*., 2006). Ce stress aboutit à l'acquisition pour les CE d'un phénotype pro-inflammatoire et à une modification des interactions entre endothélium et leucocytes *via* les molécules d'adhésion.

VI.1. Les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales :

Impact de l'hypoxie sur ICAM-1, E-sélectine :

Le stress induit par la production d'ERO provoque au niveau des CE, l'attraction des leucocytes par chimiotactisme (Welbourn *et al*., 1991). Le recrutement des leucocytes le long de l'endothélium intact se produit grâce à l'activation des CE, par le stress oxydatif, qui expriment alors ICAM-1. En effet, l'expression de ICAM-1 et de E-sélectine est augmentée par la présence de cytokines (IL1, IFNγ et TNFα) et d'ERO (Wagener *et al*., 1997). Yoshida et coll. ont montré, qu'à court terme, une hypoxie-réoxygénation induit l'augmentation de l'adhésion des leucocytes aux CE. Par ailleurs, cette adhésion peut être bloquée par des anticorps dirigés contre ICAM-1 (Yoshida *et al*., 1992). Ces données suggèrent donc une augmentation de l'expression de ICAM-1 suite à une hypoxie-réoxygénation conduisant au déclenchement de la réponse inflammatoire. Par ailleurs, d'autres études ont montré l'induction de la E-sélectine lors d'une hypoxie-réoxygénation de CE vasculaires (Carlos *et al*., 1994).

En ce qui concerne les HBOC, ils constituent une entité exogène susceptible d'induire l'inflammation au niveau de l'endothélium, c'est à dire l'induction de l'expression d'ICAM-1 et E-sélectine.

Ainsi, dans la perspective finale de mesurer l'impact d'HBOC sur les CE, nous avons choisi de mesurer le potentiel inflammatoire de ces substituts sur des CE soumises à une hypoxie-réoxygénation, au travers de l'étude de l'expression de ces deux molécules d'adhésion.

VI.2. L'hème oxygénase-1 :

Les rôles et la structure de l'HO-1 ont été préalablement décrits (chap. III.4.5.1.). En ce qui nous concerne, l'HO-1 est induite durant l'hypoxie (Motterlini *et al*., 2000). Elle a pour rôle de dégrader l'hème libre. Or, pendant une hémorragie interne, souvent associé à un choc ischémique, il se produit une lyse des globules rouges provoquant une libération d'hème dans

le sang. Cet hème libre est alors dégradé par HO-1, ce qui suppose une augmentation de son activité ou de sa synthèse.

De plus, la biliverdine produite lors de la dégradation de l'hème est transformée en bilirubine et en CO par la biliverdine réductase. La bilirubine joue alors le rôle d'antioxydant tandis que le CO intervient sur l'état d'inflammation et de vasomotricité des vaisseaux grâce à ses propriétés vasodilatatrice et anti-inflammatoire (Kourembanas, 2002). Par ailleurs, dans la phase précoce de l'hypoxie, CO aurait pour rôle d'inhiber la transcription de gènes codant pour des agents vasoconstricteurs et mitogènes des CML, empêchant ainsi la vasoconstriction des vaisseaux (Kourembanas, 2002). Dans une phase plus tardive de l'hypoxie, CO serait également responsable de la transcription de facteurs de croissance et de facteurs responsables du remodelage de la paroi vasculaire (Kourembanas, 2002).

Enfin, certains substituts sanguins utilisés pour pallier l'hypoxie sont constitués d'Hb libre non encapsulée, donc susceptible d'être dégradée par HO-1. De plus, une injection de ce type de substituts augmente de façon drastique la quantité d'Hb libre dans la circulation, donc sature les systèmes de détoxification.

But de l'étude :

Au vu de la littérature, deux phénomènes nous semblent majeurs dans l'étude de l'impact de substituts sanguins sur les cellules endothéliales. La compensation volémique d'un choc hémorragique important se traduit par un retour des contraintes de cisaillement imposé par la restauration du flux sanguin. Le premier but de ce travail sera donc de mettre en place un protocole d'étude de l'interaction cellules endothéliales/substituts sanguins sous contraintes de cisaillement. Puisque ces contraintes sont responsables entre autre, d'une inflammation, d'une vasoconstriction et d'un stress oxydatif, nous nous intéresserons à des marqueurs spécifiques comme l'expression d'ICAM-1 et de la E-sélectine (inflammation), de la eNOS et du nitrite/nitrate (vasomotricité), de l'HO-1 et de l'H_2O_2 (stress oxydatif). Puis, nous vérifierons, si la présence d'hémoglobine les modifie ce qui à notre connaissance n'a jamais été étudié.

Ensuite, la levée de l'hypoxie lors de la réoxygénation des cellules endothéliales s'accompagne d'un stress oxydatif intense qui peut être potentialisé par l'injection de substituts sanguins à base d'hémoglobine. Dans un premier temps, nous déterminerons quels seraient les temps de culture des cellules endothéliales sous hypoxie propices à notre étude et permettant aux cellules d'exprimer les marqueurs spécifiques de cet état. Puis nous compléterons ce travail original d'hypoxie par l'étude du même panel de marqueurs que celui utilisé pour le travail sur le cisaillement tout en y rajoutant le lactate, marqueur majeur de l'hypoxie.

Dans une troisième et dernière partie, nous évaluerons la cytotoxicité d'hémoglobines de nouvelle génération, comme la PEG-Hb (M. Perrella, Université de Milan, Italie) et l'hémoglobine octamérique (V. Baudin, INSERM U779, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France). Les marqueurs d'apoptose-nécrose seront recherchés et l'activité métabolique des cellules endothéliales, après incubation avec ces hémoglobines, sera mesurée. Ainsi nous vérifierons que ces hémoglobines de nouvelle génération répondent au cahier des charges avant d'engager des études *in vitro* plus approfondies.

Matériels & Méthodes

I. Solutions utilisées :

- Tampon de lavage « Hank's Balanced Salts Solution » (HBSS) (Sigma, France), (Annexe 1.A).
- Trypsine porcine (Gibco, France) à 0,5 g/mL diluée dans de l'HBSS pour des concentrations finales de 0,25, 0,125 et 0,05 g/mL utilisées pour le détachement des cellules.
- Milieu de culture à 20 ou 10% (v/v) de sérum humain AB (Annexe 1.B).
- PBS (phosphate buffered saline) ou tampon phosphate (Annexe 1.C).

II Choix des cellules et des solutions testées :

II.1 Choix des cellules :

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler sur des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine, ou HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Ces cellules sont une primo-culture qui représente un *pool* de cellules différent à chaque cordon ombilical. Les substituts érythrocytaires seront à terme injectés dans des individus tous différents, donc nous nous sommes naturellement dirigés vers une primo-culture. Comme expliqué dans l'introduction (chapitre I.3.), la veine ombilicale transporte du sang oxygéné, en comparaison avec les cellules endothéliales des artères ombilicales, donc les HUVEC sont en contact permanent avec du sang oxygéné. Le but ultime d'un substitut érythrocytaire étant de réoxygéner des tissus ischémiés, ceux-ci seront acheminés par des vaisseaux transporteurs d'oxygène (artère), donc en contact avec les cellules endothéliales de ces vaisseaux. Nous nous sommes donc penchés sur des cellules endothéliales de veine ombilicale car elles vivent dans des conditions d'oxygénation plus élevées que leurs homologues artérielles. De plus, étant donné que nous avons à faire à une primo-culture, les cellules provenant de cordons distincts sont différentes, ce qui se rapproche le plus des cas cliniques où les patients sont tous différents.

Des HUVEC en passage 2 (P_2) uniquement ont été utilisées afin d'éviter toute modification phénotypique et pour permettre une comparaison des résultats entre eux. En effet, au-delà de P_2, les cellules se dédifférencient et perdent leurs caractéristiques de cellules endothéliales : expression du facteur Von Willebrand et changement de la forme cellulaire.

En conclusion, les HUVEC semblent être un bon modèle d'étude du fait de leur variabilité et de leur contact permanent avec l'oxygène.

II.2. Solutions testées :

Nous avons eu l'opportunité de tester cinq types de substituts à base d'Hb, en quantités et en concentration différentes. Pour ces raisons, le choix des substituts testés dépendra du protocole de l'étude en question (selon le volume nécessaire), puisque notre travail se divise en deux grandes parties :

- Etude en condition dynamique ou en hypoxie
- Evaluation de nouvelles hémoglobines

Toutes les caractéristiques physicochimiques des substituts testés sont résumées dans le tableau VI.

Ces solutions ont été comparées à un plasma expander, c'est-à-dire un substitut plasmatique non transporteur d'oxygène : le Voluven® (Fresenius Kabi, France). Le Voluven® est un hydroxyéthylamidon (HEA) dont la poids moléculaire (PM) est de 130 kDa (pH 4 à 5,5, Osmolarité = 308 mOsm/L).

Une concentration finale de 16 g/L a été choisie pour tester les différentes solutions d'Hb *in vitro* : cela correspond approximativement, chez l'homme, à la concentration plasmatique en hémoglobine injectée après un choc isovolémique de 20% du volume sanguin.

Tableau VI : Caractéristiques physicochimiques des différentes Hb testées. (N.D. : non déterminé)

Solution d'Hb	Hb DEX-BTC	Oxyglobin®	αα-Hb	Octamère
Concentration	80(g/L)	130(g/L)	80(g/L)	1,24 mM
Masse moléculaire moyenne (kDa)	200	100	64	128
Distribution 32 kDa 64 kDa > 64 kDa > 500 kDa	 - < 5% > 90% < 5%	 - < 5% > 80% < 10%	 < 5% > 95% - -	 88 à 90%
P_{50}*	23	27	29,5	N.D.
Osmolarité (mOsm/L)	280	300	280	N.D.
pH	7,2	7,8	7,2	7,5
Endotoxines (UE/mL)	<0,5	< 0,05	< 0,25	N.D.

*P_{50} pression de demi saturation en O_2 de l'Hb mesurée à 37°C.

II.2.1. Etudes en conditions dynamiques et/ou études en hypoxie :

Le système de flux (décrit ci-après) utilisé dans cette étude est un grand consommateur de milieu de culture et donc de substitut érythrocytaire. Le premier critère de sélection des substituts étudiés a été leur disponibilité, en quantité suffisante, au laboratoire.

L'hémoglobine dextran-benzène-tétracarboxylate :

Le premier substitut auquel nous nous sommes intéressés est l'hémoglobine dextran-benzène-tétracarboxylate ou Hb-Dex-BTC.

Cette solution est composée d'Hb humaine conjuguée avec un polymère de dextran-benzène-tétracarboxylate (Dex-BTC) (Prouchayret *et al*., 1993). Ce polymère permet d'augmenter simultanément la P_{50}, en se substituant à la fonction du 2,3 DPG, jouant le rôle d'effecteur allostérique, et la demi-vie plasmatique de l'Hb grâce à l'augmentation de sa masse moléculaire. Ce conjugué est formulé dans une solution de saccharose (100 g/L) et NaCl (4,5 g/L). Il a été élaboré par le laboratoire de chimie physique macromoléculaire de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC, Nancy, France) en collaboration avec le laboratoire d'Hématologie-Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, puis développé par Pasteur-Mérieux sérums & vaccins (Marcy-l'Etoile, France).

L'Oxyglobin® :

L'Oxyglobin®, aussi appelée hémoglobine glutamer-200, est un substitut érythrocytaire commercialisé par Biopure (Biopure Corporation, Cambridge, MA, USA) dans le domaine vétérinaire. Elle est utilisée pour compenser une anémie chez le chien. Elle est formulée à base d'Hb bovine polymérisée avec du glutaraldéhyde et solubilisée dans une solution de Ringer lactate modifié, pour une concentration finale de 130 g/L. La solution d'Oxyglobin® que nous avons testée nous a été gracieusement fournie par le Dr A.I.Alayash (Center for Biologics Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, Bethesda, MD., USA)

L'αα-Hémoglobine :

Cette solution est élaborée à base d'Hb humaine pontée intramoléculairement sous sa forme désoxygénée entre les résidus α^{99}Lys par un agent bi-fonctionnel, le dibromo-salicylfumarate. Ce pontage assure une stabilisation du tétramère et une réduction de l'affinité pour l'oxygène. Cette solution, formulée dans du Ringer lactate, a été initialement élaborée par l'US Army (Washington, D.C., USA) puis développée par Baxter Healthcare Corporation

(Round Lake, IL., USA) sous le nom d'HemAssist^{TM}. A cause des faibles quantités dont nous disposions au moment des expériences, seul l'impact de l'hypoxie a pu être envisagé avec ce substitut. De plus, ce composé étant étudié depuis quelques années déjà, nous l'avons utilisé comme témoin pour l'étude de nouveaux substituts. La solution d' αα-Hémoglobine que nous avons testée dans notre étude nous a été gracieusement fournie par le Dr A.I.Alayash (Center for Biologics Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, Bethesda, MD., USA)

II.2.2. Evaluation de la cytotoxicité de nouvelles hémoglobines :

L'hémoglobine octamérique :

L'architecture de l'octamère s'inspire d'un mutant naturel de l'hémoglobine A : l'Hb Ta-Li (Blackwell *et al*., 1971). Ce mutant contient une cystéine à la place d'une glycine en position 83 sur la chaîne β. La présence de cette cystéine permet la formation d'un pont disulfurre. L'unité INSERM U473 (Kremlin-bicêtre, Paris, France) a créé ce mutant par génie génétique, en remplaçant la glycine 83 de la sous-unité β par une cystéine qui permet la formation de deux ponts disulfures par octamère (Vasseur-Godbillon *et al*., 2006). La protéine résultante, l'octamère, a été exprimée chez *E. coli*. Elle se présente sous forme d'une solution à 1,24 mM en hème dans du Ringer (soit environ 80 g/L en tétramère).

L'hémoglobine pégylée :

L'hémoglobine pégylée (PEG-Hb) nous a été fournie par le Pr M. Perrella de l'Université de Milan dans le cadre du projet EBS.

Cette hémoglobine a été formulée en plusieurs étapes, et sa concentration diffère selon le lot utilisé. Le premier échantillon a été synthétisé par deux cycles de réactions sur de l'OxyHb liée à l'inositol hexaphosphate (IHP). Le premier cycle a été effectué avec du 2-iminothiolane (IMT) et du N-éthyl maléimide (NEM), le second cycle fait appel à l'IMT et au mPEG-MAL-5000.

Suite aux résultats des expériences menées dans notre étude, trois autres modes de synthèse ont été élaborés :

- un cycle de thiolation sur la déoxyHb et réaction avec le NEM suivi d'un autre cycle de thiolation et réaction avec le MAL-PEG (5,6 KDa).

➔ PEG-Hb S1

- un cycle de thiolation et réaction avec MAL-PEG

➔ PEG-Hb S2

- un cycle de thiolation, réaction du N-propionyl maléimide (NPA) suivi d'un cycle de thiolation et réaction avec le MAL-PEG.

➔ PEG-Hb S3

La PEG-Hb S1 contient 6,7 NEM et 7,7 PEG, il reste 2,7 sites SH libres. La PEG-Hb S2 ne contient pas de NEM et 5,6 PEG, il reste 2,9 sites SH libres. La PEG-Hb S3 contient 6,6 NPA et 7,5 PEG, il reste 3 sites SH libres.

Toutes ces PEG-Hb sont synthétisées en condition non stérile, il s'est donc avéré nécessaire de purifier les solutions sur une colonne retenant les endotoxines (Detoxygel^{TM} endotoxin removing gel, Pierce, USA). Le retrait des endotoxines a été effectué selon les instructions du fabricant. Les solutions de PEG-Hb ont été éluées dans leur tampon d'origine, c'est-à-dire le sérum physiologique (NaCl 9 g/L). Puis la concentration finale des solutions a été déterminée grâce à la méthode de Drabkin. Brièvement, 3 mL de solution de Drabkin (composition ci-dessous) sont incubés 30 min à température ambiante (TA) avec 10 µL de solution d'Hb à tester. En parallèle, une solution d'Hb de concentration connue, est incubée avec du Drabkin afin de servir d'étalon. L'Hb est oxydée en MetHb et peut ainsi réagir avec le cyanure pour former de la cyanmetHb stable et dosable à 540 nm. La concentration en Hb de la solution à tester est calculée par comparaison avec la solution de concentration connue.

Solution de Drabkin :

- 1 g de $NaHCO_3$
- 50 mg de KCN
- 200 mg $K_3(FeCN_6)$
- H_2O qsp 1 L

Transporteurs d'oxygène avancés (témoins) :

De par leur stade de développement, l'Oxyglobin®, l'Hb-Dex-BTC et l'αα-Hémoglobine, citées ci-dessus, ont été utilisées comme transporteur témoin. En effet, beaucoup d'études ont été menées jusqu'à présent sur ces solutions, et leurs principales caractéristiques ont été décrites.

III. Récupération des HUVEC :

III.1. Isolement des HUVEC :

L'extraction des cellules de la veine ombilicale doit être réalisée en conditions stériles, dans les 6 h qui suivent le prélèvement du cordon. Les cellules proviennent de cordons

ombilicaux de nouveaux-nés, nés à terme et par voie naturelle, à la Maternité Régionale de Nancy, après consentement de la mère.

La partie externe du cordon est nettoyée à l'éthanol à 75% afin d'éliminer les résidus de sang.

Un robinet muni d'un filtre de 0,22 µm est fixé à l'un des orifices de la veine, de façon à faciliter l'injection de substances stériles. A l'aide de ce dispositif, l'intérieur de la veine est lavé avec du tampon HBSS, puis soumis à un traitement à la trypsine à 0,25 mg/mL pendant 12 min à 37°C, permettant le décollement des cellules endothéliales.

La trypsine est ensuite neutralisée par addition de milieu de culture des HUVEC contenant du sérum humain inhibant la trypsine. La suspension cellulaire est alors récupérée, et la veine ombilicale lavée avec environ 30 mL d'HBSS afin de récupérer toutes les cellules. Le tout est centrifugé à 300 *g* pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé à l'aide de 10 mL d'HBSS puis centrifugé pendant 5 min à 300 *g*.

Finalement, le culot cellulaire est resuspendu dans 3 mL de milieu HUVEC et ensemencé dans des boîtes de culture de 25 cm² traitées de façon à faciliter l'adhésion des cellules sur le support plastique. La culture cellulaire est placée à l'étuve à 37°C alimentée avec 5 % de CO_2.

Le lendemain de l'extraction, les HUVEC P_0 sont lavées à l'HBSS afin d'éliminer les hématies en suspension dans le milieu.

III.2. Entretien des cultures :

Changement de milieu :

Le milieu de culture des HUVEC, à 20% de sérum, est changé tous les 2 jours pour conserver le spectre d'action des antibiotiques, et renouveler l'apport en facteurs de croissance et en nutriments.

Passage en subculture :

Lorsque les cellules sont à 90 % de confluence, elles sont repiquées dans 3 boîtes différentes. Les HUVECs sont lavées avec de l'HBSS, puis incubées 3 min à 37°C avec 5mL d'une solution de trypsine à 0,125 g/mL. Une fois le tapis cellulaire décollé de son support, la trypsine est neutralisée par ajout d'un volume équivalent de milieu de culture des HUVEC. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 *g* pendant 10 min et le culot est alors resuspendu dans 15 mL de milieu HUVEC et réparties dans 3 nouvelles boîtes de culture, ou comptées et ensemencées à la concentration désirée sur des lames recouvertes de gélatine à 1% (p/v).

Comptage cellulaire :

Après traitement à la trypsine, le nombre de cellules peut être déterminé par comptage après coloration au bleu de Trypan. La suspension cellulaire est diluée au demi dans du bleu de Trypan pour un volume final de 200 µL. Après homogénéisation, les deux chambres de la cellule de Thoma sont remplies par capillarité, en une seule fois.

Les cellules viables (non colorées) sont comptées (N_1 et N_2) au microscope optique. La concentration cellulaire est ainsi calculée :

$$\text{Concentration de la suspension initiale en cellules/mL} = [(N1+N_2) / 2] * 2 * 10^4$$

Facteur de dilution — pour 1 mL

Les cellules sont enfin ensemencées, à la concentration désirée, dans de nouvelles boîtes de culture ou sur des lames recouvertes de gélatine.

IV. Les différents modes de culture :

IV.1. Culture sous contraintes de cisaillement :

IV.1.1. Présentation du système de flux :

Le système (Fig.17) utilisé pour reproduire les contraintes de cisaillement laminaire rencontrées dans les vaisseaux sanguins se compose de :

- Bain-Marie à 37°C
- Pompe péristaltique (Masterflex®, Cole Parmer, USA)
- 3 chambres de flux en plexiglas
- Tubulures en polypropylène
- Pompe à vide.

La chambre de flux rectangulaire est équipée d'un joint de silicone de 0,024 cm d'épaisseur muni d'une ouverture rectangulaire de 1,8 cm de large et 3,2 cm de long. Cette pièce permet la jonction étanche entre le support de plexiglas et la lame de culture qui sont maintenus ensemble, grâce à une pompe à vide générant une dépression de -400 mbar.
Le milieu de culture contenant 10% de sérum chauffé à 37°C et oxygéné à 95% d'air et 5% de CO_2 circule en circuit fermé et alimente les cellules cultivées sur une lame de verre. Les à-coups générés par la pompe péristaltique sont amortis par deux seringues remplies pour 1/3 de milieu et 2/3 d'air.

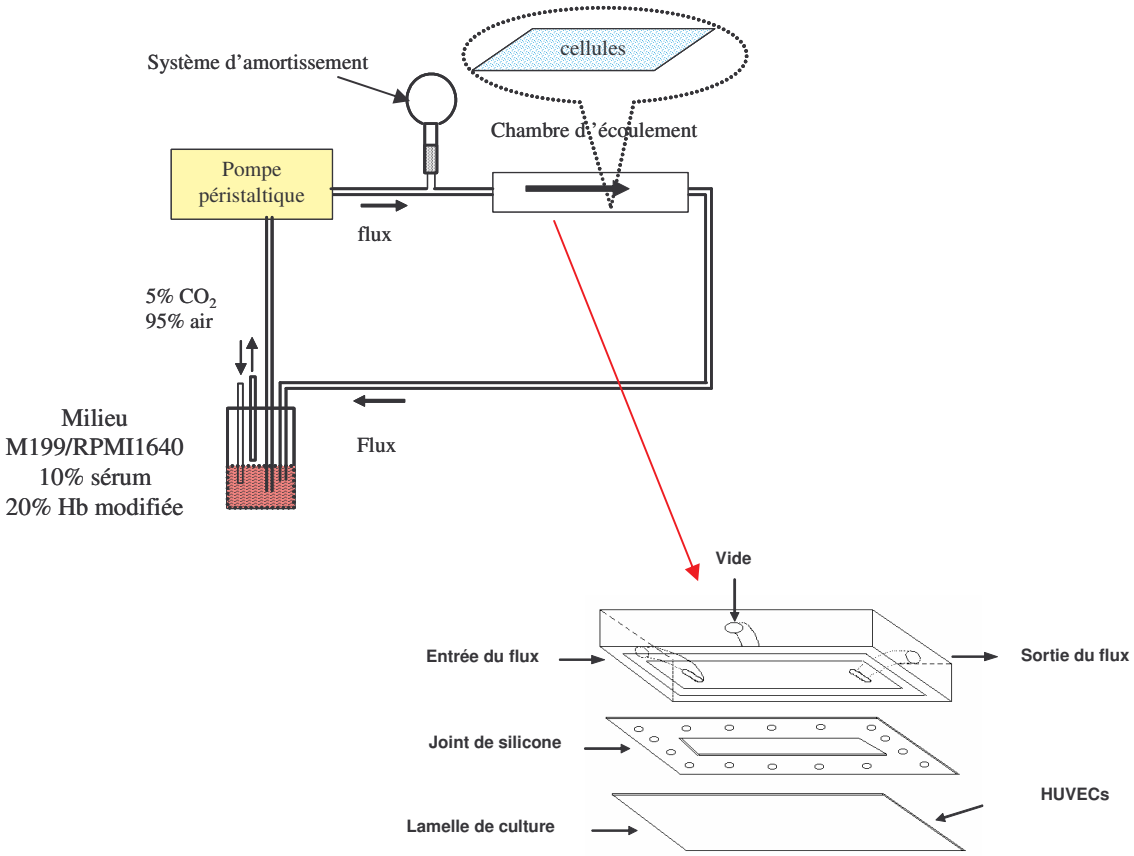


Fig. 17 : Schéma du système de culture sous contraintes de cisaillement. Le circuit est composé d'une pompe péristaltique, d'un système d'amortissement, d'une réserve de milieu circulant en circuit clos ainsi que d'une chambre de culture sous cisaillement laminaire.

IV.1.2. Calibration du système de flux :

Le débit de la pompe péristaltique a été mesuré à l'aide des différents milieux utilisés (milieu 10% de sérum ± 20% substitut sanguin) (Fig. 18). A cause du grand rapport de la largeur par rapport à la longueur (20:1), la contrainte de cisaillement peut être calculée de la façon suivante : $\tau = 6\mu Q/wH^2$

μ est la viscosité en Pa.s, Q le débit en mL/min, w la largeur (1,8 cm) et H la hauteur (0,024 cm)

La viscosité de chaque solution est mesurée à l'aide d'un viscosimètre à cylindres coaxiaux (Low-Shear 30, Contraves, France) à 37°C ; les résultats sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Viscosité des milieux utilisés mesurée à 37°C par un viscosimètre à cylindres coaxiaux (Low-Shear 30, Contraves, France)

Echantillon	Milieu à 10% de sérum	Milieu+20% Voluven®	Milieu+20% HbDexBTC	Milieu+20% Oxyglobin®
Viscosité (mPa.s)	0,8	0,9	1	0,83

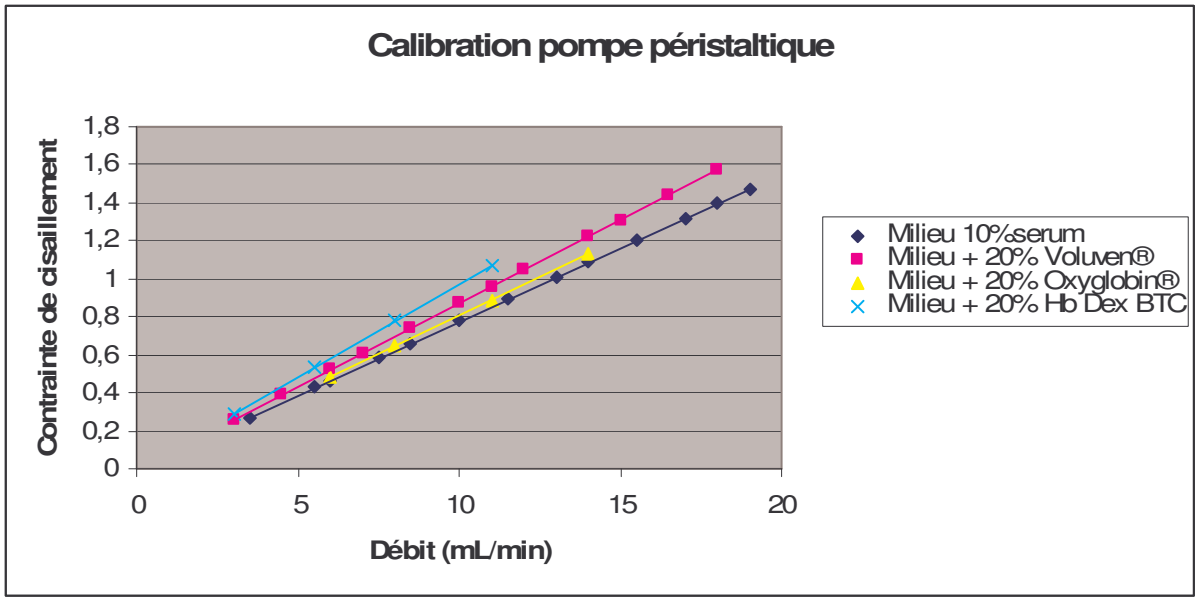


Fig. 18 : Courbes de calibration de la pompe péristaltique en présence des différentes solutions étudiées : Bleu foncé : Milieu contenant 10% de sérum humain AB ; Rose : Milieu + 20% de Voluven® ; Jaune : Milieu + 20% d'Oxyglobin® ; Bleu clair : Milieu + 20% Hb-Dex-BTC.

IV.1.3. Préparation et ensemencement des lames :

Pour la culture sous contraintes de cisaillement, les HUVECs sont cultivées sur des lames de verre (44 x 70 mm, Polylabo, France) recouvertes de gélatine à 1% (Sigma, France) favorisant l'adhérence des cellules.

Préalablement les lames ont été dégraissées à l'aide d'une solution composée de 24 g de KOH, 125 mL d'éthanol 75%, 25 mL d'eau. Finalement les lames sont autoclavées à 1 bar pendant 30 min.

La densité d'ensemencement est de 300 000 cellules/lame. La suspension cellulaire déposée sur la lame est laissée 4h à 37°C dans l'incubateur pour faciliter l'adhésion des cellules, puis 6 mL de milieu à 20% de sérum sont ajoutés. Au bout de 48 h, chaque lame est observée au microscope inversé, et les cultures dont la confluence n'atteint pas les 80-90% de confluence sont écartées. Parmi les lames validées pour l'expérience, trois sont mises en culture sous contraintes de cisaillement pendant 6h à 1 Pa, et deux autres seront placées comme contrôle statique dans l'incubateur.

IV.2. Culture en hypoxie :

Pour simuler les conséquences de l'ischémie engendrée par une grande perte sanguine, nous avons choisi une modèle d'hypoxie à 5% d'O_2 (5% CO_2 et 90% d'N_2). Nous avons tout d'abord procédé à la sélection d'une ou plusieurs durée(s) d'hypoxie « idéale(s) » pour

l'évaluation de la réoxygénation des HUVEC par les substituts érythrocytaires. Ce travail a fait l'objet d'un M2R que j'ai encadré (Estelle Paternotte) en 2007.

Nous avons testé une plage d'hypoxie allant de 0 à 72h sur des HUVEC en P_2. Puis, par mise en évidence du métabolisme anaérobie (relargage d'H_2O_2, lactate, NO) engendré par l'hypoxie (protocole en V.2.), nous avons déterminé 3 durées clés (4, 12 et 24h) et procédé à la mesure de la variation d'expression de différents gènes impliqués dans l'inflammation (ICAM-1 et E-sélectine), la vasomotricté (eNOS) et le stress oxydatif (HO-1) par PCR quantitative (protocole en VI.2). La réoxygénation des HUVEC par les substituts érythrocytaires (Hb-Dex-BTC, Oxyglobin®, αα-Hb) se fera sur 4 et 24h.

V. Méthodes d'investigation des milieux suite à la culture sous cisaillement ou hypoxie :

V.1. Mesure de l'état d'oxydation de l'Hb par spectrophotométrie :

Un spectre d'absorbance des différents substituts érythrocytaires est effectué au niveau du stock, après hypoxie (4 et 24h), culture en condition statique et après culture sous contraintes de cisaillement (6h, 1 Pa).

Les spectres obtenus sont comparés avec des spectres standards de metHb, ferrylHb, oxyHb et HbCO fournis sous forme de matrice Excel par le partenaire 5 de l'EBS, c'est-à-dire l'Université de Colchester, UK (Fig.19).

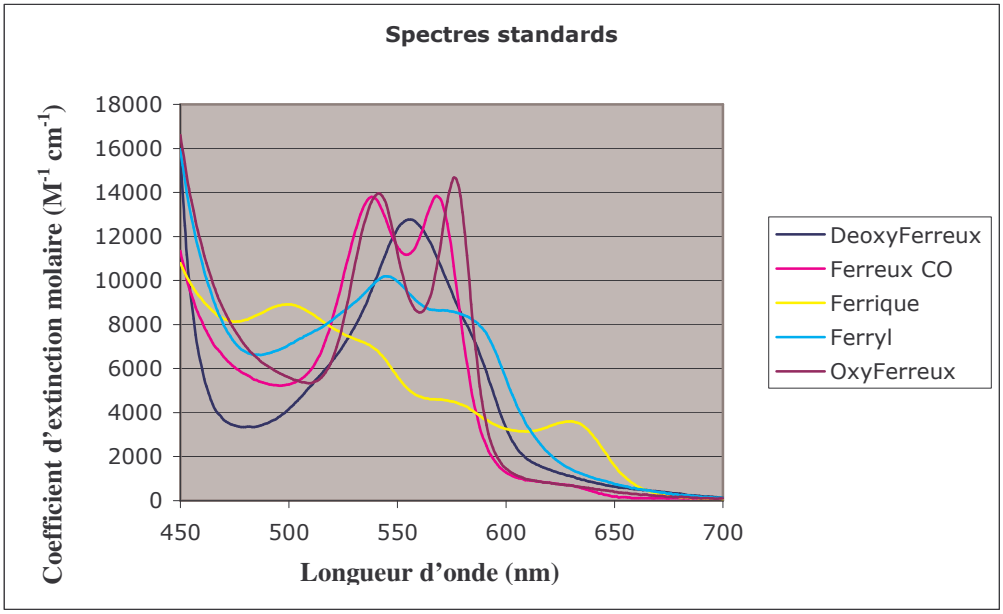


Fig. 19 : Spectres des différents standards d'état d'oxydation de l'Hb. Bleu foncé : DéoxyHb ; Rose : HbCO ; Jaune : Ferrique ; Bleu clair : FerrylHb ; Violet : OxyHb.

V.2. Dosage des métabolites dans les milieux :

V.2.1. Comptage cellulaire et traitement des milieux :

Comptage cellulaire : les lames de cellules cultivées sous contraintes de cisaillement, ou les plaques 6 puits cultivées en hypoxie (5% O_2) ainsi que les témoins statique ou normoxique (20% O_2), sont lavées au PBS à 37°C puis incubées 3 min à 37°C avec 3 ml de trypsine à 0,05 g/L. La suspension cellulaire est ensuite récupérée et la trypsine inhibée avec 3mL de milieu contenant du sérum humain. Le tout est centrifugé à 300 *g* pendant 10 min. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1,5 mL de milieu de culture et le nombre de cellules est déterminé par comptage au bleu de Trypan. Ce comptage cellulaire servira à la normalisation des résultats de dosages.

Conservation des milieux de culture après expérience : Parallèlement, les milieux provenant des cultures statique/dynamique et hypoxie/normoxie sont centrifugés puis aliquotés dans des tubes Eppendorf et enfin stockés à – 80°C préalablement au dosage d'H_2O_2, acide lactique et/ou nitrites/nitrates.

Juste avant le dosage des métabolites, l'Hb doit être extraite du milieu de culture. En effet, du fait de son large spectre d'absorbance dans le visible, elle parasite tous les dosages spectrophotométriques visibles. Il est donc nécessaire de la retirer du milieu à doser à l'aide de filtre permettant de sélectionner la taille des protéines présentes dans le milieu. Nous avons donc utilisé des filtres à 50 kDa puis 10 kDa pour être bien sûrs d'être débarrassés de toute trace d'Hb sous quelque forme que ce soit. En effet, nos échantillons contiennent de l'hémoglobine allant de 200 kDa jusqu'à des traces de monomères de 16 kDa.

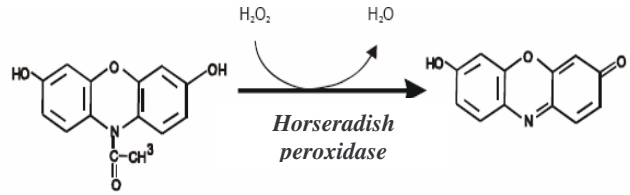
Méthode de filtration :

Deux filtrations successives sur des filtres 50 kDa et 10 kDa sont réalisées à l'aide de microtubes munis d'une membrane filtrante : microcon (Millipore, France) 50 kDa et 10 kDa, respectivement. La centrifugation sur 50 kDa s'effectue à 14 000 *g* pendant 12 min, celle sur 10 kDa à 14 000 *g* pendant 15 min. Après passage sur ces filtres, les milieux de culture récupérés sont translucides, ce qui nous assure du retrait de l'Hb.

V.2.2. Mesure de la production d'H_2O_2 :

Méthode :

La mesure de la concentration d'H_2O_2 est effectuée à l'aide du kit *Amplex® Red hydrogen peroxide assay* (Invitrogen, France). La détection colorimétrique à 570 nm (DU 600, Beckman, USA) d'H_2O_2 est basée sur la formation de résorufine à partir d'*Amplex® Red* par la *Horseradish peroxidase* (HRP) proportionnellement à la quantité d'H_2O_2 (Fig.20).



Amplex® Red **Résorufine**

Fig. 20 : Principe du dosage d'H_2O_2. La HRP utilise Amplex® Red comme donneur d'électron lors de la réduction de H_2O_2 en H_2O. Le produit résultant, la résorufine, est un composé hautement fluorescent et coloré qui peut être dosé par spectrophotométrie à 570 nm.

Dosage :

Le dosage est réalisé en plaque 96 puits en suivant les instructions du fabricant (Annexe 2.A). Une gamme étalon de 0 à 5 µM d'H_2O_2 est également réalisée ainsi qu'un blanc représentant la quantité d'H_2O_2 naturellement présente dans le milieu et à retrancher de l'échantillon. La quantité d'H_2O_2 calculée est rapportée pour un million de CE.

V.2.3. Mesure de la production de lactate :

Chez un individu sain, la forme majoritairement produite est la forme lévogyre ou L-lactate, la forme dextrogyre ou D-lactate étant produite par les fermentations bactériennes, qu'elles soient physiologiques ou pathologiques. Ce qui suit ne s'intéressera donc qu'à la forme lévogyre ou L-lactate. La quantité d'acide lactique est déterminée grâce à la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) (Biosentec, France). En présence de NAD^+, l'acide L-lactique est oxydé en pyruvate en formant du NADH, dans une réaction réversible catalysée par la L-LDH. L'équilibre de la réaction étant en faveur du lactate, l'élimination du pyruvate du milieu réactionnel par la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) déplace l'équilibre de la réaction dans le sens de la formation de pyruvate (Fig. 21). La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, est proportionnelle à la quantité de lactate initialement présente.

Dosage :

Le dosage est réalisé dans des cuves acryliques (spécial UV). Le protocole (Annexe 2.B) utilisé est une adaptation personnelle de celui fourni par le fabricant. Les concentrations d'acide lactique sont calculées grâce aux variations d'absorbance du NADH à 340 nm (Fig. 21).

$$\text{L-lactate} + NAD^+ \xleftrightarrow{\text{L-LDH}} \text{Pyruvate} + NADH + H^+$$

$$\text{Pyruvate} + \text{L-glutamate} \xrightarrow{\text{GPT}} \text{L-alanine} + \alpha\text{-cétoglutarate}$$

Fig. 21 : Principe de dosage du lactate : il est réalisé grâce à une réaction catalysée par la L-LDH. Le NADH formé est dosé par spectrophotométrie à 340 nm.

V.2.4. Mesure indirecte de la production de NO :

Le dosage de NO dans un milieu de culture ne peut se faire directement. En effet, c'est un composé instable. Une fois formé dans le milieu, il est rapidement converti en nitrite (NO_2^-). De plus, en présence d'Hb, les nitrites sont transformés en nitrates (NO_3^-). C'est pour ces deux raisons que, selon les conditions expérimentales (en présence ou en absence d'Hb), nous doserons soit les nitrites, soit les nitrates.

Dosages des nitrites :

Les NO_2^-, présents dans nos échantillons, seront dosés par le réactif de *Griess* (Molecular Probes®, Invitrogen, France). En présence de ce réactif et de NO_2^-, l'acide sulfanilique est converti en un sel de diazonium qui s'associe à la N-(1-naphtyl)éthylènediamine pour former un composé coloré détectable à 570 nm (Fig. 22).
Le dosage est effectué en plaque 96 puits selon les directives du fabricant (Annexe 2.C). Une gamme étalon de 0 à 100 µM de NO_2^- et un blanc avec du milieu sont également réalisés. La quantité de nitrite produite est rapportée pour un million de cellules.

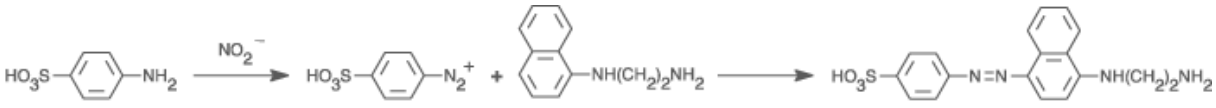


Fig. 22 : Principe du dosage des nitrites par le réactif de Griess. La formation du composé coloré est détectée à 570 nm.

Dosages des nitrates :

Les nitrates, formés par action de l'hémoglobine sur les nitrites, sont quantifiés par action de la nitrate réductase (Total NO/Nitrite/Nitrate, R&D systems, France) réduisant les nitrates

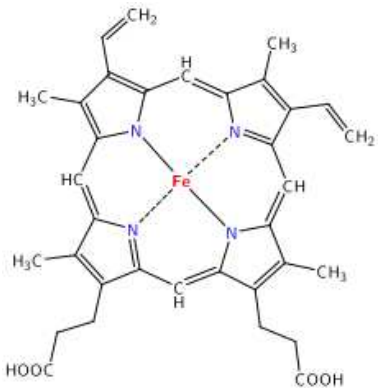
en nitrites. Les nitrites résultant sont ensuite quantifiés par le réactif de Griess. Les concentrations obtenues en µM sont rapportées pour un million de cellules. Ce dosage est effectué selon les instructions du fabricant (Annexe 2.D). L'étalonnage s'effectue par réalisation d'une gamme étalon de nitrate de 3,12 à 200 µM et mesure de la concentration de nitrate déjà présente dans le milieu de culture.

V.3. Quantification par chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) de l'Hb modifiée par oxydation :

V.3.1. L'Hb modifiée par oxydation :

Le stress oxydatif peut induire la modification de la structure de l'Hb. L'hème peut, par exemple, réagir avec des peroxydes (H_2O_2) *in vitro* et former un « hème vert » caractérisé en 1952 (George *et al*., 1952). Celui-ci a été caractérisé plus tard comme étant l'incorporation d'un lien covalent entre l'hème et une protéine (Catalano *et al*., 1989 ; Osawa *et al*., 1996 ; Reeder *et al*., 2002 ; Rogers *et al*., 1995). Mais, *in vivo*, cette liaison covalente ne peut se former que dans des conditions extrêmes. D'autres types d'hèmes modifiés par oxydation peuvent être produits dans des conditions moins extrêmes, mais à ce jour, ils n'ont pas reçu beaucoup d'attention. Il s'agit des Hb modifiées par oxydation (OxHm) produites seulement par l'interaction de l'Hb avec les peroxydes (Fig. 23). Ces espèces peuvent être produites *in vivo* en condition de stress oxydatif. Il a même été proposé que ces OxHm soient à l'origine du stress oxydatif engendré par les protéines hémiques *in vivo* (Vollaard *et al*., 2005).

A



B

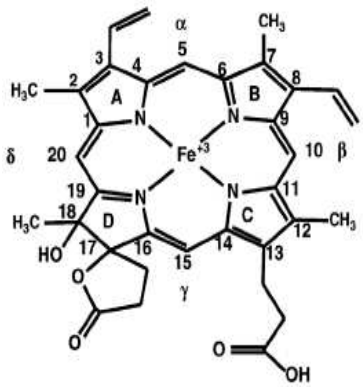


Fig. 23 : Comparaison de la structure de l'Hb (A) et de l'OxHm (B). (adapté de Vollard *et al*., 2005)

V.3.2. Principe de l'HPLC :

La technique HPLC (*High-Pressure Liquid Chromatography*) est une chromatographie sur colonne qui permet de séparer des composés selon différents critères dépendant du type de colonne utilisée.

La colonne utilisée dans notre étude est une C3 phase inverse (Zorbax StableBond 300) de 250 X 4,6 mm munie d'une précolonne de 12 x 4,6 mm. Les éluants utilisés sont constitués d'acide trifluoroacétique (TFA) dilué à 0,1% dans l'eau ou dans l'acétonitrile. Le gradient utilisé pour séparer les différents types d'hémoglobine est le suivant : la colonne est équilibrée avec A : 35% d'acétonitrile contenant 0,1% de TFA. Elle est soumise à un gradient successif à 37% de A à 10 min, 40% de A après 15 min et 43% de A après 16 min. Le reste (B) est du TFA 0,1% dans l'eau. Le débit de l'éluant est de 1 mL/min à 25°C et 12,5 µL d'échantillon sont injectés.

Méthode :

L'hème B (principal constituant des solutions d'Hb) est représenté par le pic sortant à 14,6 min, l'intégration de l'aire sous ce pic à 630 nm permet de calculer la concentration en hème B comparée à un échantillon standard d'hème B de concentration connue.

L'hémoglobine modifiée par oxydation (OxHm) est déterminée par la présence de pics entre 8,3 et 8,4 min. L'aire sous le pic à 400 nm a été intégrée pour calculer la concentration d'OxHm en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 76 000 M^{-1} cm^{-1}. La quantité d'OxHm est exprimée en pourcentage d'hème B.

Cette étude a été effectuée dans le cadre du projet EBS à l'Université d'Essex (Colchester-UK) au département de sciences biologiques lors d'un stage que j'ai effectué en juin 2007 sous la responsabilité des Pr M. Wilson et Pr C. Cooper et en collaboration avec B. Reeder.

V.4. Résonance paramagnétique électronique (RPE) :

V.4.1. Principe général :

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode de spectroscopie qui consiste en l'étude de l'absorption d'une onde électromagnétique, usuellement dans le domaine des micro-ondes, par un composé paramagnétique placé dans un champ magnétique extérieur.

L'électron a un mouvement de rotation sur lui-même caractérisé par le nombre quantique de spin (S) dont les valeurs propres ±1/2 correspondent aux deux orientations que peut prendre le spin dans un champ magnétique, l'une parallèle, l'autre antiparallèle au champ. Il en résulte deux niveaux énergétiques entre lesquels des transitions peuvent être induites. Le but de la RPE est précisément d'étudier ces transitions.

Son principe repose sur l'effet Zeeman. Soumis à l'action d'un champ magnétique extérieur intense H, les niveaux d'énergie de spin se séparent puis, sous l'action d'un second champ magnétique, perpendiculaire au premier, un photon d'énergie hυ est absorbé, ce qui correspond à la condition de résonance :

$h\upsilon = Ef - Ei = g\mu_\beta H$ (dans la cas d'un électron célibataire)

avec

g = facteur de Landé

μ_β (ou β) = magnéton de Bohr

H = valeur du champ magnétique à la condition de résonance.

La RPE est un puissant moyen d'investigation des systèmes paramagnétiques, c'est-à-dire ayant des électrons non appariés, tels que les sels, les complexes de coordination (Hb) et les radicaux. Elle renseigne sur la structure électronique et géométrique des systèmes étudiés, leur comportement dynamique, les mécanismes de réaction, etc. De plus, sa sensibilité est telle que des radicaux ou des ions paramagnétiques peuvent être utilisés comme sondes dans des systèmes diamagnétiques, sans pour autant les perturber (techniques de marquage de spin) : études de solvatation, de mécanismes de transferts dans les systèmes biologiques, études conformationnelles de polymères, etc.

Comparée à la RMN, la RPE est une technique beaucoup plus sensible (facteur 1000-2000), mais l'interprétation des spectres est plus délicate, notamment à cause des effets d'anisotropie et du couplage entre les moments de spin électronique et orbital. Les mesures quantitatives sont également moins faciles à effectuer avec la RPE qu'avec la RMN.

L'utilisation de la RPE à basse température est plus adaptée à l'étude des métalloenzymes. La RPE étant basée sur l'état de spin électronique du système, nous avons directement connaissance du degré d'oxydation des métaux que nous étudions.

Cette étude a été effectuée, dans le cadre de l'EBS, à l'Université d'Essex (Colchester-UK) au département de sciences biologiques lors d'un stage en juin 2007 sous la responsabilité du Pr M. Wilson et du Pr C. Cooper et en collaboration avec D. Svistunenko.

V.4.2. Application à l'Hb :

Le fer contenu dans l'Hb existe sous trois états d'oxydation, Fe^{II} (ferreux), avec une configuration électronique en d^6, Fe^{III} (ferrique) en d^5 et Fe^{IV} (ferryl) en d^4. Parmi tous ces états d'oxydation, seul le Fe^{III} possède un nombre impair d'électrons sur sa dernière couche électronique d (d^5), ce qui le rend détectable en RPE. Les autres états sont indétectables car

l'énergie qu'ils délivrent est trop faible pour que le spectre émis soit visualisable. Le Fe^{III} peut se présenter sous deux formes majeures : haut spin (*high spin*) et bas spin (*low spin*).

Les spectres *high spin* peuvent mettre en évidence 2 formes géométriques d'Hb (Fig. 24) appelées tétragonal et rhombique. La forme rhombique se présente d'ailleurs sous deux formes : les types 1 et 2.

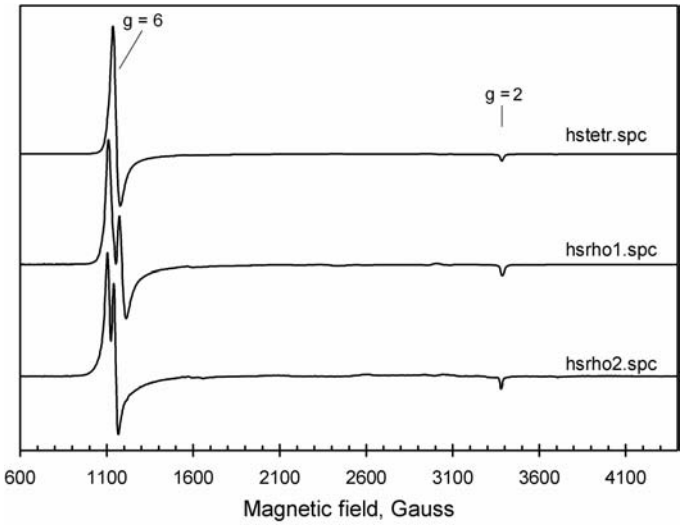


Fig. 24 : Spectres RPE de trois types d'hème ferrique en *high spin*. hstetr : forme tétragonale ; hsrho 1 et 2 : deux sous-types de forme rhombique.

Les spectres *low spin* sont des formes ferriques particulières car le $5^{ème}$ et le $6^{ème}$ coordinant du fer sont remplacés par des chaînes latérales d'acides aminés endogènes. Ce sont des hémichromes. Le fer peut être coordiné à un OH (low spin OH-hème ferrique) (Fig. 25) ou à une histidine (His hémichrome) (Fig. 26). Les formes OH et His sont elles-mêmes subdivisées en trois sous-types.

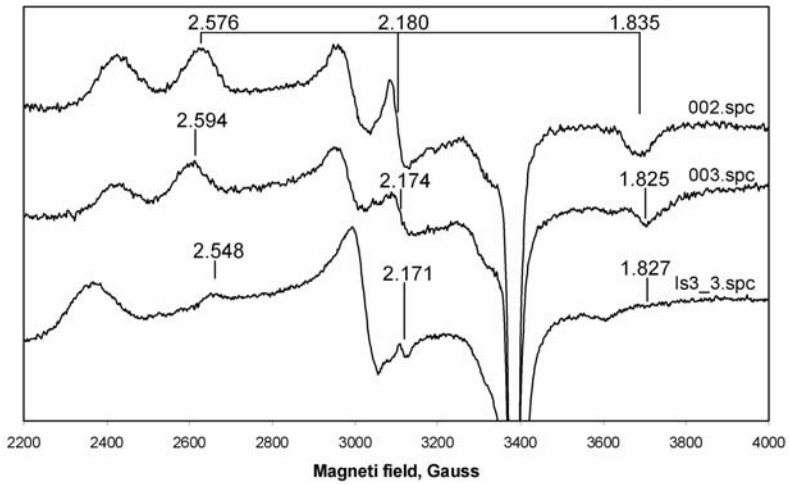


Fig. 25 : Signaux RPE de trois types d'hème ferrique en *low spin* coordinés à un OH. Les trois signaux représentent trois sous-types de *low spin* OH légèrement différents et notés : 002.spc, 003.spc et ls3_3.spc.

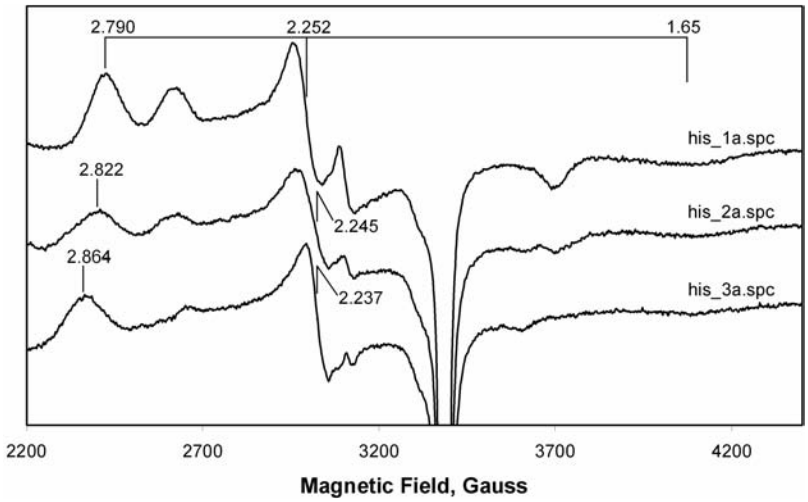


Fig. 26 : Trois types de signaux RPE générés par les espèces low spin His-hémichrome de l'Hb.

V.4.3. Méthode :

Les spectres RPE ont été mesurés à 10 K à l'aide d'un spectromètre EMX (X-band) (Bruker, UK) équipé d'un système à hélium liquide (Oxford Instrument, UK). Les conditions expérimentales sont les suivantes :

Fréquence micro-onde : ν = 9,467 GHz ; Puissance micro-onde : P = 3,18 mW ; modulation de fréquence : ν_m = 100 kHz ; modulation d'amplitude : A_m = 5 G ; constante de temps : 82 ms ; vitesse de scan *v* = 22.6 G/s ; nombre de scans par spectre : NS = 1.

VI. Méthodes d'étude des différentes réponses des cellules :

VI.1. Réarrangement du cytosquelette sous contraintes de cisaillement :

VI.1.1. La microscopie confocale :

Les images en microscopie de fluorescence classique présentent une perte de résolution de l'image due à une émission de fluorescence des fluorochromes situés hors du plan focal. La microscopie confocale (SP2 AOBS-MP, Leica) résout ce problème en utilisant un diaphragme de diamètre très fin (appelé *pin-hole*), permettant de ne collecter que la lumière émise dans le plan focal suite à l'excitation de l'objet par un faisceau laser. Cette méthode repose sur une constitution de l'image grâce à un balayage de l'échantillon point par point suivant l'axe des X et des Y à l'aide de deux miroirs vibrants. Plusieurs sources d'excitation sont disponibles mais les plus couramment utilisées sont les lasers argon/krypton (488 nm) et hélium/néon (568-633 nm). Après excitation, la fluorescence est réémise dans les 3 dimensions. Le diaphragme, présent à l'entrée du photodétecteur, ne récupère que les photons provenant du point illuminé. Les photons captés par le photodétecteur sont alors amplifiés et transformés en

signaux électriques dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons captés.

VI.1.2. Marquage du cytosquelette et du noyau :

Les cellules cultivées en condition statique ou dynamique (6h, 1 Pa) sont tout d'abord lavées au RPMI 1640 sans rouge de phénol (Gibco, France) puis fixées avec du paraformaldéhyde (PAF) à 1% (p/v) pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont perméabilisées au Triton X 100 à 0,5% pendant 15 min à température ambiante. Après le lavage, le cytosquelette est marqué à la phalloïdine Alexa® 488 diluée au 1/100ème dans du triton X 100 à 0,5% pendant 45 min à 37°C. La phalloïdine est une toxine produite par l'amanite phalloïde qui se fixe aux filaments d'actine du cytosquelette. Finalement, après un ultime lavage, le noyau est marqué avec du l'iodure de propidium (IP) dilué au 1/1000ème dans du RPMI 1640 sans rouge de phénol pendant 30 min à 37°C. Les lames sont ensuite conservées dans du PAF à 1% jusqu'à leur visualisation en microscopie confocale avec les lasers argon/krypton (488 nm) et hélium/néon (568-633 nm).

VI.2. Variation de l'expression de différents gènes :

VI.2.1. Les ARN totaux :

VI.2.1.1. Extraction :

Après culture des HUVEC dans différentes conditions, les lames sont lavées deux fois au PBS froid et stérile. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide de 5 mL de Trizol® et incubées 5 min à température ambiante au contact des cellules. A l'aide d'un grattoir stérile, les cellules sont décrochées des lames et la suspension cellulaire est placée dans un microtube, homogénéisée à la seringue et centrifugée à 4°C pendant 10 min à 12000 *g* (pour séparer les grosses protéines de la suspension cellulaire) ou bien conservée à -80°C. Afin de séparer les différents acides nucléiques des protéines, 0,2 mL de chloroforme sont ajoutés au surnageant récupéré lors de l'étape précédente. Le tout est homogénéisé au vortex pendant 15 s, puis le tube est laissé au repos 3 à 5 min avant d'être centrifugé à 4°C pendant 15 min à 12000 *g*.
Après centrifugation, la phase supérieure, riche en ARN, est transférée dans un microtube propre. Un volume équivalent d'éthanol à 70% (v/v dans de l'eau DEPC) est ajouté afin de laver les ARN totaux. Le tube est ensuite agité au vortex et le mélange est déposé en plusieurs fois sur une colonne (kit d'extraction RNeasy minikit, Qiagen, France). Les colonnes placées dans des tubes collecteurs propres sont centrifugées à 4°C pendant 15 s à 10000 *g*. Cette étape permet de fixer les ARN Totaux à la résine contenue dans la colonne afin de les purifier.

Il est possible, à ce stade, que notre échantillon soit contaminé par une petite quantité d'ADN. Il faut alors procéder à une digestion à la DNaseI (RNase-free DNase set, Qiagen, France). La colonne (contenant l'échantillon) est conditionnée avec 350 µL de tampon RWI (Kit RNeasy) pendant 2 min à température ambiante, puis celle-ci est centrifugée à 4°C pendant 15 s à 10000 *g*. La DNase I est diluée au 8ème dans son tampon pour un volume final de 80 µL. Cette solution est incubée 15 min à température ambiante au contact de la colonne. L'enzyme est ensuite éluée de la colonne avec 350 µL de tampon RWI et centrifugée à 4°C pendant 15 s à 10000 *g*. Finalement, la colonne est lavée deux fois avec 500 µL de tampon RPE (Kit RNeasy). Le premier lavage est suivi d'une centrifugation à 4°C pendant 15 s à 10000 *g*, la 2ème centrifugation dure 2 min pour bien sécher la colonne.

La colonne est transférée dans un tube neuf et les ARN totaux sont élués par ajout de 30 µL d'eau RNase free (kit RNeasy) et centrifugation à 4°C pendant 1min à 10000 *g*.
Les ARN totaux ainsi extraits sont placés 10 min à 56°C pour linéariser les ARNs.

VI.2.1.2. Quantification :

Les ARN totaux extraits sont quantifiés par lecture de l'absorbance à 260 nm (Biophotomètre de Bio-Rad) d'une dilution au 50ème dans du Tris HCl EDTA pH 8 de la solution initiale. La concentration en ARN est calculée grâce à la formule :

Concentration d'ARN (µg/µL)= 40*DO_{260}*Facteur de dilution*1000 (pour 1µL)

VI.2.1.3. Contrôle de l'intégrité des ARN par électrophorèse sur gel d'agarose :

L'intégrité des ARN extraits est vérifiée sur gel d'agarose 0,8% contenant 0,5µg/mL de bromure d'éthidium. Un volume de 9µL contenant 500ng d'ARN et 6µL de tampon de charge migre pendant 30min à 80V. Le gel (Fig. 27) est ensuite révélé par une lampe UV.

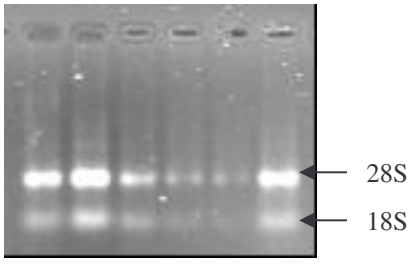


Fig. 27 : Révélation de la présence et de l'intégrité d'ARN totaux par migration des échantillons sur gel d'agarose 0,8%. Les flèches indiquent la position des ARN ribosomiaux.

Le gel met en évidence la présence d'ARN 28S et 18S (les plus abondants dans la cellule) pour tous les échantillons. Aucune bande supplémentaire n'est visualisable, donc les ARN totaux extraits sont de bonne qualité.

VI.2.2. La Reverse transcription (RT) :

Les ARNm précédemment extraits sont d'abord transcrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'un kit (iScript^{TM} cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, France) contenant une reverse transcriptase. Le protocole et le programme sont présentés annexe 3.A.

Une fois les ARNs rétro transcrits en ADNc, ils sont amplifiés par qPCR (ou PCR en temps réel) en utilisant le SYBR Green comme fluorophore. Le SYBR Green est un composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Il permet de quantifier les acides nucléiques en solution pendant la PCR en temps réel car il n'interfère pas lors de la réaction. En effet, le SYBR Green est un intercalant de l'ADN qui ne se lie qu'aux ADN doubles brins. Il permet donc de quantifier la synthèse d'ADN double brin pendant la PCR. L'utilisation de cette sonde est combinée à l'utilisation de l'appareil My IQ de Bio-Rad (France). Les échantillons sont quantifiés relativement à l'expression d'un gène ubiquitaire : RPS 29 codant pour une protéine ribosomale de la petite sous-unité (40S) des ribosomes. Ce gène a été choisi car il n'intervient pas dans les phénomènes étudiés ici, méchanotransduction, stress oxydatif et/ou inflammatoire.

VI.2.3. La Réaction de Polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) :

Principe de la PCR en temps réel, technique SYBR Green :

La réaction en chaîne par polymérase en temps réel est une technologie ayant de nombreuses applications, basée sur une réaction enzymologique, la PCR, et sur la mesure en continu de son produit. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, ce qui était très difficile à obtenir, sans biais, en PCR en point final. Du point de vue enzymatique, il n'y a aucune différence théorique entre ces deux types de PCR. La différence fondamentale de la PCR en temps réel avec la PCR en point final est que l'intégralité de la cinétique mesurable (au-dessus du bruit de fond) est quantifiée. Les données de fluorescence peuvent donc être exprimées en logarithme afin d'identifier facilement la phase exponentielle et mesurable, qui prend alors une apparence linéaire. Cette partie, appelée « segment quantifiable », permet de calculer la quantité d'ADN initial. La quantification, en passant par une valeur mathématique en nombre de cycle (Ct : cycle threshold ou cycle seuil), permet d'obtenir des résultats fiables, mais non exploitables directement. Afin d'obtenir la quantité d'ADN initial, il est nécessaire de réaliser une nouvelle transformation mathématique

qui nécessite de connaître l'efficacité de PCR. Cette dernière est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage ou efficacité de PCR.

Choix des différentes amorces pour la PCR quantitative :

Nous avons choisi d'étudier quatre gènes intervenant dans les différents impacts possibles des substituts sanguins et du cisaillement et/ou l'hypoxie sur les CEs. Les amorces concernant ICAM-1, E-sélectine, eNOS et HO-1 ont été choisies suivant une démarche précise. Tout d'abord le site www.ensembl.org/index.html a été utilisé pour la recherche des séquences des gènes précités. Ensuite, les séquences des amorces ont été déterminées à l'aide du site primer 3 output http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Les amorces doivent faire une vingtaine de paire de bases (pb) et doivent s'hybrider sur deux exons différents afin de pouvoir mettre en évidence d'éventuelles contaminations des échantillons par de l'ADN génomique. La longueur de l'amplicon doit être comprise entre 50 et 150 pb. Les amorces ne doivent pas s'hybrider sur plusieurs SNP (single nucleotide polymorphisme). Finalement, les amorces sont alignées sur des séquences de gènes de la même famille, par exemple ICAM-2 pour ICAM-1. En effet, ceux-ci possèdent des domaines conservés, et nous devons nous assurer d'amplifier le bon gène. L'alignement des séquences est effectué à l'aide du site http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi. Finalement, trois amorces sont sélectionnées et commandées au Service commun de biologie moléculaire du Professeur Plénat du CHU de Nancy-Brabois.

Test des amorces :

Les trois amorces sélectionnées (une pour chaque gène) (Annexe 3. B) sont testées. Toutes les amorces présentant un produit quantifiable (car elle s'hybrident entre elles) dans les puits RT^- et blanc sont écartées. Les amorces dont le C_T (*Cycle threshold*, cycle seuil) est supérieur à 35 ne seront pas non plus utilisables, car leur quantification est trop tardive et pourrait se confondre avec des réactions parasites (impuretés, hybridations aspécifiques,...).
Après avoir sélectionné les amorces les plus intéressantes, il est nécessaire de déterminer leur efficacité de PCR respective.

Détermination des efficacités de PCR :

Une qPCR est effectuée sur une gamme de 5 dilutions d'ADNc diluée au $5^{ème}$ à partir de $1/20^{ème}$. Après la réaction, le logiciel MyiQ™ optical system software 1.0 (Bio-rad,

France) permet de déterminer l'efficacité de PCR. Seules les efficacités proches de 100% confirmeront la sélection définitive des amorces (Annexe 3.C).

Mesure de l'expression des différents gènes :
Le mélange réactionnel et le programme sont présentés Annexe 3.B.

Les témoins positifs d'inflammation, de vasoconstriction et d'oxydation :

Marqueurs d'inflammation (ICAM-1 et E-sélectine) :

Les témoins positifs pour les marqueurs d'inflammation ICAM-1 et E-sélectine sont réalisés par incubation des HUVEC avec du TNF-α (Cf = 10ng/mL) (Sigma, France) pendant 6h dans une étuve à 37°C.

Témoin de vasotonicité, la NO synthase endothéliale (eNOS) :

La stimulation de la transcription de la eNOS a été effectuée avec de la L-α-lysophosphatidylcholine (LPC, Sigma, France) selon la méthode développée par Zembowicz *et al*. (Zembowicz *et al*., 1995). La LPC (Cf = 100 µM) a été incubée 6h au contact des HUVEC.

Marqueur de l'état d'oxydation de l'Hb, l'hème oxygénase I HO-1 :

HO-1 est une protéine induite par la présence d'hémoglobine libre. L'induction de la transcription a donc été stimulée par 1 µM (concentration finale) d'hémine ou metHb (Sigma, France) pendant une nuit à 37°C.

La variation de ces quatre gènes a été étudiée pour les cellules cultivées sous contraintes de cisaillement *vs* statique et sous hypoxie (5% O_2) *vs* normoxie (20% O_2).

VI.3. Quantification de l'expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine :

VI.3.1. Principe de la Cytométrie en Flux (CMF) :

La cytométrie en flux permet d'identifier et de compter individuellement des cellules en suspension d'après leurs paramètres physiques (granulosité, taille, volume) et biologiques (expression de molécules membranaires et/ou intracellulaires, appréciation du matériel nucléaire). Les cellules à analyser peuvent être préalablement marquées par des sondes fluorescentes (Alexa® 488, phycoérythrine) couplées à des anticorps reconnaissants spécifiquement des antigènes membranaires ou intracellulaires.

Les cellules en suspension passent ensuite devant un faisceau laser excitateur (généralement un laser argon) qui génère une lumière monochromatique à 488 nm. La fluorescence émise par chaque cellule est détectée par des photomultiplicateurs (PMT) et analysée grâce à un système d'acquisition informatique. Chaque signal permet de définir un paramètre de la cellule :

- La lumière diffractée correspond à celle diffusée par la surface membranaire (FSC = Forward Scatter). Elle reflète la taille de la cellule.
- La lumière réfractée et réfléchie correspond à celle qui pénètre dans la cellule et qui est diffusée par les organites intracellulaires dans toutes les directions de l'espace (SSC = Side Scatter). Elle est donc fonction de l'hétérogénéité du contenu cellulaire et reflète la granulosité de la cellule.
- La fluorescence (signal de longueur d'onde différente de celle de faisceau excitateur et spécifique du type de fluorochrome utilisé) est émise dans toutes les directions de l'espace. Si plusieurs fluorochromes sont utilisés, les différents signaux pourront être séparés en fonction de leur longueur d'onde grâce à des filtres interférentiels puis recueillis par des PMT. Ce signal reflète l'expression des antigènes marqués.

L'ensemble des signaux lumineux est ensuite transformé par les PMT en signaux électriques puis amplifié en signaux analogiques digitaux ; l'amplitude de chaque signal est alors convertie en un numéro de canal.

Ces données sont représentées sous forme de nuages de points (dot plot) dont chacun correspond à une cellule, ou sous forme d'histogrammes de distribution de fréquence dont l'abscisse représente l'amplitude étudiée et l'ordonnée, le nombre d'évènements par canal.

Méthodes d'immunomarquage :

Immunomarquage direct : l'anticorps couplé à un fluorochrome reconnaît spécifiquement un antigène (Ag). La fluorescence émise provient de l'anticorps ayant directement reconnu l'Ag.

Immunomarquage indirect : Un anticorps primaire (Ac I^R) reconnaît spécifiquement l'antigène à marquer. Il n'est pas couplé à un fluorochrome, mais est reconnu spécifiquement par un anticorps secondaire (Ac II^R) qui, lui, est lié à un fluorochrome. La fluorescence émise provient donc de la reconnaissance indirecte de l'antigène par l'Ac II^R.

VI.3.2. Normalisation des résultats, Kit de calibration Qifikit :

Cet étalon est constitué de cinq populations de billes de latex, de 10 µm de diamètre, recouvertes en quantité déterminée d'anticorps monoclonal (Annexe 4), plus précisément, un anticorps de souris anti-CD5 humain de haute affinité, clone ST1, isotype IgG2a. Les billes du Qifikit (Dako, France) sont calibrées par comparaison à des standards cellulaires, eux-mêmes calibrés par méthode radio-immunologique.

Ceci permet de tracer une droite d'étalonnage reliant l'intensité moyenne de fluorescence au nombre d'anticorps monoclonaux fixés par cellule et, par extension, au nombre de sites antigéniques recherchés par cellule.

Les cellules sont incubées avec AcI^R à concentration saturante. Les billes sont introduites lors du marquage par $AcII^R$ et sont traitées parallèlement aux cellules.

Immunomarquage des billes :

L'immunomarquage des billes de calibration s'effectue par incubation de 100 µL de suspension de billes, pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité, avec 10 µL d'anticorps secondaire Alexa® 488 anti-souris. Les tubes sont ensuite centrifugés à 300 *g* pendant 5 min. Les billes sont lavées une fois avec du PBS, centrifugées et resuspendues dans 300 µL de PBS. Les billes doivent être analysées dans les quatre heures qui suivent l'immunomarquage (Fig. 28).

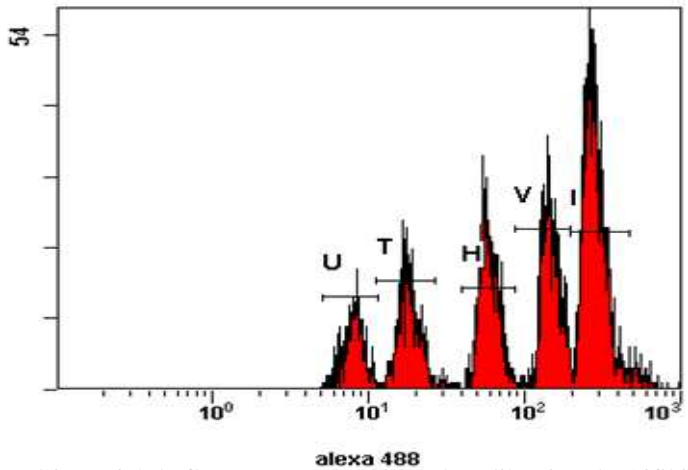


Fig. 28 : Cytogramme d'intensité de fluorescence des billes de calibration du Qifikit (Dako, France) en fonction du nombre d'événements.

VI.3.3. Immunomarquage de cellules pour ICAM-1 et E-sélectine :

Les cellules témoins statiques ou celles cultivées sous contraintes de cisaillement, ainsi que la paire hypoxie/normoxie, sont lavées au PBS à 37°C puis incubées 3 min à 37°C avec 3 ml de trypsine à 0,05 g/L. La suspension cellulaire est ensuite récupérée et la trypsine inhibée avec 3 mL de milieu contenant du sérum humain. Le tout est ensuite centrifugé à

300 *g* pendant 10 min. Le culot cellulaire est resuspendu dans 100 µL de milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol supplémenté avec 0,5% de BSA préchauffé à 37°C. Puis 2 µL (dilution finale 1/50ème) d'Ac I^{R} anti ICAM-1 ou E-sélectine sont incubés 30 min à température ambiante (TA) au contact de la suspension cellulaire. Après incubation, les suspensions sont centrifugées 10 min à 300 *g* puis resuspendues dans 100 µL de RPMI + BSA. Ensuite, 2 µL (dilution finale 1/50ème) d'Ac II^{R} reconnaissant spécifiquement chaque antigène sont incubés 30 min à TA et à l'obscurité. Les cellules ainsi marquées sont centrifugées une dernière fois 10 min à 300 *g* puis resuspendues dans 300 µL de PAF 1%.
Les intensités moyennes de fluorescence sont mesurées par cytométrie en flux.

Témoin positif :

Un témoin positif d'expression d'ICAM-1 et E-sélectine, utilisé pour valider la technique de marquage et de détection, a été réalisé par incubation des cellules pendant une nuit avec du TNF-α (Concentration finale = 10 ng/mL). Le marquage a été réalisé comme expliqué ci-dessus.
Les préparations sont analysées (Beckman Coulter cytomics FC 500) le jour suivant l'expérience.

VII. Evaluation des nouvelles solutions d'hémoglobine :

Dans ce chapitre, nous aborderons les techniques utilisées pour évaluer de nouvelles solutions à base d'Hb, les PegHb et l'octamère (présentés dans le chapitre I.2.2.). Nous évaluerons la cytotoxicité de ces nouvelles formulations sur des HUVEC et tenterons d'appréhender leur impact sur la transcription de différents gènes.

VII.1. Mode opératoire :

L'Hb octamérique étant produite par génie génétique, les quantités disponibles pour nos expérimentations sont très faibles. Nous avons donc décidé qu'une concentration et une hémodilution (16 g/L et 20%) similaires à celles de la culture sous cisaillement et en hypoxie seraient appliquées à des HUVEC pendant une nuit à 37°C à 20% d'O_2. Les expériences sont réalisées sur des cellules en P2 ensemencées à 50 000 cellules/puits dans des plaques 24 puits et cultivées à confluence, c'est-à-dire environ quatre jours.

VII.2. Evaluation de la cytotoxicité :

VII.2.1. Morphologie cellulaire :

Après une nuit d'incubation, les cellules sont observées en microscope inversé à contraste de phase. Ceci nous permet de nous assurer qu'aucun stress, induisant une rupture de la confluence du tapis cellulaire liée à une rétractation des cellules (arrondissement), n'est produit par la présence d'un substitut.

VII.2.2. Mesure de la viabilité cellulaire :

Test MTT :

Le réactif utilisé est un sel de tétrazolium : le MTT ou 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide. C'est un colorant vital, marqueur fonctionnel des mitochondries. Le tétrazolium que le MTT contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en un composé coloré (bleu-violet) insoluble : le formazan. L'intensité de la coloration est alors proportionnelle à l'activité métabolique des CE.

Les CE sont tout d'abord lavées 2 fois avec du RPMI sans RP (Sigma, France). Puis, dans chaque puits, 1 mL de MTT à 2 mg/mL (Sigma, France) est incubé au contact des cellules pendant 3h à 37°C. Le milieu est retiré et les CE sont lavées à 2 reprises avec du tampon phosphate (PBS) à 37°C. Les cristaux de formazan formés sont alors dissous pendant 10 min avec 1 mL de DMSO (Sigma, France). La suspension est récupérée et centrifugée à 300 g pendant 2 min. Les absorbances du surnageant à 570 nm et 700 nm sont enfin lues. Les résultats sont calculés de la façon suivante :

DOtest MTT = DO570nm (formazan) - DO700nm(MTT non transformé restant)

Test Alamar Blue® :

Le test Alamar Blue® (Biosource, USA) est conçu pour mesurer quantitativement la prolifération cellulaire et la cytotoxicité de drogues. Ce composé comprend un indicateur colorimétrique sensible à l'activité métabolique cellulaire. Plus précisément, l'Alamar Blue® est composé d'un indicateur Rédox qui change de couleur en fonction de la réduction chimique du milieu de culture. L'Alamar Blue®, n'est pas un toxique cellulaire et le test ne nécessite pas la lyse des cellules, permettant ainsi de suivre l'évolution du signal de manière cinétique.

Des cellules en bonne santé et/ou en prolifération produisent des composés réducteurs tels que $FADH_2$, NADH, NADPH et ont une activité cytochromique préservée contribuant à

réduire l'Alamar Blue®. Par contre, des cellules atteintes par un stimulus cytotoxique ne réduisent pas l'Alamar Blue® et produisent des composés oxydants.

La mesure de la viabilité cellulaire est donc basée sur le taux d'oxydo/réduction de l'Alamar Blue® déterminé par la mesure d'absorbance à 540 nm (composé réduit) et à 630 nm (composé oxydé). Le pourcentage de réduction est alors déterminé par la correction suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{(\varepsilon ox)\lambda 2\ A\lambda 1 - (\varepsilon ox)\lambda 1\ A\lambda 2}{(\varepsilon red)\lambda 1\ A'\lambda 2 - (\varepsilon red)\lambda 2\ A'\lambda 1} \times 100$$

εox : coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée, εred : coefficient d'extinction molaire de la forme réduite, A : absorbance de l'échantillon, A' : absorbance d'un puits contrôle milieu de culture+Alamar Blue®, λ1 : longueur d'onde 540 nm, λ2 : longueur d'onde 630 nm

Après le traitement des cellules, le milieu de culture est remplacé par un milieu frais contenant 10 % v/v d'Alamar Blue®. La mesure densitométrique intervient 4 heures après l'adjonction du marqueur. Le pourcentage de réduction du milieu est alors déterminé par la mesure de l'absorbance à 540 et 630 nm.

VII.2.2. Mesure du taux d'apoptose/nécrose *vs* viabilité cellulaire :

Principe :

L'apoptose est un procédé de mort cellulaire soigneusement régulé se déroulant tout au long du développement cellulaire. Certaines situations, comme l'inflammation ou le stress oxydatif, induisent l'apoptose. Celle-ci est distinguée de la nécrose et de la mort accidentelle par des changements de caractéristiques morphologiques et biochimiques, comme la compaction et la fragmentation de la chromatine nucléaire, le rétrécissement du cytoplasme et la perte de l'asymétrie de la membrane plasmique (MP) (Lincz, 1998 ; Allen *et al*., 1997). Dans les cellules normales viables, la phosphatidylsérine (PS) est localisée sur la face cytoplasmique du feuillet interne de la MP. Cependant, dans les cellules apoptotiques, la PS est transloquée du feuillet interne au feuillet externe de la MP, exposant donc la PS au milieu extracellulaire (van Engeland *et al*., 1998). L'annexine V, anticoagulant humain, est une protéine de liaison calcium-dépendante de 35-36 kDa, qui a une forte affinité pour la PS. L'annexine V marquée avec un fluorochrome peut donc identifier les cellules apoptotiques en se liant à la PS exposée sur le feuillet externe de la MP (Tait *et al*., 1992). Nous avons utilisé une annexine V recombinante conjuguée à l'Alexa® 488, ainsi que de l'iodure de propidium

(IP) qui, lorsqu'il peut entrer dans la cellule, rend l'ADN fluorescent (Vibrant apoptosis kit #2, Invitrogen, molecular probes, Fance). L'IP n'entre dans la cellule que lorsqu'elle est devenue perméable, donc morte. De ce fait, les cellules négatives (non marquées) seront considérées comme viables, les cellules marquées à l'Annexine V seront en apoptose, et les doubles positives (Annexin, IP) seront en nécrose.

Adaptation de la méthode commercialisée :

Puisque le kit d'apoptose commercialisé par Molecular Probes a été mis au point sur des cultures de cellules en suspension, il a été nécessaire de l'adapter à nos cultures de cellules adhérentes. Le premier problème était de savoir si le marquage devait être effectué avant ou après décollement des cellules. La deuxième difficulté résidait dans la technique utilisée pour décrocher les cellules, car, comme celles-ci doivent rester vivantes tout au long de l'expérience, il ne fallait pas engendrer de faux positifs d'apoptose induits par la méthode de décrochage (enzymatique, grattage, PBS froid, EDTA). Puisque le décrochage enzymatique à l'aide de trypsine engendre des faux positifs d'apoptose, il était donc nécessaire de marquer les cellules avant de les décrocher. De plus, certains produits comme l'EDTA et de fortes concentrations de trypsine (0,5 mg/mL) rompent la liaison de l'annexine V avec la PS et forment donc de faux négatifs d'apoptose. D'autres techniques, comme le grattage et le PBS froid, se sont révélées inefficaces pour décrocher les cellules du support et dissocier la tapis cellulaire. Finalement, le meilleur compromis, après divers essais de concentration et de temps d'incubation, fut la dissociation à la trypsine 0,05 mg/mL pendant 3 min après marquage préalable des cellules à l'IP et à l'annexine V.

Méthode :

Les HBOC ($[HBOC]_f$ = 16 g/L, dilution à 20%) sont incubés une nuit avec des HUVEC. Puis les milieux de culture sont éliminés, les cellules lavées trois fois au PBS à 37°C. La phosphatidylcholine est marquée avec 2,5 µL d'annexine V et le noyau avec 1 µL d'iodure de propidium dans 100 µL de tampon annexine V fourni dans le kit. L'ensemble est incubé 15 min à TA à l'obscurité. Les cellules sont lavées au PBS à 37°C pour retirer l'excès d'Ac. Ensuite les cellules sont détachées du support à l'aide de 200µL de trypsine 0,05 mg/mL (Gibco, France) incubée 3 min au contact de cellules. La trypsine est inhibée avec 200 µL de milieu contenant du sérum humain. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 *g* pendant 5 min. Le culot est finalement resuspendu dans 300µL de tampon annexine V. Les cellules sont ensuite observées en cytométrie en flux.

Réglage des paramètres du cytomètre :

Témoin négatif :

Le témoin négatif représente la viabilité de cellules n'ayant subi aucun traitement préalable. Une culture de cellules classique peut atteindre naturellement 80 à 85% de cellules viables, 15 à 20% de cellules en apoptose et un faible pourcentage de nécrose (1-3) (Jacobi *et al.*, 2005).

Témoins positifs :

Apoptose : les cellules en apoptose sont positives pour le marquage de la PS à l'annexine V. Afin d'obtenir une témoin positif d'apoptose, celle-ci a été induite par addition d'H_2O_2, pour une concentration finale de 300 µM, dans les milieux de culture et incubés à 37°C pendant une nuit au contact des cellules.

Nécrose : les cellules en nécrose présentent un marquage positif pour la PS (annexine V alexa® 488) et le noyau (IP). Afin de simuler des témoins positifs de nécrose, les cellules ont été fixées 10 min avec du PAF 1%, puis marquées 15 min comme précédemment cité.

VIII. Analyses statistiques des résultats :

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± erreur standard de la moyenne pour chaque condition étudiée (n = 3). Une analyse de la variance a été réalisée avec comparaison des échantillons par un test ANOVA (Statview IV®, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA). Les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0,05% ont été considérées comme significatives.

Résultats
&
discussions

Partie I

Comportement des cellules endothéliales cultivées sous contraintes de cisaillement en absence ou en présence d'un substitut sanguin

Partie I-A

Validation des techniques d'investigation et du système de culture des cellules endothéliales sous contraintes de cisaillement.

La cellule endothéliale apparaît comme le « cerveau » de l'homéostasie cardiovasculaire. De par sa localisation à l'interface entre le sang et les couches profondes de la paroi vasculaire, elle communique avec différents types cellulaires, allant des cellules sanguines (leucocytes, plaquettes) aux cellules musculaires lisses. De plus, elle constitue une cible de choix pour les produits injectés dans la circulation sanguine, tels que les substituts érythrocytaires qui font l'objet de notre étude. En condition physiologique, l'endothélium vasculaire est soumis aux contraintes imposées par le sang, comme l'étirement cyclique et les contraintes de cisaillement. Ces dernières sont déterminées par le débit sanguin, la viscosité du sang ainsi que le diamètre du vaisseau. Ce sont ces trois paramètres qui varient lors d'une ischémie consécutive à une hémorragie suivie par une reperfusion avec un HBOC. En effet, lors d'une grande perte sanguine, le débit sanguin et le diamètre des vaisseaux diminuent dans certains territoires, et la viscosité sanguine sera ensuite modifiée par celle de l'HBOC lors de la reperfusion.

Afin d'étudier l'impact de l'injection de substituts érythrocytaires dans la circulation sanguine sur les cellules endothéliales, nous avons développé un modèle de culture sous contraintes de cisaillement. Parallèlement à sa mise en place, il a été nécessaire de développer des techniques d'étude mesurant l'impact des HBOC sur les cellules endothéliales, comme la RT-PCR quantitative et la cytométrie en flux. Nous avons choisi quatre gènes jouant un rôle majeur dans la réponse de la cellule endothéliale à la présence d'HBOC. Il s'agit de deux gènes impliqués dans l'inflammation : ICAM-1 et E-sélectine, un dans la vasomotricité

vasculaire : eNOS, et enfin, un quatrième dans la détection directe de la présence d'Hb et plus particulièrement de metHb : HO-1.

I. Contrôles positifs :

I.1. Evaluation du taux de transcription par RT-PCR quantitative :

Afin de détecter les variations de transcription des ARNm codant pour ICAM-1, E-sélectine, eNOS et HO-1, nous avons stimulé les cellules endothéliales selon différents protocoles dépendants du gène d'intérêt.

La stimulation des cellules au TNF-α (Fig. 29) montre un niveau d'expression relatif des ARNm d'ICAM-1 et E-sélectine significativement différent du témoin en présence de milieu.

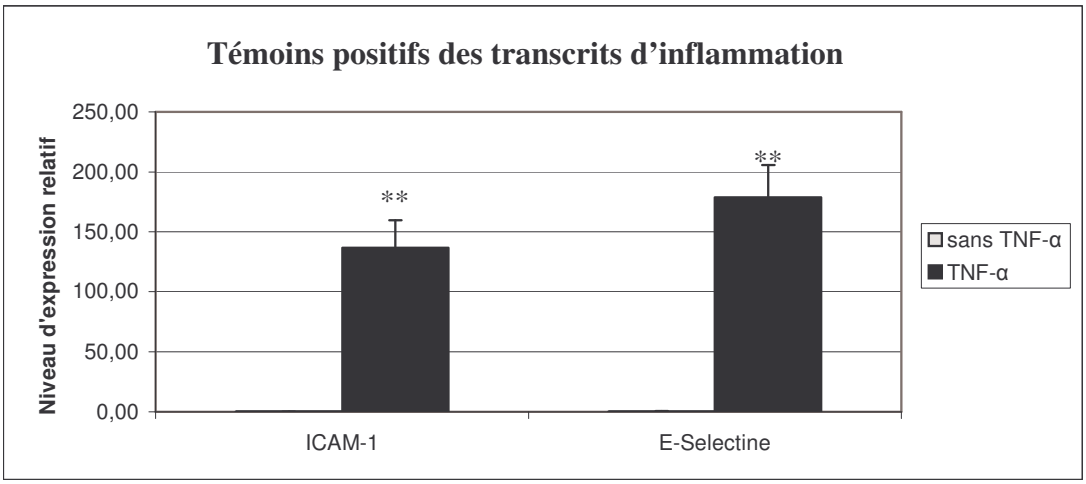


Fig. 29 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes inflammatoires ICAM-1 et E-sélectine suite à la stimulation des cellules endothéliales par du TNF-α à 10 ng/mL (noir) pendant 6 h, en comparaison à des cellules non stimulées (gris). L'expression des ARNm des gènes a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les flèches indiquent les barres sans TNF-α. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=2, ** $p \leq 0,01$ *versus* milieu.

Dans un premier temps, nous pouvons observer que l'expression relative de ces deux gènes dans des cellules quiescentes (non stimulées) est quasiment nulle (i.e. 0,14 pour ICAM-1 et 0,32 pour E-sélectine). Le TNF-α augmente plus de 900 fois la transcription d'ICAM-1 et plus de 500 fois celle d'E-sélectine. Ces résultats montrent bien que les amorces choisies, ainsi que la technique elle-même, se prêtent bien à l'étude de la variation de ces gènes d'inflammation sur la cellule endothéliale.

Afin de mettre en évidence notre capacité à détecter une augmentation de la transcription du gène de la eNOS, nous avons stimulé les cellules endothéliales avec de la lysophosphatidylcholine (LPC) pendant 6 heures, à une concentration finale de 100 µM. La LPC, une lipoprotéine impliquée dans la formation des plaques d'athérome et des lésions d'athérosclérose, a été décrite par Zembowicz *et al*. Comme un facteur capable d'augmenter

la transcription de la eNOS dans des HUVEC (Zembowicz *et al*., 1995). Pour justifier ce mode d'action, ils ont émis l'hypothèse que l'induction de la eNOS, en provoquant une augmentation finale de la quantité de NO, participe à la protection vis-à-vis des lésions arthérosclérotiques. En effet, NO est connu pour être une molécule anti-athérogénique (Cooke, 2003). Nos études corroborent ces résultats. Elles montrent que la stimulation des HUVEC avec la LPC (Fig. 30) provoque une augmentation de 38 fois du niveau d'expression de l'ARNm de la eNOS, en seulement 6 h d'incubation.

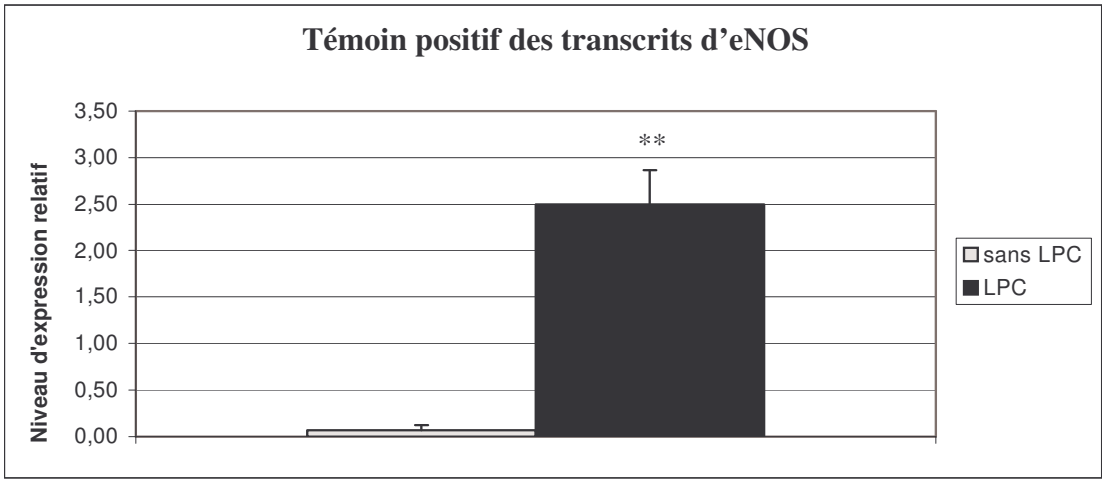


Fig. 30 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS suite à la stimulation des cellules endothéliales par la LPC à 100 µM pendant 6 h (noir) en comparaison à des cellules non stimulées (gris). L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ** $p \leq 0{,}01$ *versus* sans LPC.

La eNOS étant une enzyme exprimée constitutivement par la cellule endothéliale, il ne paraissait pas évident de réussir à montrer une activation de sa transcription. Nous pouvons donc conclure que notre système se prête tout à fait à l'étude de la modification du taux de transcription ou de stabilité de l'ARNm de la eNOS suite à la mise en présence d'HBOC et d'HUVEC, et ce, même si celle-ci est exprimée constitutivement par les cellules endothéliales.

Finalement, nous avons vérifié la capacité de notre protocole à mettre en évidence l'augmentation du nombre de transcrits gène de l'HO-1. Les HUVEC ont été incubées en présence d'hémine (hème en Fe^{3+}) pour une concentration finale de 1 µM pendant 16 h. Comme l'HO-1 favorise la dégradation de l'Hb libre présente dans le sang, nous avons émis l'hypothèse que le contact d'HUVEC avec de l'hémine permettrait d'augmenter le taux de transcription d'HO-1. Nos résultats montrent que le niveau d'expression relatif des ARNm d'HO-1 en présence d'hémine (Fig. 31) est nettement supérieur (20 fois) à celui en absence

d'hémine. Cette méthode pourrait donc nous permettre de mettre en évidence une éventuelle détection de l'Hb libre par les HUVEC.

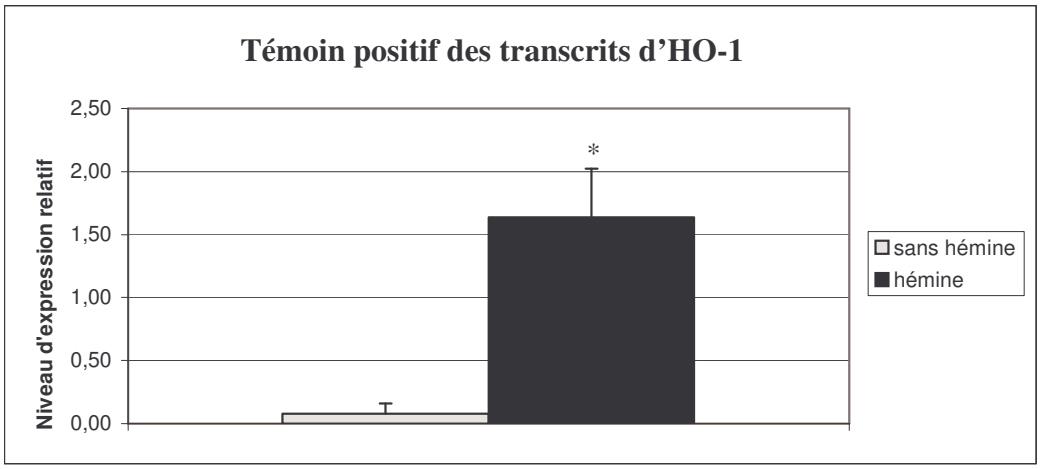


Fig. 31 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 suite à la stimulation des cellules endothéliales par de l'hémine à 1 µM pendant 16 h (noir) en comparaison à des cellules non stimulées (gris). L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$ *versus* milieu.

I.2. Evaluation de l'expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine par cytométrie en flux :

Nous avons utilisé la CMF afin de quantifier l'inflammation des HUVEC en réponse à un stress. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux protéines membranaires ICAM-1 et E-sélectine. Afin de vérifier le bon choix des anticorps et le réglage du cytomètre, nous avons stimulé les HUVEC avec du TNF-α pendant 16 h. La quantification du nombre de sites pour chaque récepteur (Fig. 32) a été rendue possible par l'utilisation d'un kit de calibration (Qifikit, Dako). Le TNF-α augmente de 2,3 et 1,8 fois, respectivement, l'expression membranaire d'ICAM-1 et de la E-sélectine.

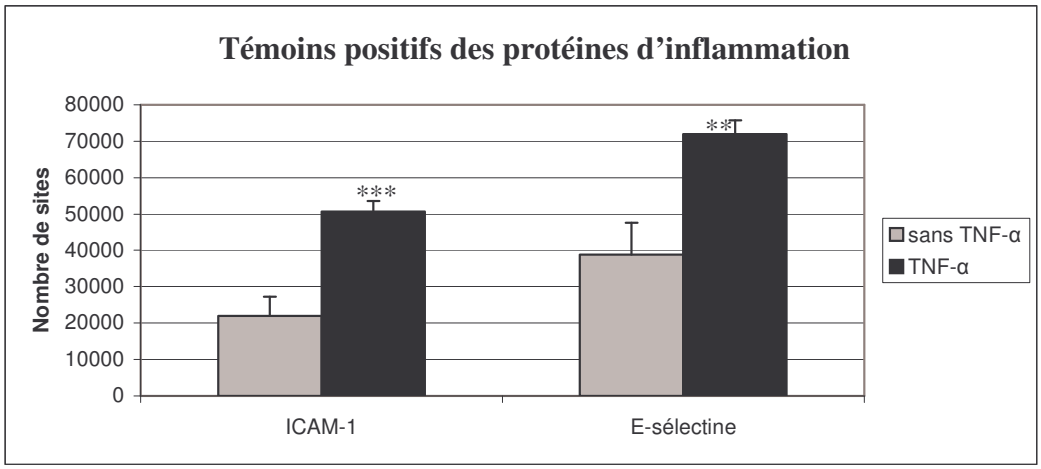


Fig. 32 : Nombre de site d'expression des récepteurs membranaires ICAM-1 et E-sélectine avant (gris) et après (noir) stimulation au TNF-α à 10 ng/mL pendant 16 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ *versus* milieu.

L'ensemble des résultats de ces contrôles positifs confirme que nous possédons un outil sensible et capable de détecter une réaction des cellules endothéliales au stress potentiel induit par la présence d'HBOC. Nous avons, par la suite, voulu vérifier l'influence de l'application de contraintes de cisaillement sur les réactions spécifiques décrites ci-dessus.

II. Influence des contraintes de cisaillement sur le comportement des cellules endothéliales :

II.1. Modification de la morphologie et du profil d'expression des gènes :

Les résultats concernant la validation de l'impact du flux laminaire sur des HUVEC ont fait l'objet d'une publication dans *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (Clin. Hemorheol. Microcirc., 2007, 37:99-107.

Article 1 "In vitro impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile."-Impact *in vitro* de l'application de contraintes de cisaillement physiologique sur le profil d'expression des gènes de cellules endothéliales.

Synthèse de la publication : Afin de déterminer l'impact des contraintes de cisaillement imposées par un flux laminaire sur la cellule endothéliale, nous avons adapté une technique permettant de mettre en évidence une modification morphologique ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette des cellules. Nous avons mesuré l'expression de l'ARNm de gènes impliqués dans l'inflammation (ICAM-1 et E-sélectine), la vasomotricité (eNOS) et le stress oxydatif (HO-1). Les HUVEC ont été cultivées 6h sous cisaillement laminaire à 1 Pa à 37°C et les résultats morphologiques et génomiques ont été comparés à un contrôle d'HUVEC cultivées en condition statique à 37°C.

L'étude de la modification morphologique cellulaire nous a permis de mettre en évidence que 6 h de culture sous ces contraintes de cisaillement suffisaient à orienter les HUVEC dans le sens du flux engendré par la circulation du milieu de culture. De plus, le marquage à la phalloïdine Alexa® 488 et l'observation en microscopie confocale ont confirmé la réorientation du cytosquelette dans le sens du flux. De ces deux observations, nous pouvons conclure qu'un cisaillement laminaire de 1 Pa pendant 6 h suffit pour que la cellule endothéliale ressente et réagisse à la contrainte. La suite de nos travaux sur le cisaillement s'appuiera donc sur ce protocole.

La deuxième partie de cette publication concerne l'étude du profil d'expression des HUVEC après culture sous contraintes de cisaillement laminaire. Cette étude a été menée par qRT-PCR sur quatre gènes différents. Il a été mis en évidence une augmentation d'ICAM-1 et E-sélectine de 31 et 15 fois, respectivement, après 6 h de contraintes de cisaillement laminaire

de 1 Pa, comparé au contrôle statique. L'étude du gène impliqué dans la vasomotricité met en évidence un niveau d'expression relatif de la eNOS après culture en condition dynamique 17 fois supérieur au niveau basal. HO-1, impliquée dans le stress oxydatif, montre une forte induction (124 fois) par les contraintes de cisaillement.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que le protocole de culture sous contraintes de cisaillement laminaire semble approprié pour notre étude de l'impact des substituts érythrocytaires sur les HUVEC. En effet, puisque les gènes communément impliqués dans les effets de l'Hb sur les cellules endothéliales sont aussi régulés par la contrainte de cisaillement, nous avons envisagé d'associer les deux effets pour se rapprocher au plus près des conditions cliniques.

II.2. Modification de l'expression des protéines membranaires inflammatoires :

Afin d'approfondir l'étude de l'inflammation potentiellement induite par les HBOC sur les cellules endothéliales, nous nous sommes intéressés à la variation d'expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine. Les HUVEC ont été placées sous contraintes de cisaillement à 1 Pa pendant 6 h, puis immédiatement étudiées pour la quantification des sites ICAM-1 et E-sélectine par cytométrie en flux. Les résultats présentés fig. 33 mettent en évidence, en conditions statiques, une faible expression membranaire, en quantité équivalente d'ICAM-1 et d'E-sélectine.

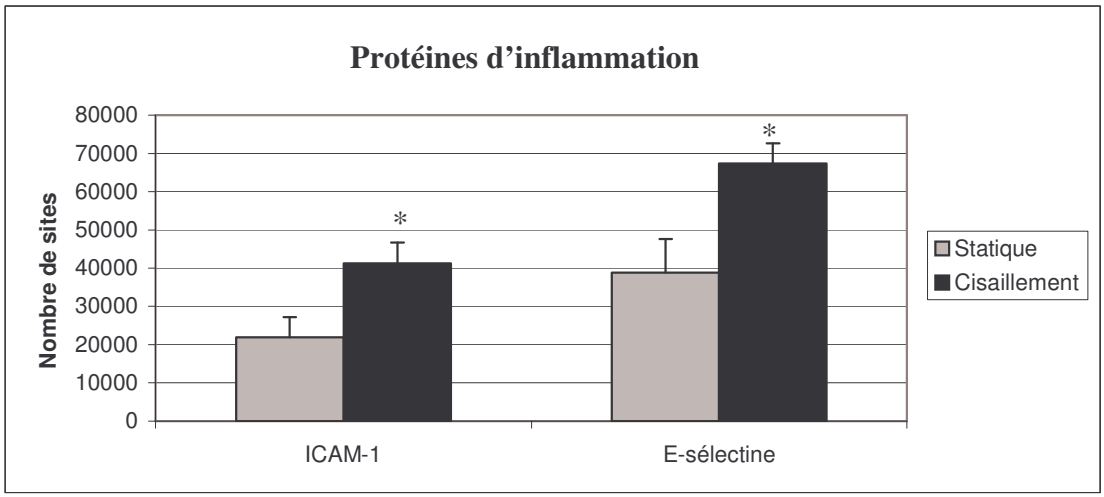


Fig. 33 : Nombre de site d'expression des récepteurs membranaires ICAM-1 et E-sélectine en condition statique (gris) et sous contraintes de cisaillement (noir). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$ *versus* statique.

Nous pouvons observer, après cisaillement, une induction équivalente d'ICAM-1 et d'E-sélectine (1,88 et 1,7 fois respectivement) comparée au contrôle en condition statique. Cependant, la E-sélectine reste davantage exprimée par la cellule endothéliale qu'ICAM-1 (1,7 fois plus). Ces résultats confirment en partie ceux de Morigi et coll. qui ont mis en

évidence une augmentation de l'expression membranaire d'ICAM-1 sur des HUVEC stimulées 6 h par le flux laminaire, alors que la E-sélectine n'est pas modifiée (Morigi *et al*. 1995). Cependant, leur technique de culture utilise un appareil muni d'un cône et d'un plateau, très différent du nôtre, ce qui pourrait expliquer cette différence.

II.3 Production de NO :

NO est un composé instable dans le milieu et est rapidement transformé en nitrite (NO_2^-). Sa production par la cellule endothéliale est, en autre, sensible aux contraintes de cisaillement et permet le relâchement des cellules musculaires lisses afin de dilater le vaisseau sanguin (Wessells *et al*., 2006). Cependant, après 6 h de culture sous contraintes de cisaillement à 1 Pa, les HUVEC ne produisent pas plus de nitrite que lorsqu'elles sont cultivées en condition statique (Fig. 34). Ceci va à l'encontre de nos espérances, puisque l'application de contraintes de cisaillement sur les cellules endothéliales est supposée engendrer une vasodilatation par l'intermédiaire de la production de NO (Arnal *et al*., 1999). Cependant, notre résultat présente un grand intérêt dans l'étude de l'impact des HBOC sur les cellules endothéliales soumises à un flux laminaire, puisqu'ils sont supposés être responsables de la déplétion de NO dans la circulation sanguine et donc d'un effet secondaire majeur de leur injection : l'hypertension (Tsai *et al*., 2006).

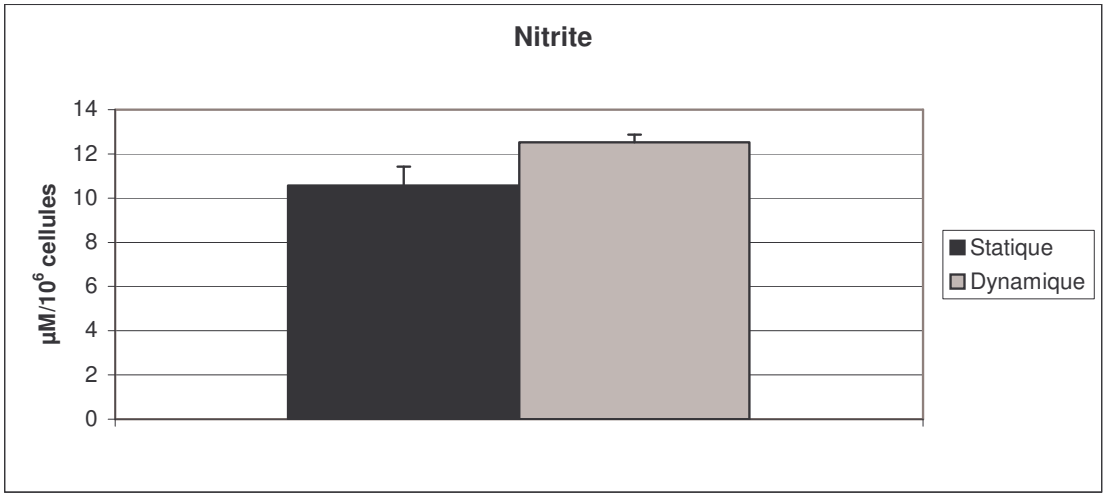


Fig. 34 : Production de nitrite dans le milieu de culture pour 10^6 HUVEC cultivées 6 h en condition statique (gris) ou dynamique (noir) (1 Pa). Le dosage est réalisé à l'aide du réactif de Griess (Molecular Probes®, Invitrogen, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$ *versus* statique.

III. Discussion :

Dans la première partie de cette étude, nous avons voulu valider deux paramètres majeurs utiles à la réalisation de notre travail, à savoir les techniques d'investigation sur les cellules endothéliales comme la qPCR et la CMF, et l'influence des contraintes de cisaillement sur les HUVEC.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence la variation de transcription de quatre gènes différents par qPCR en présence d'effecteurs spécifiques. En effet, l'induction des gènes d'inflammation (ICAM-1 et E-sélectine), de celui impliqué dans la vasomotricité (eNOS) et de détection du stress oxydatif (HO-1) par des effecteurs connus (TNF-α, lysophophatidylcholine et hémine respectivement) a pu être confirmée par notre protocole. Dans un deuxième temps, nous avons vérifié qu'il nous était possible d'observer une augmentation de l'expression membranaire des protéines inflammatoires ICAM-1 et E-sélectine par cytométrie en flux, sous stimulation au TNF-α afin de valider les réglages du cytomètre (pour la détection) ainsi que le protocole de stimulation et de marquage (pour l'augmentation de fluorescence).

La dernière étape de ces mises au point est la validation de l'impact des contraintes de cisaillement sur les HUVEC. Nous avons montré que 6 h de culture sous flux laminaire à 1 Pa suffisaient à mettre en évidence la réaction précoce des HUVEC à ces contraintes et permettait l'étude de différents facteurs. En effet, 1 à 6 h de cisaillement provoquent une régulation des gènes comportant dans leur promoteur un *shear stress response element* (SSRE) comme les NO synthases et ICAM-1 (Davies *et al*., 1997 ; Resnick *et al*., 1993). De plus, à partir de 6 h, le remodelage cellulaire par réorganisation de la surface et l'alignement cellulaire débutent (Dewey *et al*., 1981 ; Wechezak *et al*., 1985). Il nous a donc paru évident que 6 h de contraintes de cisaillement sur nos cultures d'HUVEC suffisaient à observer un large panel d'événements dus aussi bien à la réponse de la cellule endothéliale aux HBOC, comme l'activation d'ICAM-1, de la E-sélecine, de la eNOS et HO-1 (Wagener *et al*., 1997 ; Babu *et al*., 2007) qu'à la présence de contraintes.

De plus, nous avons confirmé que le cisaillement laminaire provoquait l'induction des 4 gènes choisis. Les gènes inflammatoires ICAM-1 et E-sélectine, impliqués respectivement, dans les phases d'adhésion ferme et de *rolling* des leucocytes pendant la diapédèse, sont induits par les contraintes de cisaillement. Cette régulation avait été démontrée par Montgomery *et al*. et Wertheimer et ses collaborateurs (Montgomery *et al*., 1991 Wertheimer

et al., 1992). Cependant, Nagel et son équipe ont mis en évidence par *Northern Blot*, une induction d'ICAM-1 entre 2 à 8 h de culture sous contraintes de cisaillement, tout en démontrant que la E-sélectine n'y était pas sensible (Nagel *et al*., 1994). Ces résultats s'opposent au nôtre, mais la technique de *Western Blot* est moins sensible que la qPCR. D'autant que l'induction de la E-sélectine relevée dans nos résultats est moins prononcée que celle d'ICAM-1. Nous pouvons supposer qu'elle était trop faible pour être détectée par la technique utilisée par Nagel *et al*. Par ailleurs, contrairement au gène de la E-sélectine, le gène d'ICAM-1 possède dans son promoteur une séquence SSRE (Degitz *et al*., 1991 ; Ziegler *et al*., 1998). Nous pouvons donc supposer, à la lumière de tous ces résultats, que les voies d'activation d'ICAM-1 et E-sélectine sont différentes. ICAM-1 serait induite directement par le cisaillement, alors que la transcription du gène de la E-sélectine pourrait l'être par le stress oxydatif (Ichikawa *et al*., 2004) généré par le cisaillement appliqué aux cellules endothéliales (Laurindo *et al*., 1994).

Nous avons aussi voulu étudier un gène impliqué dans la vasomotricité. La NO synthase endothéliale (eNOS) est une enzyme constitutivement exprimée par les cellules endothéliales, responsable de la production de NO impliqué dans la régulation de la vasomotricité en jouant sur la relaxation des cellules musculaires lisses. Il a été démontré que les contraintes de cisaillement provoquaient une induction de la transcription de la eNOS (Weber *et al*., 2005). En effet, si ces contraintes augmentent au niveau des cellules endothéliales, le vaisseau sanguin se dilate pour rétablir le flux sanguin au niveau basal. Notre étude montre que, sous contraintes de cisaillement de 1 Pa pendant 6 h, la cellule endothéliale augmente la transcription ou la stabilité de l'ARNm de eNOS. Cependant, nous n'avons observé aucune surproduction de NO par les HUVEC cultivées dans ces conditions. Ceci suggère que les contraintes de cisaillement de 1 Pa imposées aux HUVEC induisent une surexpression de eNOS à 6 h, ce qui pourrait augmenter la synthèse de NO *a posteriori* et provoquer à plus long terme une vasodilatation. Puisque ces résultats sont cohérents avec la littérature (Han *et al*., 2001) et l'homéostasie classique du vaisseau, nous avons conclu que notre système s'adaptait aussi à l'étude de l'impact cisaillement/vasomotricité.

Finalement, nous avons abordé la transcription d'un gène important dans le métabolisme de l'hémoglobine : l'hème oxygénase 1 (HO-1). Bien que notre système n'incluait pas, à ce stade, l'utilisation d'hémoglobine, l'induction d'HO-1 a pu être observée sur des HUVEC après l'application de contraintes de cisaillement de 1 Pa pendant 6 h. Ce résultat peut s'expliquer grâce à des études précédentes qui concluent que HO-1 est une protéine sensible à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Appelgate *et al*., 1991 ;

Keyse *et al*., 1989). Or, nous savons que les contraintes de cisaillement génèrent la formation de ces mêmes espèces (Hsieh *et al*., 1998). Donc, dans notre cas, HO-1 n'est pas induite par la présence d'hémoglobine, mais peut-être par les espèces réactives de l'oxygène produites par les cellules endothéliales soumises aux contraintes de cisaillement. Ceci signifie que, dans la suite de nos études, nous tiendrons compte de cette implication du flux laminaire dans la transcription de HO-1.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la réponse inflammatoire de la cellule endothéliale aux contraintes de cisaillement. L'expression membranaire des marqueurs inflammatoires, tels que ICAM-1 et E-sélectine, a été quantifiée par immunofluorescence et cytométrie en flux. Nous avons montré que ces protéines étaient toutes deux surexprimées au niveau membranaire après 6 h de culture dynamique à 1 Pa en comparaison à une culture en condition statique. Cette induction ne peut, en aucun cas, traduire une néosynthèse de protéine car, généralement 6 h de stress ne sont pas suffisantes pour observer ce phénomène. En effet, il a été montré que la traduction d'ICAM-1 n'était amplifiée qu'à partir de 12 h d'exposition aux contraintes de cisaillement (Morigi *et al*., 1995, Sampath *et al*., 1995). Nous sommes donc devant un phénomène de « destockage » des protéines synthétisées pour pallier une possible réaction inflammatoire. La E-sélectine étant plus fortement induite qu'ICAM-1, nous confirmons son implication dans les phases précoces de la diapédèse, à savoir adhésion et *rolling* (Nishiwaki *et al*. 2003) alors qu'ICAM-1 est plus fortement impliquée dans l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium.

Les contraintes de cisaillement imposées par un flux laminaire activent les cellules endothéliales sur le plan inflammatoire, des facteurs de vasomotricité et du stress oxydatif. Il paraît donc intéressant d'observer comment les contraintes de cisaillement et la présence d'HBOC interagissent sur les cellules endothéliales. Cette étude nous renseignera sur la relation cellules endothéliales/HBOC dans des conditions telles qu'elles pourraient se trouver à la suite d'une restauration du volume sanguin.

Partie I-B

Contraintes de cisaillement et interaction cellule endothéliale/substitut sanguin à base d'hémoglobine

Dans les vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales sont soumises à différentes contraintes appliquées par le flux sanguin. Parmi celles-ci, les contraintes de cisaillement sont engendrées par le frottement du sang et de ses composants sur les cellules endothéliales. Suite à une hémorragie prononcée, le volume sanguin étant fortement diminué, le flux sanguin, dans certains territoires, va se ralentir et l'ischémie s'y installer. L'injection d'un substitut érythrocytaire en restaurant, entre autres la volémie, va rétablir le flux sanguin et donc les contraintes de cisaillement. Il paraît donc nécessaire d'étudier l'implication de l'injection d'un tel produit exogène et du retour du flux. Ce sont ces phénomènes que nous avons tenté de modéliser au travers de la culture simultanée de cellules endothéliales sous contraintes de cisaillement en présence de différents substituts sanguins.

Ainsi, nous pourrons accéder à différents paramètres, comme l'oxydation du fer contenu dans l'hémoglobine, ainsi que sa structure quaternaire et, finalement, les réactions des cellules endothéliales (inflammation, vasomotricité et stress oxydatif).

I. Stabilité de l'hémoglobine soumise aux contraintes de cisaillement vis-à-vis de l'oxydation :

L'oxydation du fer contenu dans l'hémoglobine est une réaction en chaîne qui peut oxyder l'hème lui-même et provoquer la formation d'hémoglobines modifiées par oxydation. De plus, la metHb, en induisant un stress oxydatif, peut provoquer une réaction inflammatoire et l'induction de l'hème oxygénase I, par exemple.

I.1. Détermination de l'état d'oxydation de l'hémoglobine ou concentration en metHb :

L'hémoglobine est une protéine qui, grâce à l'hème qu'elle contient, absorbe la lumière dans toute la zone visible du spectre. Sa signature spectrale y est caractéristique des différentes formes qu'elle peut présenter : OxyHb, HbCO, Hb ferreuse, Hb ferrique (metHb) et ferrylHb. La metHb présente un pic caractéristique à 630 nm. Ainsi, en suivant l'évolution du pic à 630 nm dans les différentes conditions de culture, avec les différentes solutions utilisées, nous avons pu calculer la concentration en metHb des échantillons.

Le pourcentage de metHb a été mesuré après incubation de l'Oxyglobin® et de l'Hb-Dex-BTC pendant 6 h au contact d'HUVEC cultivées en conditions statique ou sous contraintes de cisaillement à 1 Pa. L'incubation pendant 6 h en présence d'O_2 (20%) augmente considérablement la proportion de metHb pour les deux types d'Hb (Tableau VIII).

Tableau VIII : Pourcentage de metHb présent dans les solutions d'Oxyglobin® et d'Hb-Dex-BTC incubées avec des cellules endothéliales cultivées 6 h en conditions statique ou sous contraintes de cisaillement à 1 Pa. n=3.

		% MetHb
Oxyglobin®	Stock	9 ± 9
	Statique (6 h)	33± 5
	Cisaillement (6 h)	27± 7
Hb-Dex-BTC	Stock	9 ± 6
	Statique (6 h)	26 ± 4
	Cisaillement (6 h)	24 ± 4

Cependant, l'application de contraintes de cisaillement ne provoque pas d'augmentation de la concentration de metHb. Les deux Hb présentent de 25 à 30% de metHb après incubation, taux relativement important au regard des 10% pour un HBOC généralement admis par l'organisme (20% maximum en physiologie) (Linberg *et al*., 1998 ; Kinoshita *et al*., 2007).

I.2. Quantification de l'hème modifiée par oxydation (HPLC) :

L'hémoglobine peut être modifiée par oxydation, pour former l'OxHm. Le chromatogramme à 400 nm nous renseigne sur la présence d'espèces contenant de l'hème libre (Fig. 35).

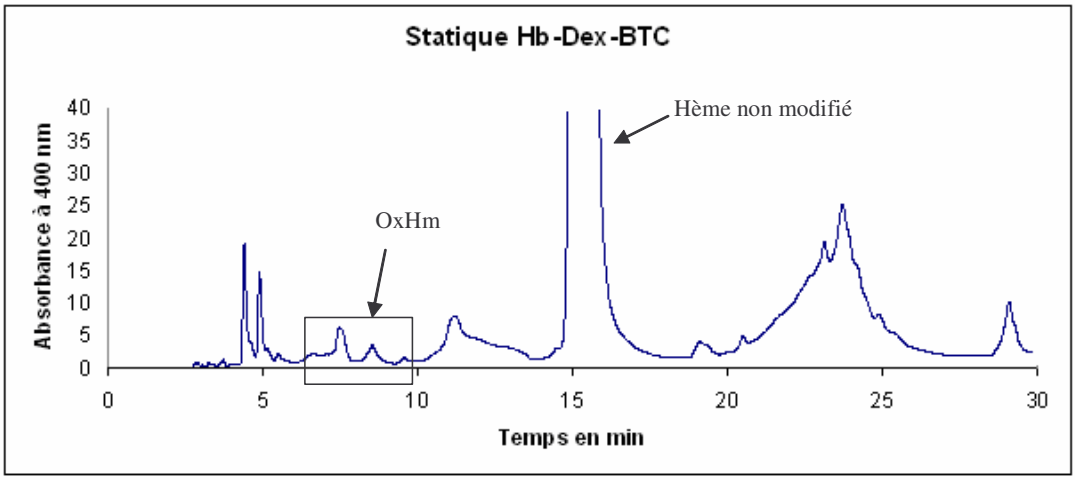


Fig. 35 : Chromatogramme à 400 nm obtenu par HPLC d'un échantillon d'Hb-Dex-BTC après incubation 6 h, en condition statique, au contact d'HUVEC. L'échelle a été agrandie pour permettre une meilleure visualisation des pics d'OxHm.

A 16 min, le pic de forte absorbance est de l'hème non modifié. Entre 6 et 9 min, on observe trois pics d'hèmes modifiés par oxydation (OxHm). Le pourcentage d'OxHm a été mesuré dans les solutions stocks d'Hb-Dex-BTC et d'Oxyglobin®. Il est respectivement de 0,12 et

0,16%. Lorsque ces solutions sont incubées 6 h au contact des HUVEC en condition statique, le pourcentage d'OxHm ne varie pas pour l'Oxyglobin® et diminue légèrement pour l'Hb-Dex-BTC (Fig. 35). Cependant en condition de culture dynamique, il diminue significativement pour l'Hb-Dex-BTC et davantage pour l'Oxyglobin® (Fig. 36).

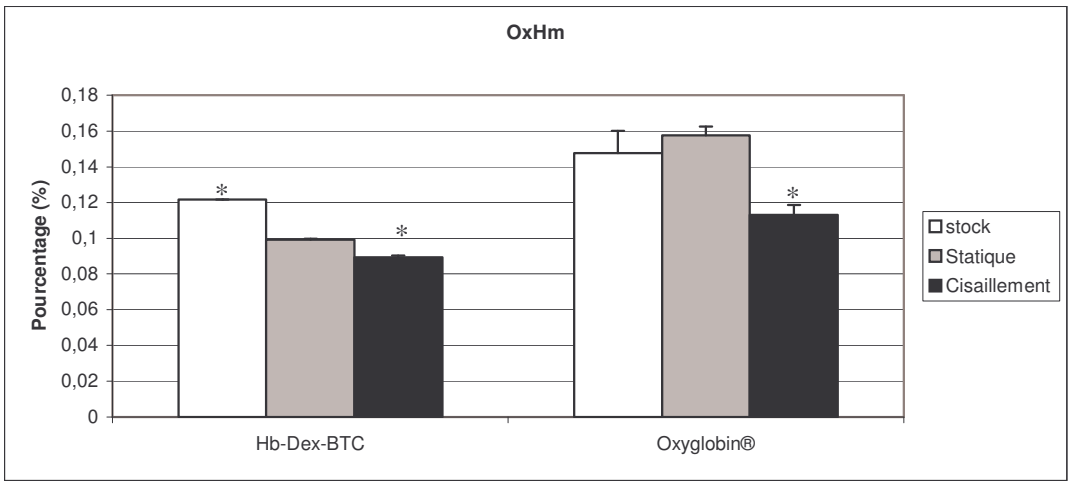


Fig. 36 : Evolution du pourcentage d'hémoglobine modifiée par oxydation (OxHm) en conditions statique (noir) ou dynamique (gris). n=2 ; *p ≤ 0,05 *versus* statique.

I.3. Détermination de la conformation du fer hémique :

Par RPE, nous avons déterminé les différents niveaux d'oxydation du fer contenu par le noyau hémique, après incubation d'Hb-Dex-BTC ou d'Oxyglobin® au contact d'HUVEC en culture statique ou sous contraintes de cisaillement. Cette technique permet aussi d'étudier les variations de coordination du fer ainsi que sa conformation, et de détecter la présence d'HbNO.

Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de détecter la présence d'HbNO (Tab. IX). Cependant, les deux formes de spin (*high* et *low*) du fer de l'hème ont pu être mises en évidence. La forme *high* spin est majoritaire (80-90%) quel que soit la solution d'hémoglobine considérée. Elle correspond à la metHb, mais ces résultats ne signifient pas pour autant que nos échantillons contiennent 80% de metHb, mais que 80% des formes détectables en RPE sont de la metHb sous forme *high* spin. Les formes hémichromes, qui sont aussi de la metHb, sont détectables sous formes de traces. Parmi les formes *high* spin, on peut remarquer que la configuration tétragonale est la plus représentée dans nos échantillons comme dans l'hémoglobine naturelle (Levy *et al*., 1990). Lorsque l'Hb-Dex-BTC est mise en contact avec des HUVEC sous contraintes de cisaillement, on observe une augmentation de la forme rhombique de type 1, alors que cette même forme est largement présente (30%) dans toutes les conditions pour l'Oxyglobin®.

Tableau IX : Résultats de RPE représentant la répartition des différentes formes de l'hème et du niveau d'oxydation du fer. n=3 sauf pour Hb-Dex-BTC statique et flux.

		Formes *High* spin de l'Hb en %				OH hémichromes *low* spin (LS3) en %				His-hémichromes *low* spin en %			
		Tétragonal	Rhombique type 1	Rhombique type 2	Total	LS3-1	LS3-2	LS3-3	Total	His-1	His-2	His-3	Total
Hb-Dex-BTC	Stock	77,2±4,1	1,1±0,8	2,0±1,4	80,4±1,9	7,6±1,8	0,0±0,0	0,0±0,0	7,6±1,8	12,0±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,1
	Statique	83	0	0	83	3	0	0	3	14	0	0	14
	Cisaillement	55	35	0	90	0	0	1	1	0	0	9	9
Oxyglobin®	Stock	63,7±1,7	12,1±5,9	6,5±4,4	82,3±3,3	0,0±0,0	8,8±1,7	0,0±0,0	8,8±1,7	7,5±2,8	1,27±1,27	0,0±0,0	8,8±1,7
	Statique	63,7±3,7	28,4±2,5	2,2±1,9	94,4±0,1	1,0±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0±0,1	0,0±0,0	4,6±0,0	0,0±0,0	4,6±0,0
	Cisaillement	57,3±1,2	34,9±0,9	0,0±0,0	92,2±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,9±0,1	0,9±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	6,9±0,4	6,9±0,4

II. Comportement des cellules endothéliales soumises aux contraintes de cisaillement en présence d'HBOC :

Nous avons précédemment montré que les contraintes de cisaillement induisaient l'activation des cellules endothéliales, tant sur le plan inflammatoire que sur l'activation de gènes impliqués dans la vasomotricité et de la gestion du stress oxydatif engendré par de l'hémoglobine libre circulante. L'impact de l'addition d'un substitut sanguin à base d'Hb dans un système de culture sous contraintes de cisaillement reste, jusqu'à présent, inconnu. Leurs effets ont donc été évalués afin de mieux connaître les interactions potentielles substitut/cellules endothéliales au moment de la reperfusion.

II.1. Régulation du tonus vasculaire et de la concentration d'Hb libre :

II.1.1. Régulation du tonus vasculaire :

L'un des effets secondaires de l'injection d'HBOC est une augmentation de la pression artérielle due à une vasoconstriction. Il a été supposé que ce phénomène était imputable à la capacité de l'Hb de piéger NO. En effet, l'Hb a une affinité 500 à 800 fois plus élevée pour NO que pour O_2. Afin de mesurer l'impact de l'Hb-Dex-BTC et de l'Oxyglobin® sur la vasoconstriction, nous avons mesuré la quantité de NO produite par des HUVEC cultivées 6 h en condition statique ou dynamique (cisaillement à 1 Pa) avec l'une ou l'autre des solutions. NO est produit par la eNOS, donc la variation du taux de transcription de son gène fait partie des réactions visant à modifier la quantité de NO biodisponible dans la circulation sanguine.

Mesure de la variation du taux de nitrite-nitrate relargué par les cellules endothéliales :

Du fait de sa faible stabilité dans le milieu, NO est un composé difficile à quantifier. Il est, en effet, rapidement transformé en nitrite (NO_2^-). De plus, en présence d'Hb, le nitrite est transformé en nitrate (NO_3^-). Nous avons donc mesuré les variations de concentration en nitrate et en nitrite en fonction du substitut utilisé et des conditions de culture de HUVEC (statique *versus* flux laminaire).

La concentration en nitrite n'est pas influencée par les contraintes de cisaillement (6 h à 1 Pa) quel que soit le substitut sanguin présent dans le milieu (Fig. 37). Cependant, une diminution significative des nitrites est observée lorsque les HUVEC sont cultivées en présence de substitut sanguin (statique et dynamique), y compris le Voluven®. Ces résultats ne sont pas surprenants pour les HBOC (Hb-Dex-BTC et Oxyglobin®) puisque les nitrites sont transformés en nitrates en présence d'hémoglobine. Pour Voluven®, solution ne comportant pas d'hémoglobine, on reste perplexe et on peut penser que la diminution du nitrite passerait par un autre mécanisme encore inconnu.

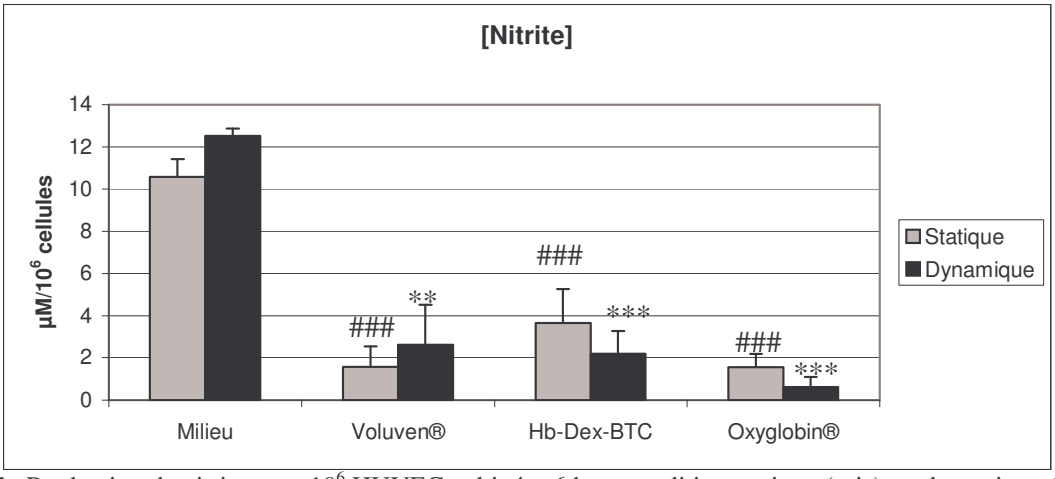


Fig. 37 : Production de nitrite pour 10^6 HUVEC cultivées 6 h en condition statique (gris) ou dynamique (noir) (1 Pa) en présence de milieu ou de substitut sanguin. Dosage à l'aide du réactif de Griess (Molecular Probes®, Invitrogen, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ** $p \leq 0,01$; ***$p \leq 0,001$ *versus* dynamique milieu, ### $p \leq 0,001$ *versus* statique milieu.

La concentration en nitrate, mesurée dans les milieux de culture après incubation des HUVEC en condition statique ou dynamique en présence ou en absence de substitut sanguin, présente une évolution inverse de la concentration en nitrite (Fig. 38). En effet, si les cellules sont cultivées en présence de milieu, une très faible quantité, voire une quantité nulle, de nitrate est détectée, et ce, quelles que soient les conditions de culture. En présence de substitut sanguin, les concentrations en nitrate sont nettement supérieures. Si on considère les culture en condition dynamique, les concentrations de nitrate sont croissantes du Voluven® aux substituts à base d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC et Oxyglobin®). Ces résultats inversés par rapport à la concentration en nitrite, confirment que l'hémoglobine transforme les nitrites en nitrates et que le Voluven® semble avoir la même action. Cependant, aucune différence significative entre les concentrations de nitrate en présence des deux HBOC n'a pu être mise en évidence. En condition statique, des conclusions identiques peuvent être formulées.

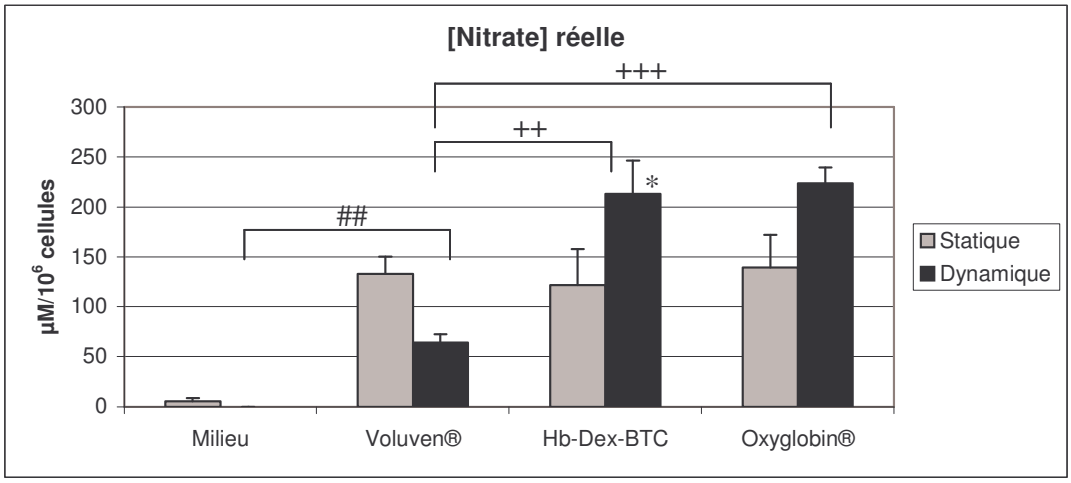


Fig. 38 : Production de nitrate pour 10^6 HUVEC cultivées 6 h en condition statique (gris) ou dynamique (noir) (1 Pa) en présence de milieu ou de substitut sanguin. Dosage réalisé à l'aide du réactif de Griess (R&D system, France) après action de la nitrate réductase (R&D system, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$ *versus* statique ; ## $p \leq 0,01$ *versus* dynamique milieu ; ++ $p \leq 0,01$et +++ $p \leq 0,001$ *versus* dynamique Voluven®.

Si l'on considère la somme des concentrations en nitrite et en nitrate, on observe une large augmentation de celle-ci en présence de substituts sanguins à base d'hémoglobine, du fait de la concentration en nitrate « écrasante » par rapport à celle en nitrite.

Variation du taux d'ARNm de la eNOS :

Combinée au dosage de NO, la mesure des variations de la transcription de la eNOS est un indicateur d'importance dans l'étude de la vasomotricité. Les contraintes de cisaillement (6 h, 1 Pa) imposées aux HUVEC induisent une augmentation significative (17 fois) de la transcription de la eNOS (Fig. 39). En présence de Voluven® ou d'Hb-Dex-BTC, cette variation entre conditions statique et dynamique n'est plus observable. L'Oxyglobin® induit, en condition statique, une augmentation importante de la transcription de la eNOS comparé au Voluven® et à l'Hb-Dex-BTC. Cependant, en condition dynamique, cette surexpression est réduite, pour revenir à un niveau similaire à celui du milieu. Plus généralement, il semble que les substituts sanguins induisent une augmentation de la transcription de la eNOS en culture statique et que le flux laminaire a moins d'impact pour le Voluven® ou l'Hb-Dex-BTC que le milieu uniquement. Quant à l'Oxyglobin®, le flux laminaire semble diminuer la transcription ou la stabilité de l'ARNm de la eNOS.

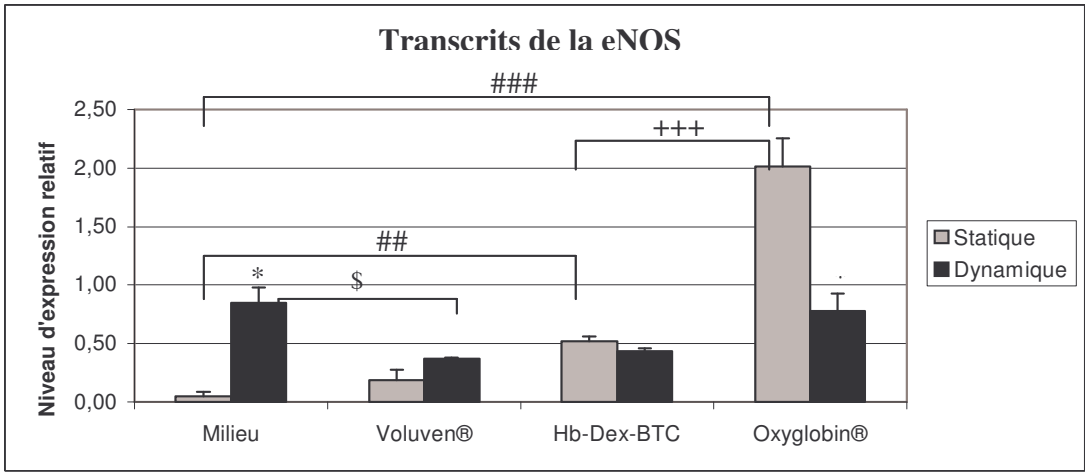


Fig. 39 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS après culture des cellules endothéliales en conditions statique pendant 6 h (gris) ou dynamique (1 Pa, 6 h) (noir) en présence de différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$ *versus* statique ; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ *versus* statique milieu ; +++ $p \leq 0,001$ *versus* statique Hb-Dex-BTC ; $ $p \leq 0,05$ *versus* dynamique milieu.

II.1.2. Variation de la transcription de HO-1 :

L'injection d'un substitut sanguin à base d'hémoglobine augmente considérablement la quantité d'hémoglobine libre dans le sang. L'Hb libre étant un produit potentiellement toxique, capable d'induire un stress oxydatif, la cellule endothéliale réagit en augmentant sa production d'HO-1. Les HBOC utilisés dans notre étude sont modifiés pour limiter ce genre

de réaction. Afin de vérifier cette hypothèse, le taux de transcription de HO-1 a été mesuré en présence de solutions comportant ou non de l'hémoglobine, et dans deux conditions de culture cellulaire différentes (statique ou dynamique). Dans un premier temps, nous pouvons observer que la culture sous contraintes de cisaillement induit 125 fois la transcription de HO-1 par rapport au contrôle statique (Fig. 40). Cette induction est réduite à 21 fois en présence de Voluven® dans le système. En présence d'HBOC, la transcription de HO-1 est augmentée de 103 et 232 fois en condition statique comparée à la même culture en présence de Voluven®. Ce résultat a été aussi observé en condition dynamique. En condition dynamique, la présence d'Hb-Dex-BTC induit la même surexpression de HO-1 que du milieu seul. L'Oxyglobin® présente dans le système de culture sous contraintes de cisaillement, semble réprimer la transcription de HO-1 comparée à la culture en condition statique.

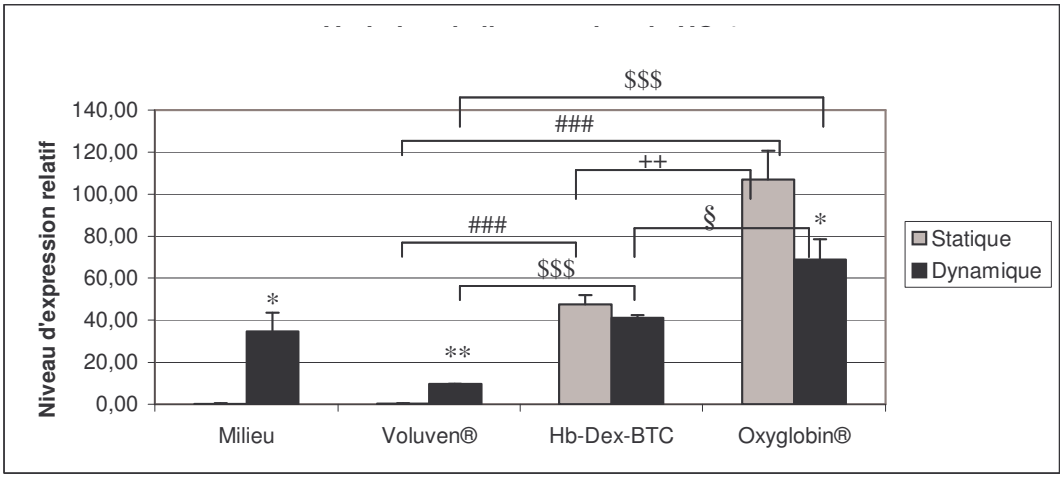


Fig. 40 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 après culture des cellules endothéliales en conditions statique pendant 6 h (gris) ou dynamique (1 Pa, 6 h) (noir) en présence de différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ *versus* statique ; ### $p \leq 0,001$ *versus* statique Voluven® ; ++ $p \leq 0,01$ *versus* statique Hb-Dex-BTC ; $$$ $p \leq 0,001$ *versus* flux Voluven® ; § $p \leq 0,05$ *versus* flux Hb-Dex-BTC.

II.2. Régulation des marqueurs d'inflammation :

Les résultats concernant la régulation des marqueurs d'inflammation sur des HUVEC cultivées sous contraintes de cisaillement en présence de trois substituts sanguins ont été soumis pour publication dans Transfusion.

Article 2 "Endothelial cells/blood substitutes: Involvement of shear stress in the inflammatory response."-Cellules endothéliales/substituts sanguins : implication des contraintes de cisaillement dans l'établissement de la réponse inflammatoire.

Synthèse de la publication : Afin de déterminer l'impact, au niveau inflammatoire de l'injection de substituts sanguins dans la circulation, nous avons soumis des cellules endothéliales aux contraintes de cisaillement et mesuré les variations de la transcription des

gènes codant pour ICAM-1 et E-sélectine et de l'expression membranaire de leurs protéines. Les substituts sanguins utilisés étaient de deux sortes, contenant, ou non, de l'hémoglobine, et donc transportant, ou non, l'O_2. Le Voluven® a donc servi de témoin non transporteur d'O_2, l'Hb-Dex-BTC et l'Oxyglobin® étaient nos deux solutions à base d'hémoglobine à tester.

La transcription d'ICAM-1 sous contraintes de cisaillement pour le Voluven® est équivalente à celle générée par ces seules contraintes (milieu) (Fig. 41 A). L'incubation des HUVEC avec les HBOC en condition statique augmente la transcription d'ICAM-1 comparé au Voluven®, alors que le flux laminaire en présence d'HBOC n'influence pas la réponse de la cellule endothéliale comparée aux conditions statiques.

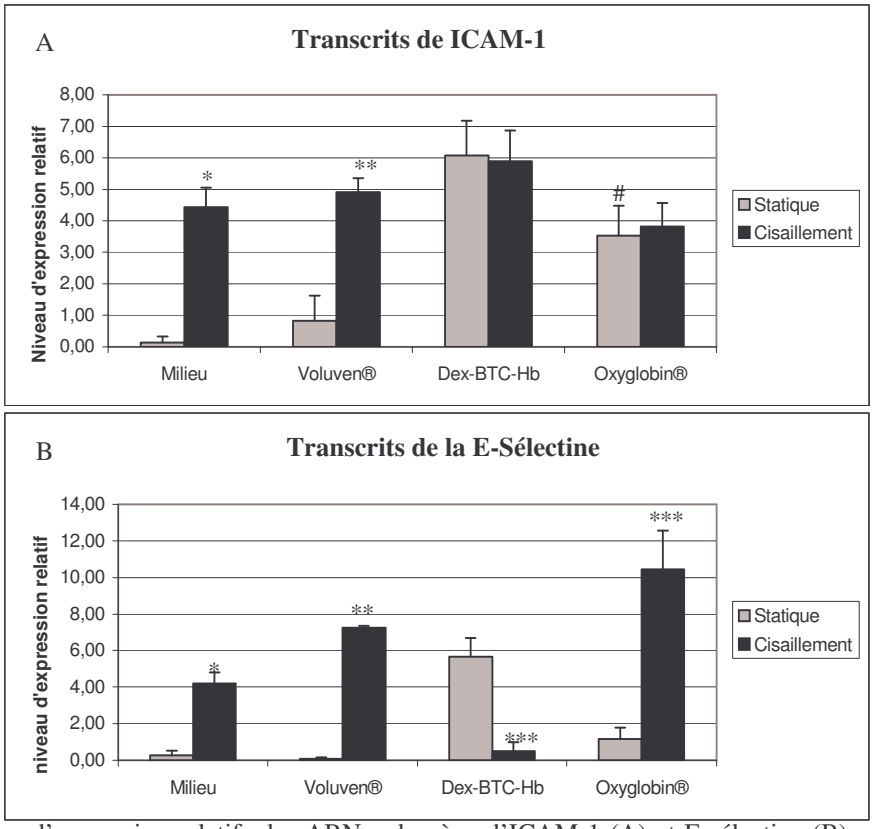


Fig. 41 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène d'ICAM-1 (A) et E-sélectine (B) après culture des cellules endothéliales en condition statique (gris) ou dynamique (noir) 6 h à 1 Pa. L'expression des ARNm des gènes a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ *versus* statique. # $p \leq 0,05$ *versus* statique Hb-Dex-BTC.

Les études menées sur la E-sélectine montrent que sa transcription peut être induite par les contraintes de cisaillement et que l'injection de Voluven® amplifie la réponse des cellules endothéliales (Fig. 41 B). En condition statique, la présence d'HBOC au contact des HUVEC provoque une sur-transcription du gène de la E-sélectine. Cependant, sous contraintes de cisaillement, nous observons un étrange phénomène. En effet, la transcription de la E-sélectine est augmentée par la présence d'Oxyglobin®, alors qu'en présence d'Hb-Dex-BTC, celle-ci est réprimée. Une hypothèse selon laquelle la combinaison entre la présence de dextran et de contraintes de cisaillement pourrait rendre furtive l'hémoglobine vis-à-vis des

cellules endothéliales peut être avancée. En effet, le dextran est connu pour inhiber l'adhésion des leucocytes à l'endothélium sous contraintes de cisaillement (Ley *et al*., 1989).

La même étude a été menée sur la variation d'expression membranaire d'ICAM-1 et d'E-sélectine (Fig. 42 A et 42 B). Nous avons pu observer que la culture des HUVEC sous contraintes de cisaillement augmentait significativement l'expression membranaire d'ICAM-1 (Fig. 42 A). Aucun des substituts testés n'a d'effet sur ICAM-1 comparé à celui engendré par le flux laminaire. L'expression membranaire de la E-sélectine est, elle aussi, augmentée par les contraintes de cisaillement (Fig. 42 B). Aucune différence n'est observée entre la culture en condition statique et dynamique quels que soient les substituts sanguins testés. Par contre, sous flux laminaire, l'expression membranaire de la E-sélectine est réprimée lorsque les HUVEC sont cultivées avec les substituts sanguins comparés au milieu de culture.

En conclusion, nous avons démontré que les contraintes de cisaillement influencent la réaction inflammatoire engendrée par la présence de substituts sanguins, dont un *plasma expander* (Voluven®) et deux HBOC (Hb-Dex-BTC et Oxyglobin®). Il paraît donc nécessaire d'étudier les comportements des substituts sanguins sous contraintes de cisaillement, afin de mieux appréhender les réponses des cellules endothéliales.

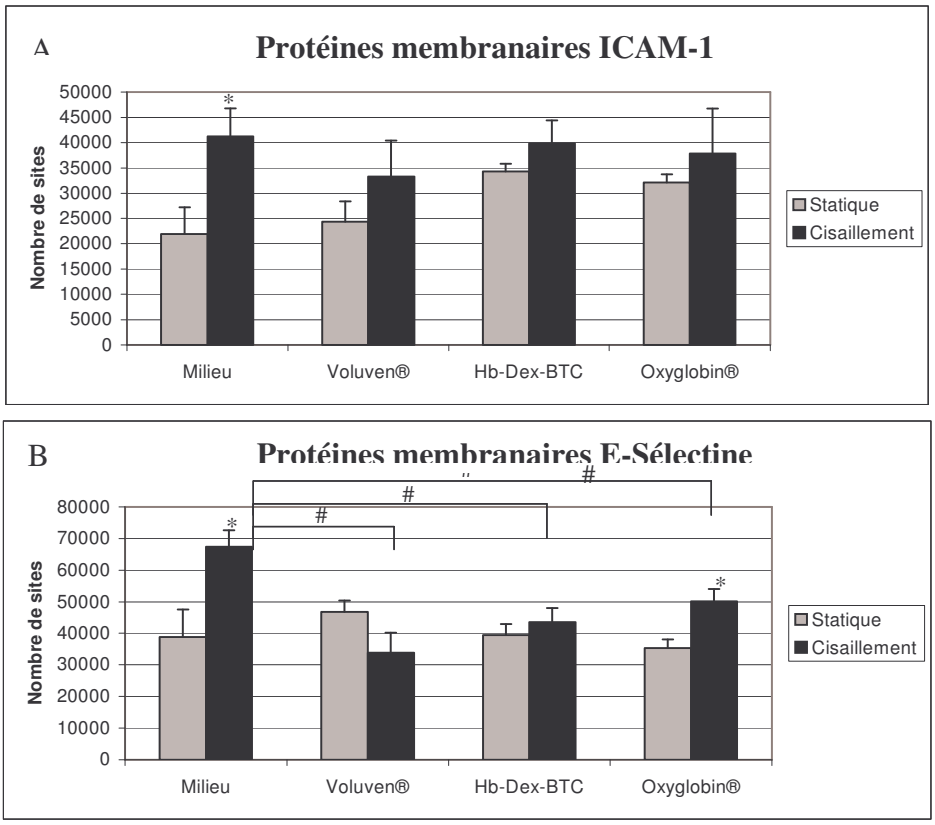


Fig. 42 : Nombre de site d'expression des récepteurs membranaires ICAM-1 et E-sélectine en condition statique (gris) et sous contraintes de cisaillement (noir). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$ *versus* statique ; # $p \leq 0,05$ *versus* milieu dynamique.

III. Discussion :

Cette première partie de l'étude visait à observer le comportement des HBOC au contact d'HUVEC cultivées en condition statique et d'étudier leur impact sur les cellules. Le stress oxydatif, la vasoconstriction et l'inflammation sont les trois réponses cellulaires majeures étudiées en présence de substituts sanguins à base d'hémoglobine.

Dans un premier temps, l'oxydation/stress oxydatif des solutions d'Hb-Dex-BTC et d'Oxyglobin® ont été mesurés par spectrophotométrie visible, HPLC et RPE. Nous avons pu observer, qu'après incubation au contact des HUVEC en condition statique ou dynamique, le taux de metHb augmentait considérablement, jusqu'à 25 à 30%, alors que les solutions stocks en contiennent peu. Cette autooxydation de l'hème contenu dans les solutions d'HBOC est due à la présence d'O_2 et à la température. La quantité de metHb obtenue après contact avec les HUVEC est supérieure à la limite de 10% du seuil de tolérance de l'organisme (Kinoshita *et al*., 2007). Cependant, notre milieu de culture ne contenant pas de systèmes de réduction, comme des enzymes antioxydantes, nous considérons que ce pourcentage n'est pas alarmant, car il serait certainement réduit *in vivo*. De plus, comme une large perte sanguine engendre une diminution drastique de la concentration de ces enzymes dans la circulation sanguine, notre système n'est finalement pas si éloigné de la réalité et permet d'étudier une réaction extrême de l'hémoglobine. Cette quantité importante de metHb aura un impact direct sur le comportement des cellules endothéliales.

Ensuite, l'HPLC a mis en évidence que les quantités d'hèmes modifiés par oxydation (OxHm) étaient équivalentes au stock en condition statique. La présence d'OxHm dans notre échantillon stock ne nous empêche pas d'utiliser ce produit puisqu'il a été démontré par Vollard et ses collaborateurs que de l'OxHm est naturellement présente dans des échantillons de sang humain et que sa présence n'est pas corrélée à celle de la metHb (Vollard *et al*., 2005). L'OxHm est formée par interaction de l'hème libre avec l'H_2O_2 (Vollard *et al*., 2005), or nous n'avons pu mettre en évidence la formation d'H_2O_2 dans nos cultures (résultats non présentés). Il est donc normal qu'après incubation en condition statique, le pourcentage d'OxHm n'augmente pas. Paradoxalement, sous contraintes de cisaillement, le pourcentage d'OxHm diminue, en proportion plus importante pour l'Oxyglobin® que pour l'Hb-Dex-BTC. Ce résultat surprenant sous-entendrait qu'un système de « réparation » de l'OxHm serait activé dans les cellules endothéliales cultivées sous flux laminaire. L'une des hypothèses possibles porterait sur l'hème oxygénase I. Nos résultats confirment cette hypothèse puisque la transcription de HO-1 est induite par la présence d'HBOC et des contraintes de cisaillement. De plus, elle est supérieure pour l'Oxyglobin® par rapport à l'Hb-Dex-BTC. Le pourcentage d'OxHm étant inversement proportionnel au taux de transcription

de HO-1, il est possible d'attribuer cet effet à HO-1. Par ailleurs, le flux laminaire semble induire la formation d'hémoglobine rhombique de type I pour l'Hb-Dex-BTC comparé à la solution stock et à la culture statique. Ce n'est pas le cas pour l'Oxyglobin®, qui contient déjà des formes rhombiques. L'impact de cette transformation reste encore discuté à l'heure actuelle.

De plus, HO-1 est connue pour être induite par la présence d'hémoglobine libre dans le milieu de culture (Foresti *et al*., 2006). Nous avons démontré son induction par l'application de contraintes de cisaillement sur des HUVEC. Cependant, l'injection de Voluven® dans le milieu de culture réduit cette induction. Cette action est très certainement imputable à l'effet anti-inflammatoire connu des HEA (Feng *et al*., 2007) étant donné que HO-1 est aussi induite par l'inflammation (Terry *et al*., 1998). La présence d'HBOC augmente la transcription de HO-1 dans les cultures statique et dynamique, ce qui est en concordance avec les taux de metHb mesurés par spectrophotométrie mais pas proportionnel. En effet, les taux de metHb après cisaillement sont équivalents pour les deux solutions d'HBOC alors que la transcription d'HO-1 est supérieure pour l'Oxyglobin® comparé à l'Hb-Dex-BTC. D'autre part, l'Oxyglobin® induit plus fortement la transcription de HO-1 en condition statique que l'Hb-Dex-BTC. Mais en même temps, sous contraintes de cisaillement, la transcription de HO-1 est réprimée en présence d'Oxyglobin® comparée à la même culture en statique, sans que cette répression ne soit assez importante pour que le niveau de transcription soit inférieur à celui en présence d'Hb-Dex-BTC sous contraintes de cisaillement.

Globalement, sous contraintes de cisaillement, l'induction de la transcription de HO-1 est croissante Voluven®<Hb-Dex-BTC<Oxyglobin®. La différence d'induction entre l'Hb-Dex-BTC et l'Oxyglobin® pourrait se justifier au travers des modifications chimiques apportées à l'hémoglobine. En effet, l'Oxyglobin® est une hémoglobine polymérisée donc non « camouflée » alors que l'Hb-Dex-BTC est entourée de dextran ce qui rend l'hémoglobine moins détectable par la cellule endothéliale. La cellule ressentirait donc moins la présence de l'Hb-Dex-BTC que celle de l'Oxyglobin®.

L'hémoglobine libre est connue pour induire une vasoconstriction due au piégeage de NO par l'hémoglobine, responsable d'une baisse de sa biodisponibilité dans la circulation sanguine, inhibant la relaxation de cellules musculaires lisses (Fitzpatrick *et al*., 2004 ; Tsai *et al*., 2006). Dans notre étude, nous avons observé une diminution de la concentration en nitrite dans les milieux de culture, compensée par une augmentation en nitrate. Aucune variation n'est observée sous contraintes de cisaillement comparés à la culture statique. La quantité totale de nitrite cumulée à celle de nitrate est augmentée en présence de substituts sanguins, y compris pour le Voluven®. Cependant, l'augmentation est plus nette en présence d'HBOC

sous flux. Ceci supposerait que la concentration en NO soit augmentée, peut-être pour contrebalancer un piégeage de NO par l'hémoglobine. La production serait alors plus forte que la demande car la concentration de nitrite/nitrate est supérieure à celle en présence de milieu. Afin de prévoir une possible régulation de la concentration de NO dans le milieu, nous avons mesuré les variations de transcription de la eNOS. Il semblerait que les substituts sanguins (Voluven®, Hb-Dex-BTC et Oxyglobin®) induisent une augmentation de la transcription de la eNOS en culture statique. Ceci confirme les résultats de vasoconstriction obtenus après injection d'HBOC dans la circulation sanguine (Fitzpatrick *et al*., 2004). En effet, le piégeage de NO par l'hémoglobine induirait une augmentation de la transcription de la eNOS pour compenser la baisse de disponibilité de NO. Cependant, en condition dynamique, le Voluven® et l'Hb-Dex-BTC diminuent l'impact du flux laminaire en réprimant la transcription de eNOS. Nous pouvons donc émettre une hypothèse complémentaire au piégeage de NO. La vasoconstriction pourrait être induite par une répression de la transcription du gène de la eNOS due une action synergique entre la présence de Voluven® ou d'Hb-Dex-BTC et la reperfusion (reprise des contraintes de cisaillement). L'Oxyglobin®, quant à elle, induit une augmentation importante de la transcription de la eNOS en condition statique comparée au Voluven® et à l'Hb-Dex-BTC. Sous contraintes de cisaillement, le niveau de transcription retombe au niveau induit par ces mêmes contraintes en présence de milieu. Finalement, l'injection d'Oxyglobin®, pour la reperfusion, n'aurait pas d'impact sur la transcription de la eNOS. Dans notre modèle, l'Oxyglobin® semble être le substitut sanguin induisant le moins d'effet sur les facteurs engendrant la vasoconstriction.

Dans un deuxième temps, les recherches ont été orientées vers l'inflammation potentielle induite par le contact de substituts sanguins avec des HUVEC cultivées sous flux laminaire. Nous avons démontré que les contraintes de cisaillement influencent la réaction inflammatoire engendrée par la présence de substituts sanguins dont un *plasma expander* (Voluven®) et deux HBOC (Hb-Dex-BTC et Oxyglobin®). Après 6 h de culture des HUVEC sous contraintes de cisaillement en présence de substitut sanguin, nous avons essentiellement observé des variations de transcription du gène de la E-sélectine, alors qu'aucune modification de la transcription d'ICAM-1 ni du profil d'expression membranaire de ces protéines n'ont pu être mis en évidence. Cependant, on peut penser que celui-ci variera à plus long terme du fait de la traduction des protéines des gènes transcrit après 6 h de culture. En condition statique, la présence d'HBOC provoque une sur-transcription du gène de la E-sélectine. Cependant, le résultat majeur de l'étude de la transcription de la E-sélectine est sa répression, sous contraintes de cisaillement, par la présence d'Hb-Dex-BTC. Le dextran est connu pour inhiber l'adhésion des leucocytes à l'endothélium sous contraintes de cisaillement

(Ley *et al*., 1989). Donc la présence d'un tel polysaccharide sur l'hémoglobine pourrait inhiber la E-sélectine impliquée dans le *rolling* des leucocytes sur l'endothélium, ce qui aurait l'avantage de diminuer l'adhésion des leucocytes.

Notre étude mettant en présence HUVEC, contraintes de cisaillement et HBOC démontre combien ces trois paramètres s'influencent mutuellement. En complément de ces études préliminaires menées *in vitro* (en statique) sur l'impact des substituts sanguins sur les cellules endothéliales, et afin de se rapprocher le plus possible des conditions cliniques d'injection de substituts dans la circulation sanguine, il serait intéressant d'inclure au protocole d'étude, le système de culture sous contraintes de cisaillement développé ici.

Partie II

Evaluation de l'interaction cellules endothéliales/substituts sanguins à base d'hémoglobine sous hypoxie modérée/réoxygénation

Une hémorragie ou perte importante de sang, diminue le volume sanguin circulant, responsable d'une ischémie. La principale qualité du sang est de transporter l'oxygène aux tissus et les débarrasser de leurs déchets. Une hémorragie importante réduit la capacité de transport de l'O_2 et peut donc aboutir à une hypoxie des tissus. Les cellules endothéliales, en contact permanent avec le sang circulant, sont les premières cibles de l'hypoxie. Dans cette partie de notre étude, nous avons voulu aborder l'impact de la réoxygénation, par des substituts sanguins à base d'hémoglobine, d'HUVEC cultivées préalablement sous hypoxie modérée (5%O_2). Dans un premier temps, il nous a fallu établir le temps idéal de culture sous hypoxie, c'est-à-dire le temps qu'il faut aux cellules endothéliales pour « souffrir » du manque d'O_2, et exprimer les marqueurs spécifiques de cet état, avant d'être réoxygénées par le substitut. Lactate, peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et NO sont trois marqueurs d'importance dans la mise en place du métabolisme anaérobie au niveau des cellules endothéliales. Ce sont ces trois paramètres qui nous ont permis de mettre en évidence les temps marquants de la culture hypoxique et de limiter notre plage d'étude. L'hypoxie induit un stress inflammatoire (Arnould *et al*., 1995) et oxydatif (pendant la réoxygénation) (Ziegelstein *et al*., 2004), ainsi qu'une vasodilatation (Paffett *et al*., 2007) visant à rétablir l'oxygénation des tissus. Nous avons donc étudié la transcription d'ICAM-1 et E-sélectine, HO-1 et eNOS. Cette étude préliminaire de mise en place du protocole de culture des HUVEC sous hypoxie modérée a été menée dans le cadre d'un stage M2R réalisé par Estelle Paternotte dont j'ai co-encadré le travail.

Ensuite, l'impact de différents HBOC a été étudié dans le cadre de la réoxygénation des HUVEC hypoxiques. Leur comportement vis-à-vis de l'autooxydation ainsi que tous les paramètres précédemment cités seront évalués.

I. Mise au point du protocole d'hypoxie cellulaire :

I.1. Contrôle des paramètres hypoxiques :

Contrôle de la PO_2 : La PO_2 du milieu de culture des HUVEC placées en hypoxie (5% d'O_2) pour différentes durées est contrôlée de façon régulière au moyen d'une électrode de Clarck

(Fig. 43). Avant mise en hypoxie, le milieu de culture présente une PO_2 de 158 mm Hg. La mise en hypoxie (5 % d'O_2) s'accompagne d'une brusque baisse de la PO_2 à 30 mm Hg en 30 min. Elle se stabilise progressivement à 18 mm Hg, valeur atteinte à 80 min. Lorsque les cellules sont placées en normoxie (20% d'O_2), la PO_2 du milieu se stabilise à 130 mm Hg au bout de 80 min.

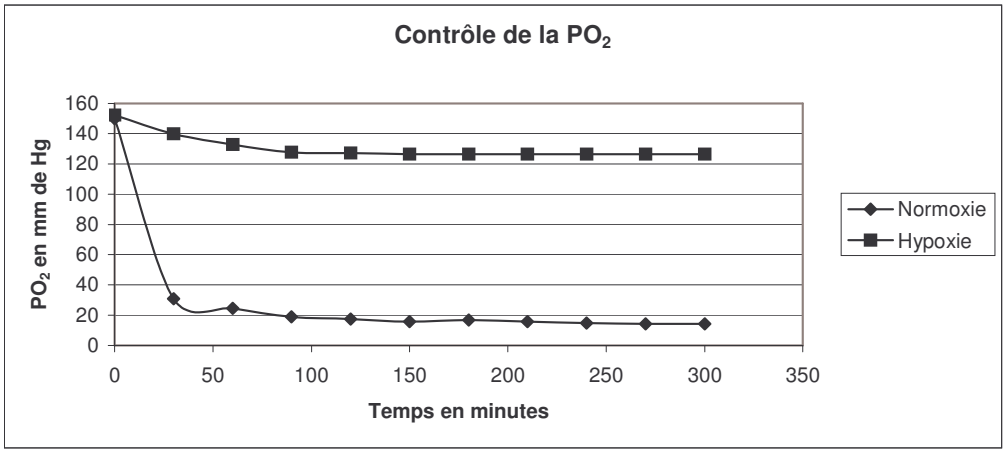


Fig. 43 : Evolution de la PO_2 du milieu mesurée à l'aide d'une électrode de Clark (Licox®Integra Neurosciences, Angleterre). Dans le milieu de culture, la PO_2 s'abaisse très rapidement de 158 mm Hg en normoxie à 30 mm Hg au bout de 30 min d'hypoxie. La PO_2 se stabilise ensuite au bout de 90 min à 18 mm Hg et puis demeure constante au cours du temps. n=1.

Contrôle du pH : Le pH du milieu des HUVEC placées en hypoxie (Fig. 44) reste constant tout au long de la durée de l'expérience et avoisine 7,7.

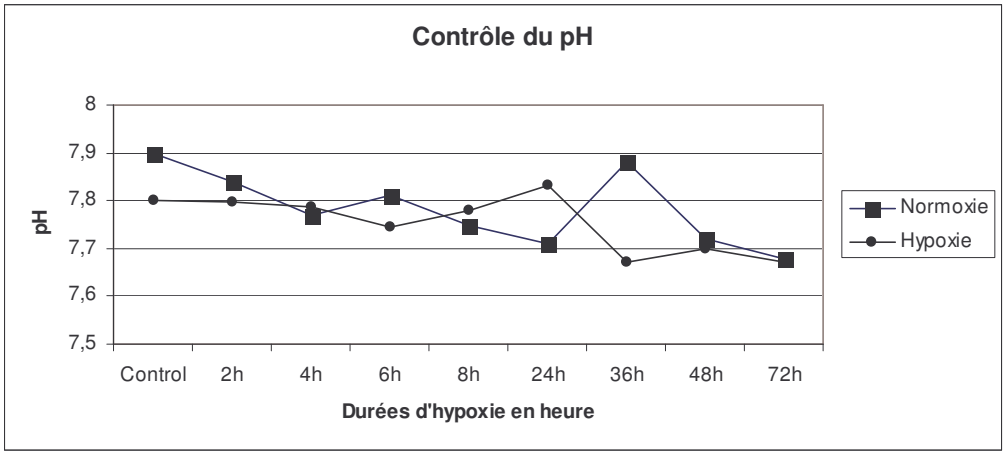


Fig. 44 : Evolution du pH de 0 à 72 h d'hypoxie. Tout au long de la culture cellulaire, le pH est stable entre 7,9 et 7,7 pour la normoxie et 7,8 et 7,7 pour l'hypoxie. n=1.

De ces observations, nous pouvons affirmer que, dans les conditions de nos expérimentations, la PO_2 du milieu en normoxie est de 130 mm Hg et celle en hypoxie est de 18 mm Hg et qu'il faut attendre 1h20 avant que le milieu de culture soit réellement hypoxique.

I.2. Observations morphologiques des HUVEC :

La morphologie des HUVEC placées en hypoxie est contrôlée à intervalles réguliers (Fig. 45) et comparée à celle de cellules cultivées en normoxie.

De 4 h à 24 h d'hypoxie, les cellules présentent une morphologie pavimenteuse et une organisation en monocouche identiques à celles observées pour la culture témoin. Au contraire, à partir de 36 h et jusqu'à 48 h, les cellules montrent une organisation en pseudo-tubes. A 72 h, les HUVEC retrouvent une organisation proche de celle observée chez le témoin, mais l'« empreinte » de l'organisation concentrique reste toujours visible.

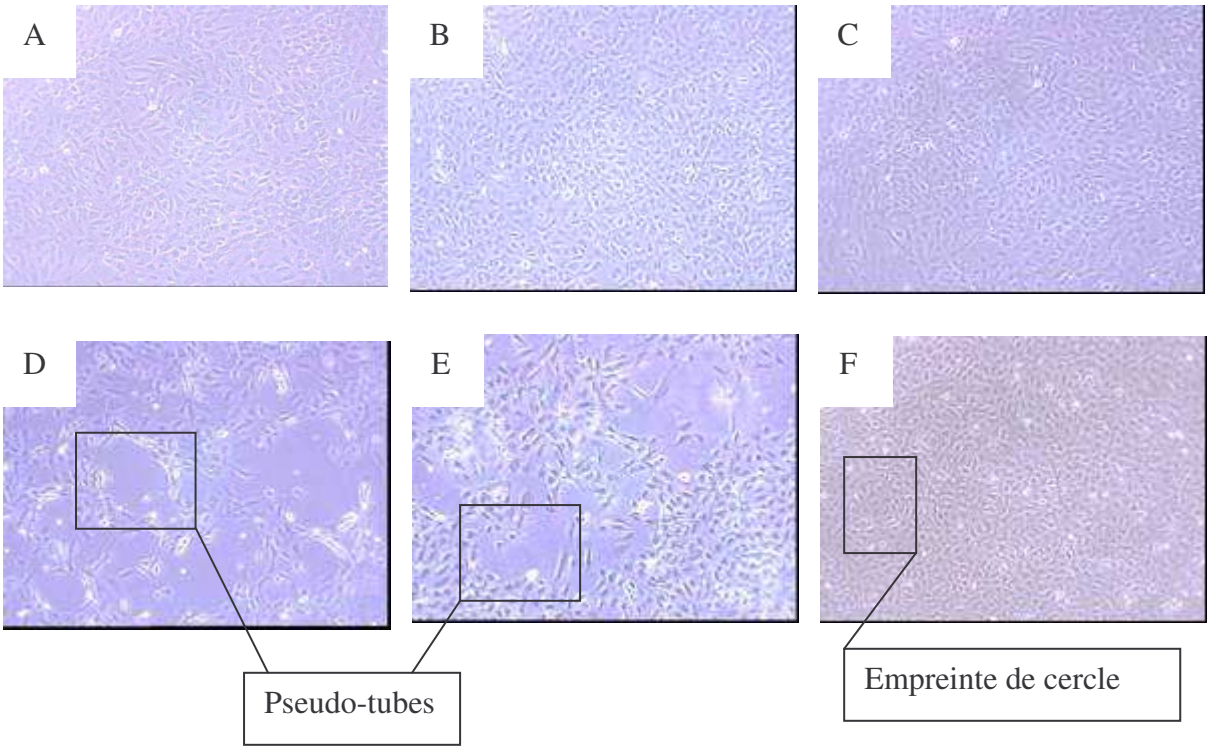


Fig. 45 : Observation au microscope inversé à contraste de phase d'HUVEC cultivées en hypoxie (5% d'O_2) (Leica, France), obj x10. A : témoin en normoxie (20% O_2), B : 4 h, C : 24 h, D : 36 h, E : 48 h, F : 72 h, d'hypoxie. De 4 h à 24 h d'hypoxie, les HUVEC ont une organisation pavimenteuse similaire au témoin. A 36 h et 48 h d'hypoxie, les HUVEC présentent une organisation concentrique. A 72 h, les HUVEC retrouvent une organisation semblable à celle observée chez le témoin avec quelques empreintes d'organisation en pseudo-tubes.

I.3. Viabilité cellulaire :

La viabilité cellulaire a été évaluée par mesure de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale à l'aide du test MTT (Fig. 46).

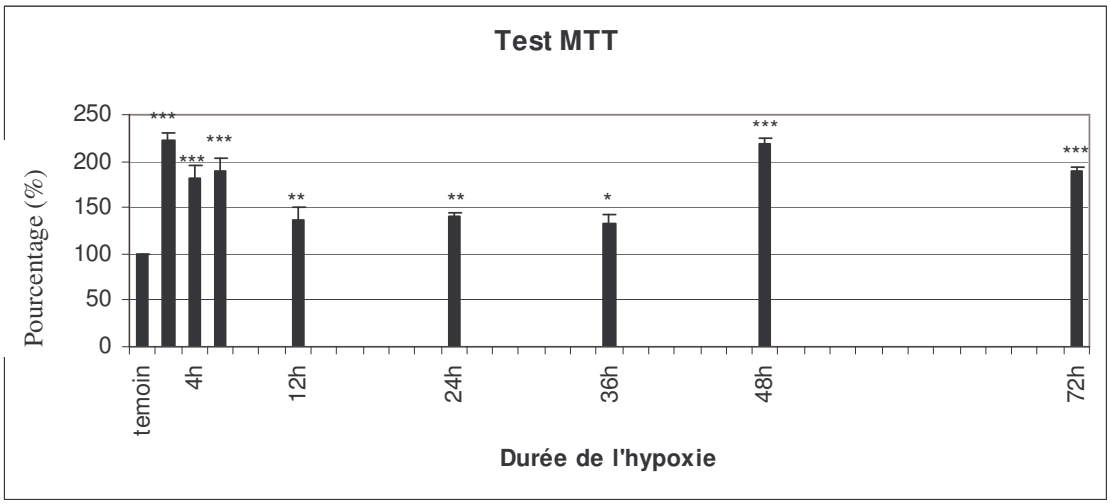


Fig. 46 : Activité métabolique mitochondriale des HUVEC mesurée par un test MTT, après différentes périodes d'hypoxie (5% d'O_2). Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen par rapport au témoin ± l'erreur standard à la moyenne. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ *versus* 0 h.

De façon globale, les HUVEC placées en hypoxie présentent une forte activité métabolique, supérieure de 40% à 90% à celle du témoin. Celle-ci augmente en trois phases significativement différentes du témoin :

- 2 h à 6 h : 80%
- 12 h à 36 h : 40%
- 48 h à 72 h : 90%.

Puisque les HUVEC présentent toujours une activité métabolique entre 2 et 72 h d'hypoxie, elles paraissent donc viables.

I.4 Production des marqueurs de l'hypoxie (H_2O_2, lactate, nitrite) :

I.4.1. H_2O_2 :

De façon générale, l'évolution de la concentration en H_2O_2 au cours du temps apparaît sous la forme d'une courbe brisée ascendante présentant 2 paliers (Fig. 47). A 0 h d'hypoxie (témoin), la quantité d'H_2O_2 dans le milieu est nulle. Dès 2 h d'hypoxie, de l'H_2O_2 est détecté. Cependant, la production ne devient significativement différente du témoin qu'à partir de 8 h d'hypoxie. Ainsi, la partie ascendante du graphique présente trois paliers :

- de 2 h à 6 h : la concentration en H_2O_2 est d'environ 35 nM/10^6 cellules.
- de 8 h à 12 h : environ 170 nM/10^6 cellules.
- de 24 h à 36 h : environ 340 nM/10^6 cellules.

A l'issue du pic de production observé à 24 h et à 36 h, la concentration d'H_2O_2 chute brutalement à 48 h (141 nM/10^6 cellules). Un nouveau palier est ensuite observé jusqu'à 72h d'hypoxie.

Sur ces trois paliers, seuls ceux de 8-12 h et 24-36 h sont significativement différents du témoin et significativement différents entre eux.

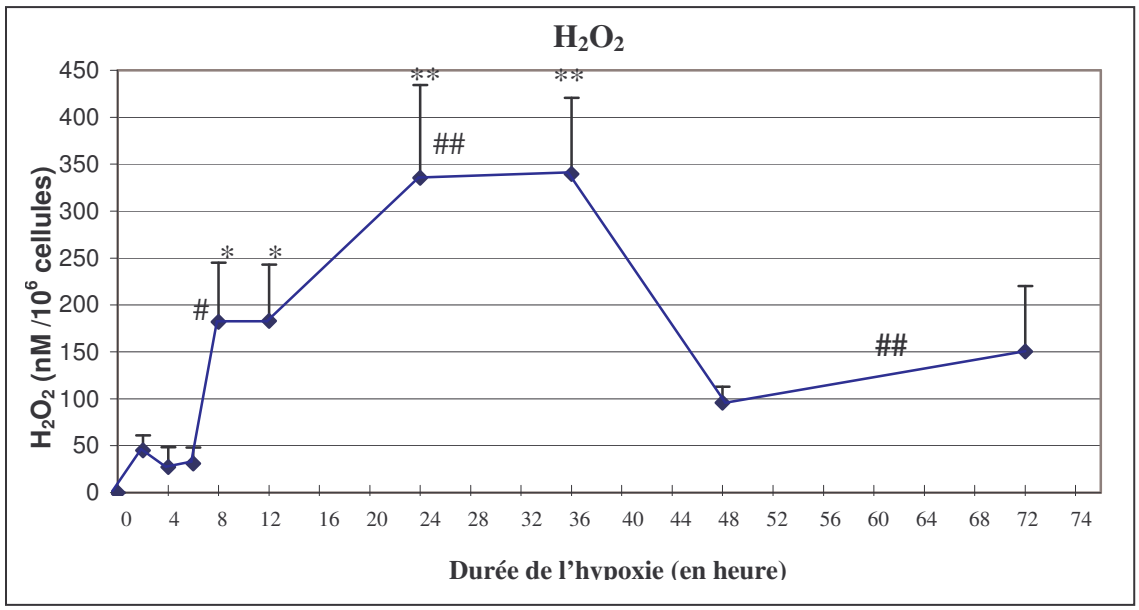


Fig.47 : Production d'H_2O_2 par des HUVEC soumises à différentes durées d'une hypoxie (5% O_2) suivies d'une heure de réoxygénation. La quantification d'H_2O_2 est réalisée par dosage à la HRP/résorufine (Invitrogen, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ *versus* témoin. # paliers entre eux.

Sous hypoxie, les HUVEC produisent bien de l'H_2O_2. Mais il faut attendre 8 h pour que la production devienne significativement différente du témoin. Cette production reste croissante 36 h, avant un retour vers la normale.

I.4.2. Acide L-lactique ou lactate :

La production de lactate est observée pendant toute la durée de l'hypoxie (Fig. 48). Le niveau basal d'acide lactique produit par les HUVEC en normoxie est de 0,7 mM/10^6 cellules. Après 12 h d'hypoxie, la production est stabilisée à 1,05 mM/10^6 cellules puis augmente régulièrement jusqu'à 36 h où elle atteint un pic de 3 mM/10^6 cellules, quadruplant ainsi la valeur basale. Une diminution de la production est alors observée à 48 h (2,1 mM/10^6 cellules) avant de retrouver à 72 h un niveau de production identique à celui de 36 h (3 mM/10^6 cellules).

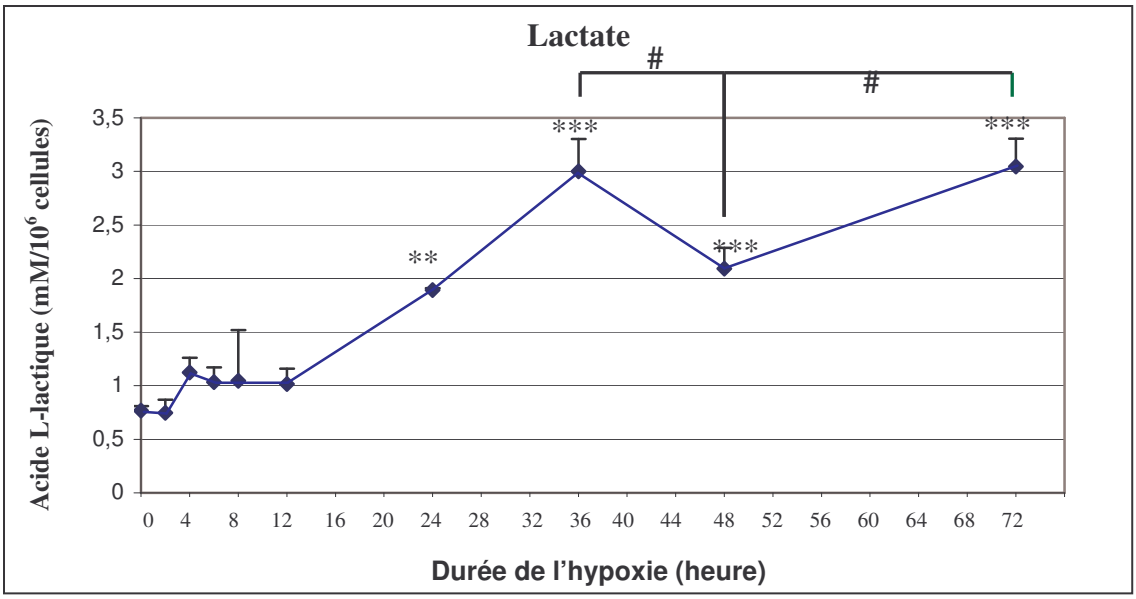


Fig.48 : Production d'acide L-lactique par des HUVEC soumises à différentes périodes d'hypoxie (5% d'O_2) suivies d'une heure de réoxygénation. Lactate mesuré par suivi de la production de NADH en présence de lactate déshydrogénase (Biosentec, France). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ versus témoin ; # $p \leq 0,05$ *versus* 48 h.

Sous hypoxie, les HUVEC produisent une concentration d'acide L-lactique significativement différente du témoin dès 12 h (1 nM/10^6 cellules).

I.4.3. Nitrite (dosage indirect de NO) :

De façon générale, la production de nitrite par les HUVEC en hypoxie augmente de façon continue à partir de 4 h et jusqu'à 72 h (Fig. 49).

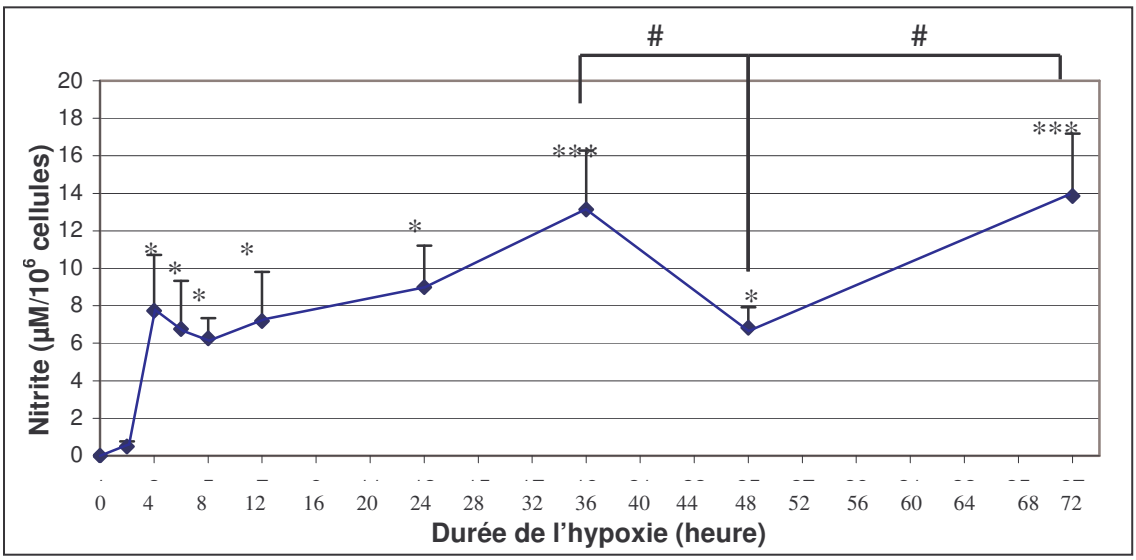


Fig.49 : Production de nitrite par des HUVEC soumises à différentes durées d'hypoxie (5% d'O_2). Le dosage est réalisé au réactif de Griess (Molecular Probes®). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ versus témoin ; # $p \leq 0,05$ *versus* 48 h.

Les résultats montrent cependant une production en quatre temps :

- Phase 1 : augmentation forte de la concentration en nitrite à 4 h.
- Phase 2 : croissance modérée de 4 h à 36 h
- Phase 3 : baisse de production entre 36 h et 48 h
- Phase 4 : retour à une forte production à 72 h

Phase 1 : A 2 h d'hypoxie, les HUVEC produisent peu de nitrite (0,5 µM/10^6 cellules). A 4 h, un pic abrupt de production est constaté (10 µM/10^6 cellules). La concentration de nitrite s'en trouve multipliée par 20.

Phase 2 : Une augmentation modérée est observée de 4 h à 36 h. Les quantités moyennes produites varient entre 6,5 et 12,3 µM/10^6 cellules avec la concentration la plus forte à 36 h.

Phases 3 et 4 : Une diminution suivie d'un retour à une forte production est observée. Après 36 h d'hypoxie, la concentration en nitrite chute de façon significative jusqu'à 48 h : elle passe respectivement de 12,3 à 6,7 µM/10^6 cellules. Cette baisse de la production reste cependant bien différente de la concentration basale. Puis, à 72 h, la production en nitrite augmente à la valeur maximale de 14 µM/10^6 cellules, dans les conditions étudiées ici.

Les concentrations de nitrite produit par les HUVEC sont significativement différentes du témoin dès 4 h d'hypoxie.

Conclusion/1er choix de durées d'hypoxie :

Comme il paraissait difficilement réalisable, et d'un intérêt incertain, d'étudier les gènes à chacun des temps que nous venons d'évoquer, il nous a paru raisonnable de ne retenir que trois temps pour la suite de cette étude. Cependant, nous étudierons, mais considérerons à part, les périodes de 36 à 72 h d'hypoxie, que nous nommerons postérieurement la triade 36-48-72, du fait de la réorganisation concentrique des cellules qui met en évidence un switch angiogénique, précédemment décrit par Kumar et ses collaborateurs, induit par une forte concentration de lactate dans le milieu de culture (Kumar *et al.*, 2007). Les cellules endothéliales formeraient, dans ces conditions, des pseudo-tubes pour permettre la formation de nouveaux vaisseaux.

De 4 h à 24 h d'hypoxie, trois temps majeurs sont à observer. Quatre heures d'hypoxie représentent le premier pic de production du nitrite. A 12 h, nous assistons à la fois à la fin du premier plateau de production d'H_2O_2 et au début de la production du lactate. Au bout de 24 h, c'est la fin du deuxième plateau d'H_2O_2 et le maximum de production du lactate (si on

fait abstraction de 36-48-72). Ces trois durées d'hypoxie sont retenues pour l'étude de la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, comme ICAM-1 et E-sélectine, dans la vasomotricité, comme eNOS, et dans le stress oxydatif, en particulier HO-1.

I.5. Hypoxie et transcription :

Triade 36-48-72 h : Les niveaux d'expression relatifs (NER) des ARNm des gènes ICAM-1 et E-sélectine (Fig. 50) sont maximaux à 48 h et, respectivement, 13 et 21 fois supérieurs à leur témoin. Puis la transcription de ces deux gènes diminue et devient quasiment nulle à 72 h. En ce qui concerne eNOS (Fig. 51), des pics à 36 et 48 h sont observés alors que son expression est presque nulle à 72 h. HO-1 (Fig. 52) présente un profil de transcription qui diminue jusque 72 h où il avoisine la production basale.

I.5.1. Hypoxie et induction de l'inflammation :

On observe, tout d'abord, que les ARNm d'ICAM-1 et E-sélectine sont détectés sur toute la plage d'hypoxie. De plus, ICAM-1 et E-sélectine présentent des profils d'expression similaires (Fig. 50). En normoxie, ICAM-1 et E-sélectine ont de faibles NER de leur ARNm (1,03 et 0,11 respectivement). Les profils d'expression présentent un pic de transcription majeur au bout de 4 h d'hypoxie. Leur transcription est induite de 15 fois pour ICAM-1 et 42 fois pour E-sélectine.

A 24 h d'hypoxie, la transcription des deux gènes retourne à un niveau basal.

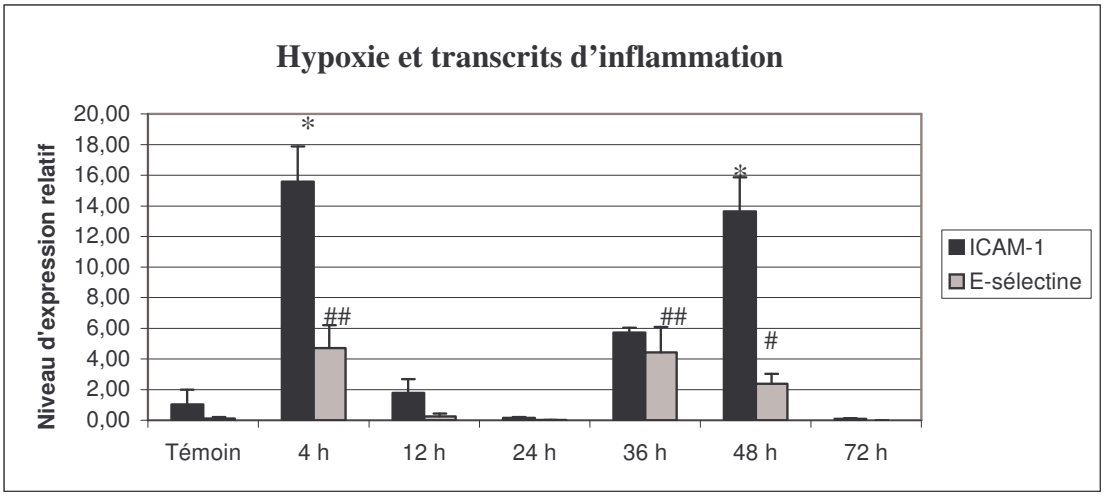


Fig.50 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm des gènes d'ICAM-1 et de la E-sélectine après culture des cellules endothéliales sous hypoxie ($5\%O_2$) pendant différentes durées. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$ *versus* témoin ICAM-1 ; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ *versus* témoin E-sélectine.

I.5.2. Hypoxie et facteurs de vasomotricité/stress oxydatif :

Le niveau d'expression constitutif des ARNm de la eNOS (témoin) est de 0,43. Son profil d'expression présente un pic à 4 h d'hypoxie où le NER est 10 fois supérieur à celui du témoin (Fig. 51). Par la suite et jusqu'à 24 h, le NER des ARNm de la eNOS retrouve des valeurs presque basales.

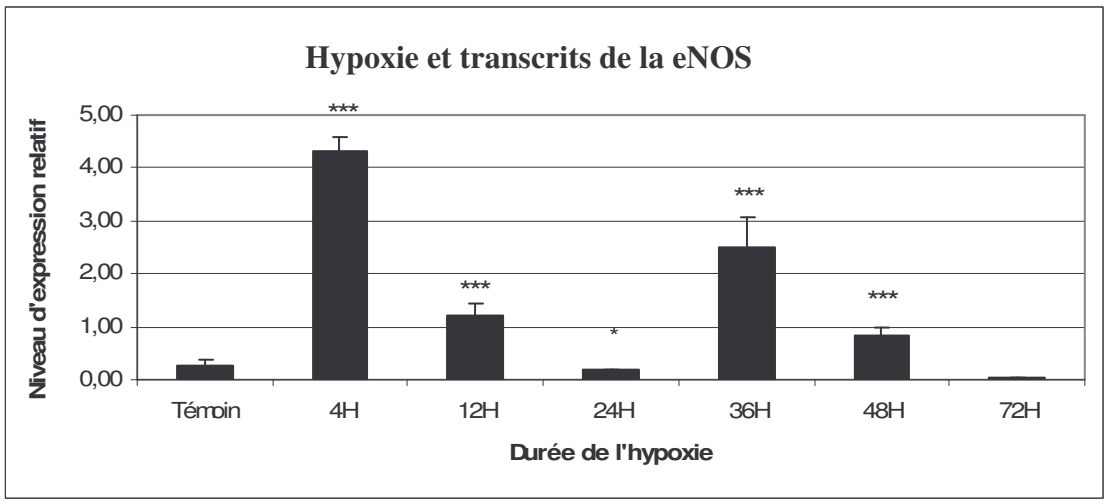


Fig.51 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS après culture des cellules endothéliales sous hypoxie (5%O2) pendant différentes durées. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ *versus* témoin.

En normoxie, le niveau d'expression relatif des ARNm d'HO-1 est faible (0,29). Le profil montre un pic d'expression à 4 h d'hypoxie, correspondant à 9 fois le NER témoin (Fig.52). Par la suite, l'expression des ARNm d'HO-1 diminue brutalement et retombe à un niveau d'expression équivalent à celui du témoin à parti de 24 h.

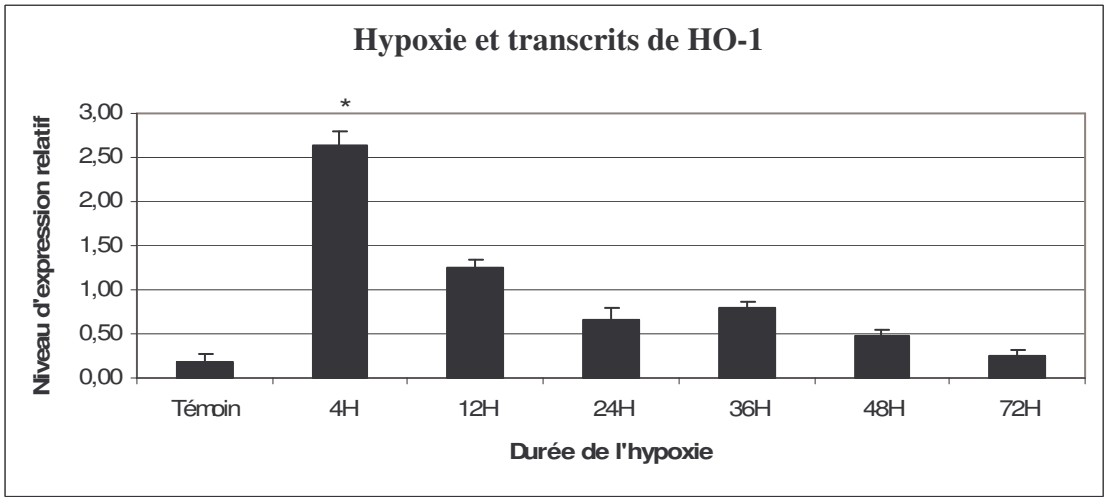


Fig.52 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 après culture des cellules endothéliales sous hypoxie (5%O2) pendant différentes durées. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, *$p \leq 0,05$ *versus* témoin.

Conclusion/sélection des durées d'hypoxie propices à l'étude de la réoxygénation par des substituts sanguins :

Pour les mêmes raisons que citées précédemment, nous n'avons retenu que deux temps pour la suite de notre travail. Le choix a été effectué selon ce raisonnement. Les quatre gènes étudiés dans des cultures d'HUVEC sous hypoxie de 4 à 24 h présentent tous un pic de transcription à 4 h et une expression des ARNm quasiment nulle à 24 h. 4 h et 24 h d'hypoxie seront donc sélectionnées car elles représentent la réponse précoce puis tardive à l'établissement de l'hypoxie. En effet, 4 h peut être un délai raisonnable observé avant la transfusion d'un substitut sanguin faisant suite à un hypovolémie de 20%, 24 h pourrait concerner davantage des pathologies plus chroniques comme l'anémie ou l'ischémie résultant de la formation progressive d'un thrombus.

L'évolution de notre protocole nous a conduit à ne retenir que 4 et 24 h d'hypoxie. En effet, le pic de synthèse de NO et le pic de transcription de tous les gènes étudiés se produisent après 4 h d'hypoxie. De plus, un pic de production du lactate (marqueur majeur du stress hypoxique) ainsi que « l'extinction » de tous les gènes sont observés à 24 h d'hypoxie.

II. Impact de la réoxygénation par différents substituts sanguins de cellules endothéliales soumises à **4 h** d'hypoxie modérée (5% O_2) :

La réoxygénation de cellules hypoxiques se déroule après l'établissement d'un stress oxydatif intense. La forte production de radicaux libres et le relarguage de certains métabolites (H_2O_2, lactate) influencent le comportement des substituts sanguins à base d'hémoglobine (i.e. autooxydation) et la réponse des cellules endothéliales. Au cours de cette étude, le stress oxydatif, les facteurs influençant la vasomotricité et l'inflammation seront étudiés après 4 h d'hypoxie suivies d'une heure de réoxygénation.

Pour cette étude, nous évaluerons le comportement de trois HBOC (Hb-Dex-BTC, Oxyglobin® et αα-Hb) que nous comparerons à un *plasma expander* (Voluven®).

II.1. Hypoxie/réoxygénation et stress oxydatif :

II.1.1. Production de lactate :

La production de lactate par les cellules endothéliales, après réoxygénation avec les différents substituts sanguins étudiés, est plus élevée pour l'Oxyglobin® comparée au Voluven® (Fig. 53). L'Hb-Dex-BTC et l'αα-Hb n'ont pas d'effet.

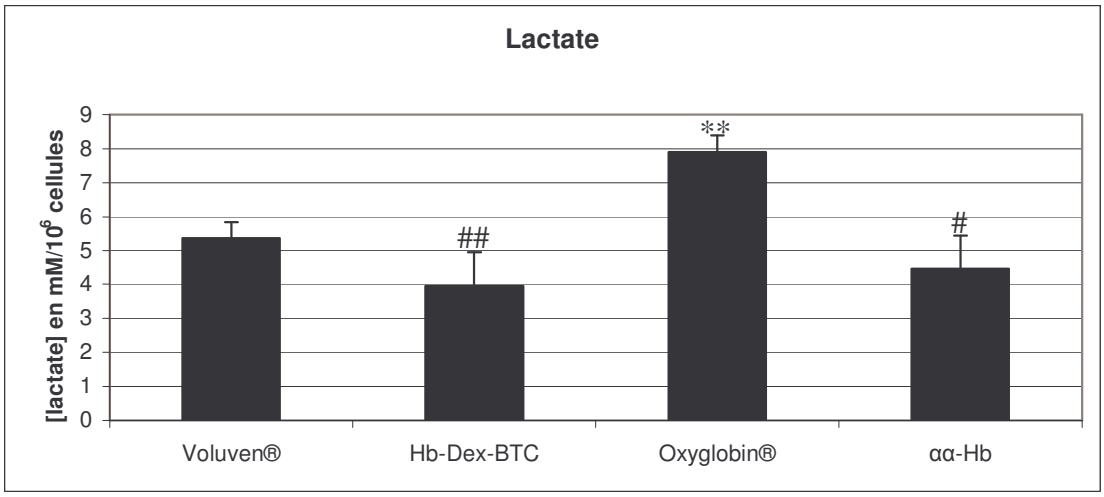


Fig.53 : Production de lactate par des HUVEC placées 4 h en hypoxie (5%O2) et réoxygénées 1 h avec différents substituts sanguins. Lactate mesuré par suivi de la production de NADH en présence de lactate déshydrogénase (Biosentec, France). n=3. ** p ≤ 0,01 *versus* Voluven® ; # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01 *versus* Oxyglobin®.

II.1.2 Production d'H_2O_2 :

La réoxygénation de cellules hypoxiques provoque la libération, dans le milieu, de peroxyde d'hydrogène qui peut réagir avec l'hémoglobine et l'oxyder. De plus, l'apport d'O_2 peut augmenter considérablement la formation d'H_2O_2 dans le milieu. Le relargage d'H_2O_2 par des HUVEC placées 4 h en hypoxie et réoxygénées en présence de Voluven®, d'Hb-Dex-BTC ou d'ααHb ne varie pas et est proche de celui de cellules réoxygénées en présence de milieu de culture (Fig. 54). Seule l'Oxyglobin® provoque une augmentation conséquente (5,7 fois par rapport au Voluven®) de la concentration d'H_2O_2 après réoxygénation.

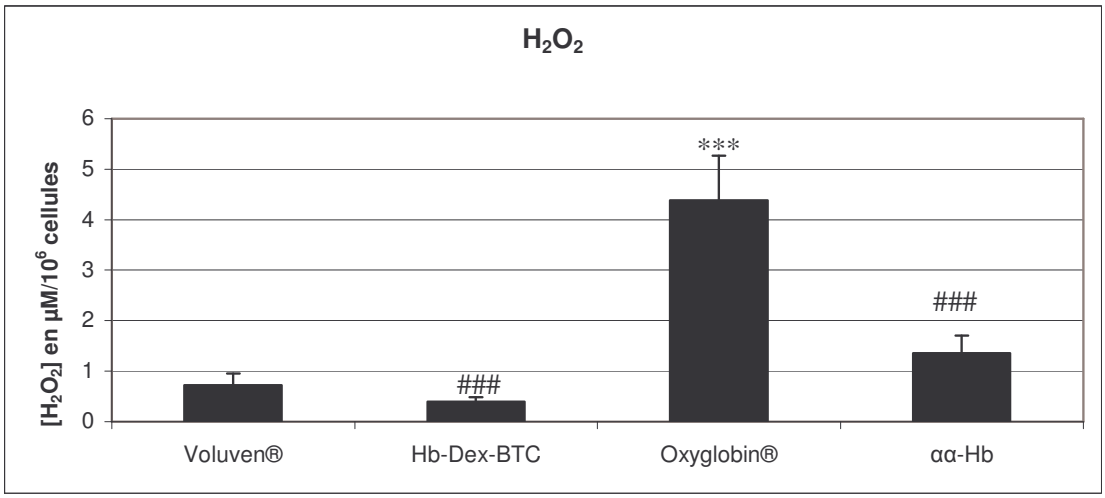


Fig.54 : Production d'H_2O_2 par des HUVEC soumises à 4 h hypoxie (5% O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. La quantification d'H_2O_2 est réalisée par dosage à la HRP/résorufine (Invitrogen, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3. *** p ≤ 0,001 *versus* Voluven® ; ### p ≤ 0,001 *versus* Oxyglobin®.

II.1.3. Autooxydation de l'hémoglobine

Le suivi de la formation de metHb après 1 h de réoxygénation d'HUVEC placées 4 h en hypoxie ne révèle aucune augmentation d'hémoglobine oxydée (Tableau X).

Tableau X : Pourcentage de metHb présente dans chaque échantillon de substitut sanguin avant (stock) et après réoxygénation pendant 1 h d'HUVEC placées préalablement 4 h en hypoxie. n=3.

	MetHb	
	Stock	4 h hypoxie
αα-Hb	24 ± 7	21 ± 3
Hb-Dex-BTC	0,5 ± 0,5	2 ± 2
Oxyglobin®	6 ± 5	13 ± 3

II.1.4. Transcription de HO-1 :

HO-1 est un détecteur de stress oxydatif et renseigne sur la présence d'hémoglobine dans le milieu. La réoxygénation des HUVEC avec du Voluven® et de l'Hb-Dex-BTC diminue nettement (3 fois), jusqu'au niveau basal la transcription de HO-1 induite par l'hypoxie (Fig. 55). Cependant, si de l'Oxyglobin® ou de l'αα-Hb sont utilisés, le NER des ARNm de HO-1 est le même qu'avant réoxygénation. Seule l'Hb-Dex-BTC semble capable de réoxygéner les HUVEC soumises à 4 h d'hypoxie sans induire de stress oxydatif intense.

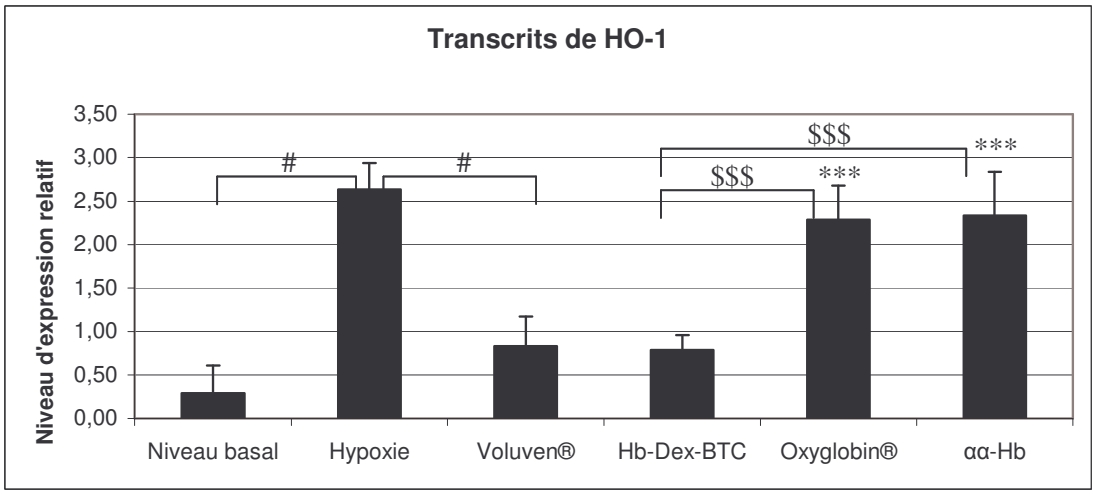


Fig.55 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 après culture de cellules endothéliales pendant 4 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, # p≤ 0,05 *versus* hypoxie ; ***p ≤ 0,001 *versus* Voluven® ; $$$ p≤ 0,001 *versus* Hb-Dex-BTC.

II.2. Hypoxie/réoxygénation et facteurs de vasomotricité :

II.2.1. Production de nitrite/nitrate :

La quantité de nitrite produite par les HUVEC au bout de 4 h d'hypoxie est maximale (8 µM/10^6 cellules). La réoxygénation avec du Voluven® n'a aucun impact sur la concentration de nitrite présent dans les milieux de culture (Fig. 56). Cependant, si l'Hb-Dex-

BTC est utilisé, la concentration de nitrite diminue significativement alors que l'Oxyglobin® et l'αα-Hb n'ont peu ou aucun effet.

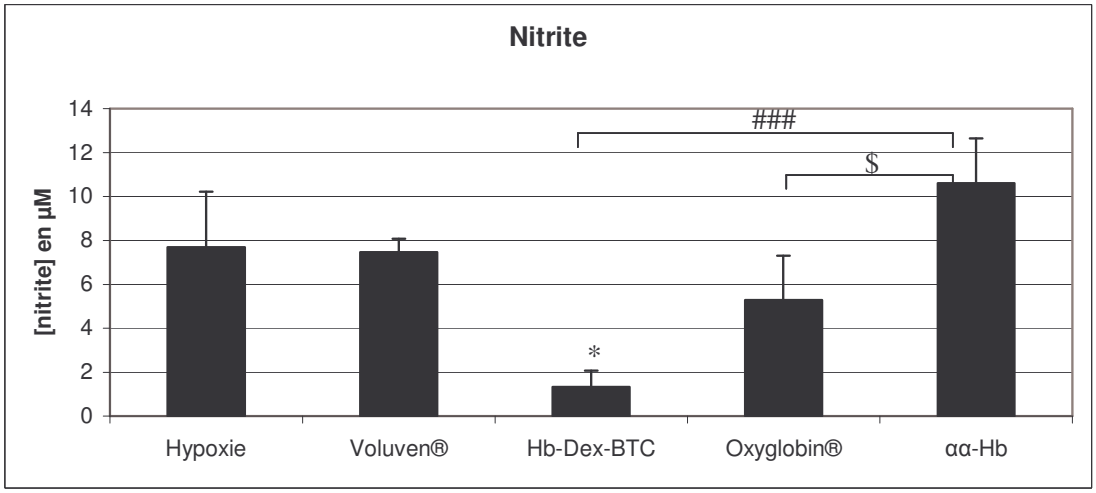


Fig.56 : Production de nitrite pour 10^6 HUVEC cultivées 4 h en hypoxie et réoxygénées avec différents substituts sanguins. Dosage à l'aide du réactif de *Griess* (R&D system, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$ *versus* Voluven® ; ### $p \leq 0,001$ *versus* Hb-Dex-BTC ; $ $p \leq 0,05$ *versus* Oxyglobin®.

Par ailleurs, tous les HBOC testés induisent une augmentation de la concentration de nitrate dans le milieu (Fig. 57). L'Oxyglobin® (3,5 fois supérieur au Voluven®) et l'αα-Hb (équivalent à l'Oxyglobin®) ont un effet plus prononcé que l'Hb-Dex-BTC (2,9 fois comparé au Voluven®).

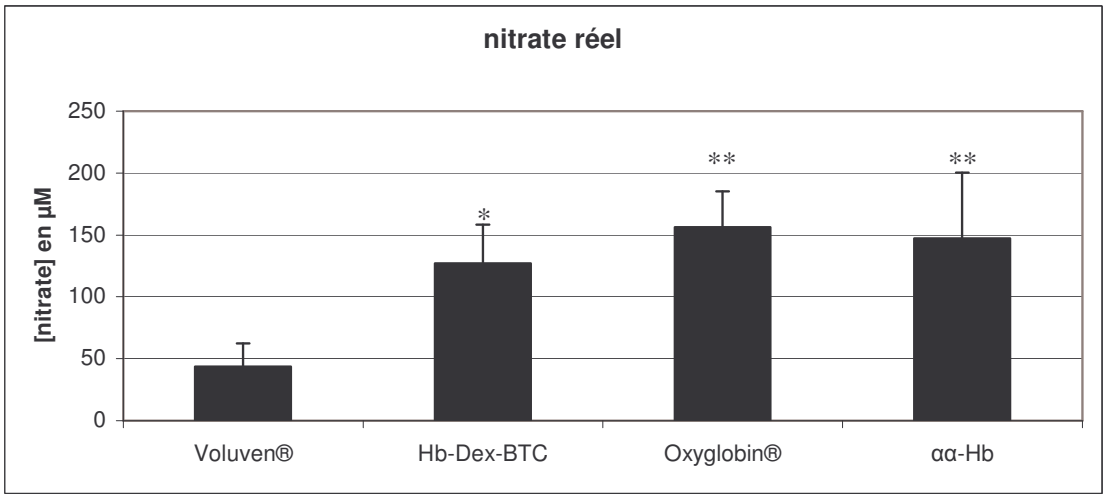


Fig.57 : Production réelle de nitrate pour 10^6 HUVEC cultivées 4 h en hypoxie et réoxygénées avec différents substituts sanguins. Dosage à l'aide du réactif de *Griess* (R&D system, France) après action de la nitrate réductase (R&D system, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ *versus* Voluven®.

II.2.2. Transcription de la eNOS :

La transcription de la eNOS après quatre heures d'hypoxie est très élevée (4,33 contre 0,43 à l'état basal) (Fig. 58). Après réoxygénation avec les substituts sanguins, elle retourne à son

niveau basal. La réoxygénation semble donc annuler la sur-transcription de la eNOS induite par 4 h d'hypoxie quel que soit le substitut sanguin (transporteur ou non d'O_2) utilisé.

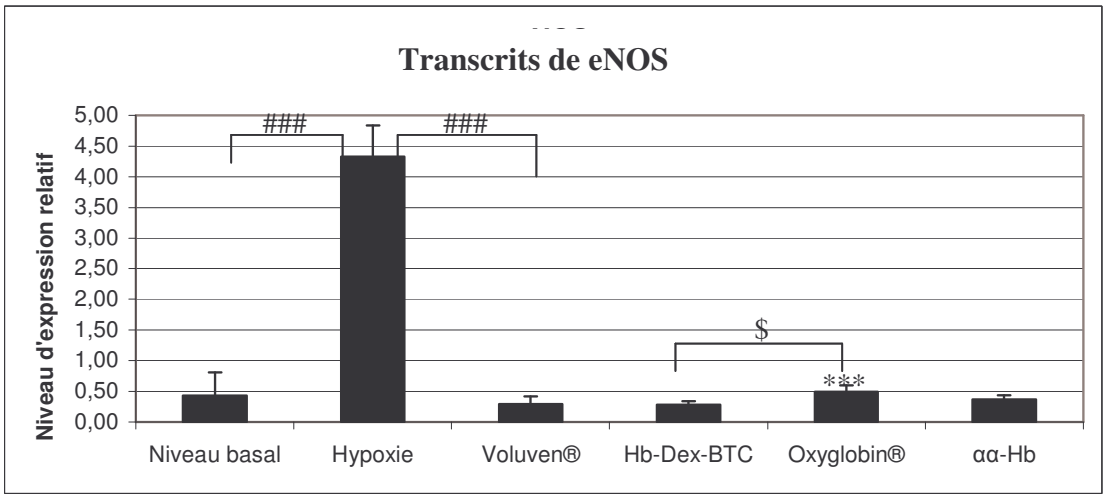


Fig.58 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS après culture des cellules endothéliales pendant 4 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ### p≤ 0,001 *versus* hypoxie ; ***p ≤ 0,001 *versus* Voluven® ; $ p≤ 0,05 *versus* Hb-Dex-BTC.

II.3. Hypoxie/réoxygénation et inflammation :

II.3.1. Transcription des gènes ICAM-1 et E-sélectine :

Les profils d'expression des ARNm d'ICAM-1 et E-sélectine sont similaires. Après une heure de réoxygénation avec les différents substituts, l'inflammation de la cellule endothéliale est nettement diminuée (9 et 6 fois pour ICAM-1 et E-sélectine respectivement) (Fig. 59 et 60).

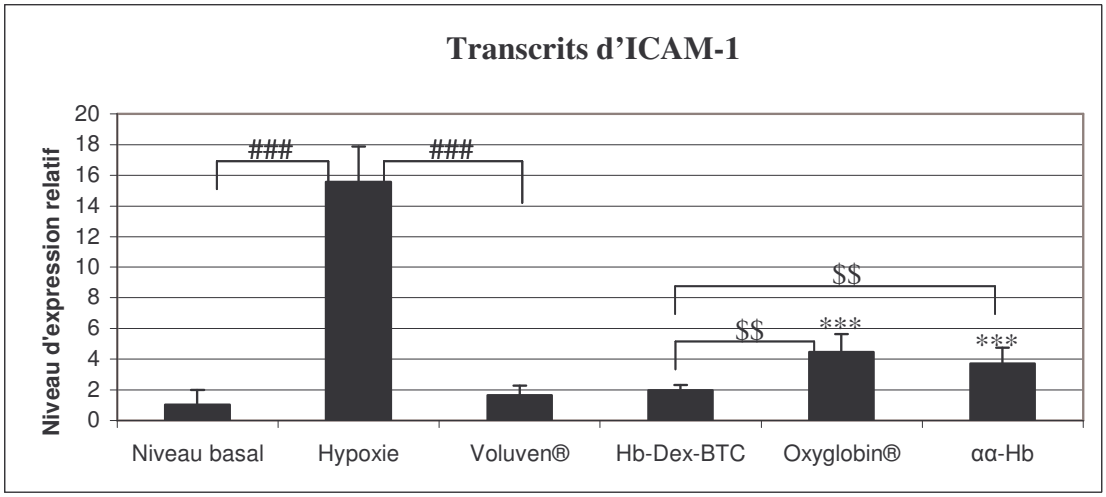


Fig.59 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène d'ICAM-1 après culture des cellules endothéliales pendant 4 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ###p ≤ 0,001 *versus* hypoxie ; *** p ≤ 0,001 *versus* Voluven® ; $$ p≤ 0,01 *versus* Hb-Dex-BTC.

Le Voluven® induit un retour à l'état basal pour ICAM-1 et E-sélectine. Cependant, la réoxygénation avec l'Oxyglobin® ou l'αα-Hb réduit moins fortement (3,5 fois) la transcription d'ICAM-1. Pour la E-sélectine, on assiste au même phénomène, mis à part que l'Hb-Dex-BTC réduit moins fortement son NER (3 fois) par rapport à l'hypoxie. La réoxygénation des HUVEC permet une diminution de l'inflammation engendrée par l'hypoxie, mais les différents HBOC n'ont pas la même puissance « anti-inflammatoire ».

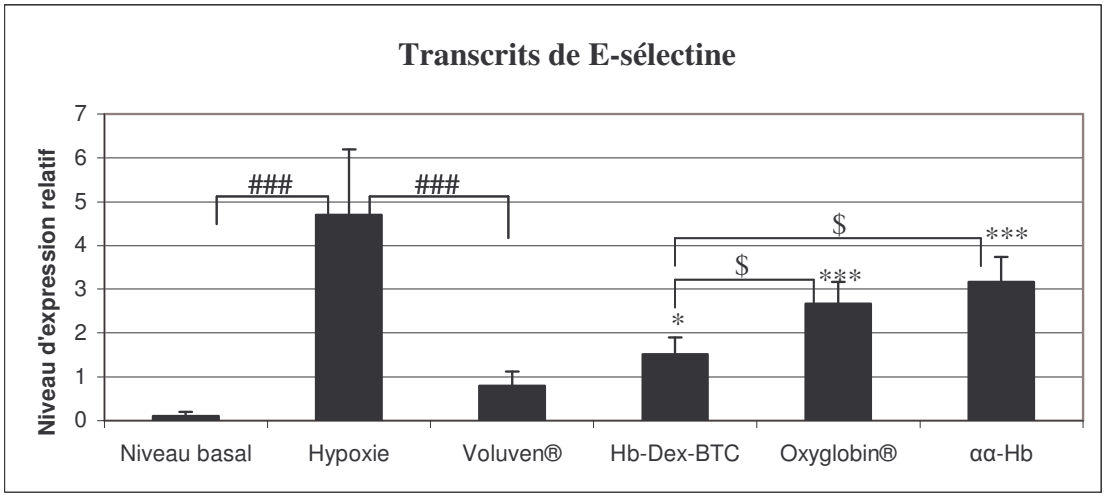


Fig.60 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la E-sélectine après culture des cellules endothéliales pendant 4 h sous hypoxie (5%O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ### p≤ 0,001 *versus* hypoxie ; * p ≤ 0,05, ***p ≤ 0,001 *versus* Voluven® ; $ p≤ 0,05 *versus* Hb-Dex-BTC.

II.3.2. Expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine :

L'étude de l'expression membranaire d'ICAM-1 ne met en évidence aucune différence statistique pour la réoxygénation avec les différents HBOC (Fig. 61).

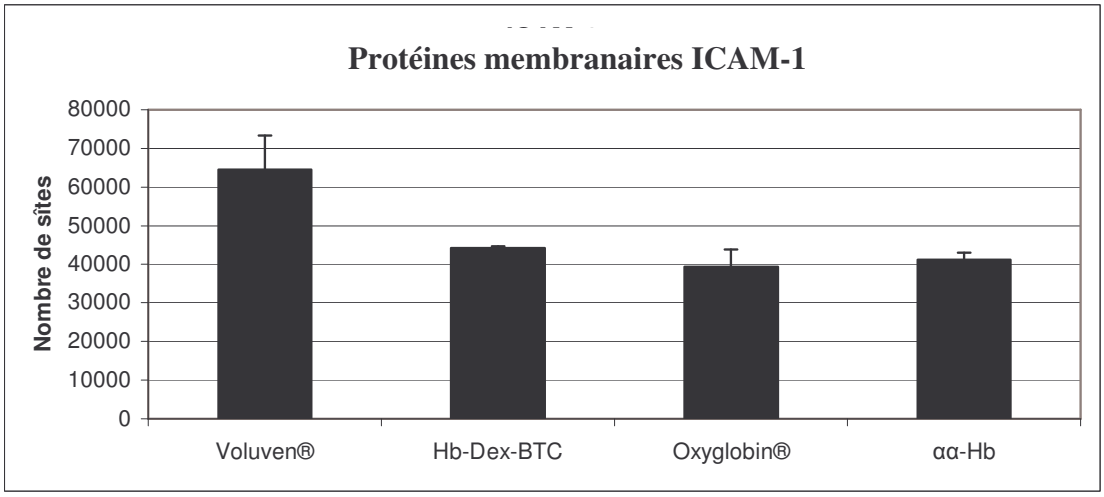


Fig.61 : Expression membranaire d'ICAM-1 après une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins de cellules endothéliales cultivées 4 h sous hypoxie (5%O_2). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=2.

Il n'y a pas de différence statistique avec le Voluven® non plus. Ce résultats est sans doute, engendré par un trop faible nombre d'expérience (n=2). Cependant, si nous considérons les moyennes des résultats, on peut penser que la réoxygénation avec les HBOC diminue l'expression membranaire d'ICAM-1. La E-sélectine présente un profil différent, où l'on peut observer une réduction de son expression membranaire en présence d'Hb-Dex-BTC, comparé au Voluven® et à l'Oxyglobin® (Fig. 62).

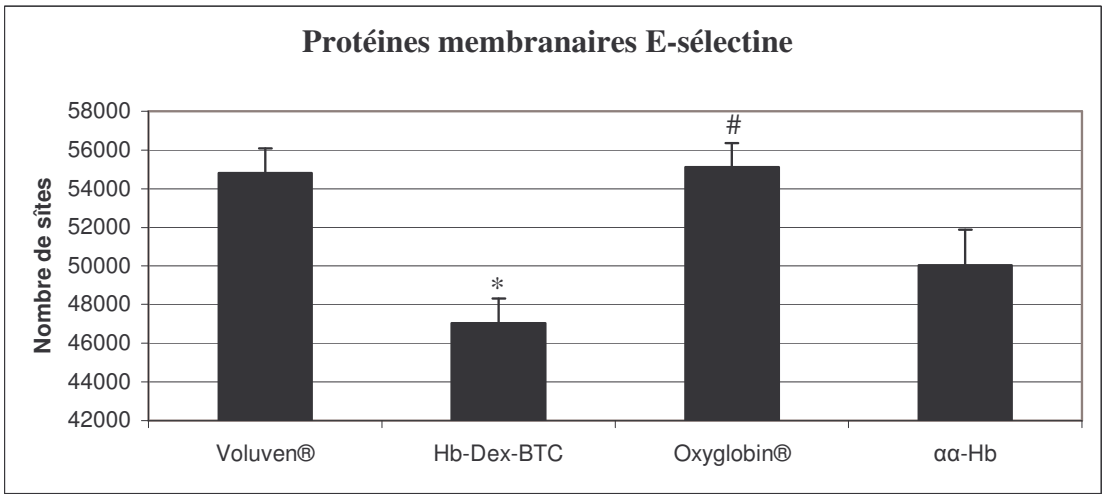


Fig. 62 : Expression membranaire de la E-sélectine après une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins de cellules endothéliales cultivées 4 h sous hypoxie (5%O_2). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=2. * p≤ 0,05 *versus* Voluven®, # p≤ 0,05 *versus* Hb-Dex-BTC

III. Discussion : Réoxygénation par différents substituts sanguins d'HUVEC soumises à 4 h d'hypoxie :

La levée de l'hypoxie a été étudiée au travers du relargage de lactate dans le milieu. L'utilisation d'Oxyglobin® provoque une augmentation de sa concentration. Ensuite, le stress oxydatif a été étudié au travers du relargage d'H_2O_2 par la cellule, de l'autooxydation de l'hémoglobine et de la transcription de l'hème oxygénase-1 sensible à la présence d'hémoglobine libre et de metHb. La réoxygénation provoque la libération et la formation d'espèces réactives de l'oxygène par la cellule endothéliale (Ziegelstein *et al*., 2004) comme l'H_2O_2. Cette libération est d'autant plus importante et rapide que la levée d'hypoxie est brutale (Kinnula *et al*., 1993). L'utilisation d'Oxyglobin® pour réoxygéner les HUVEC a mis en évidence une forte augmentation de la concentration en H_2O_2, peut-être due à un meilleur apport en O_2 aux cellules. Cependant, cet HBOC à une P_{50} de 27 mm Hg comprise entre celles de l'Hb-Dex-BTC (23 mm Hg) et de l'αα-Hb (29,5 mm Hg). Donc la capacité de relargage ou le transport d'O_2 par l'Oxyglobin® ne semble pas en être responsable. La réponse se trouve peut-être dans la structure même de l'hémoglobine modifiée, ou bien dans la solution de

conditionnement, mais l'αα-Hb est aussi formulée dans du Ringer lactate comme l'Oxyglobin®. La polymérisation au glutaraldéhyde et/ou l'origine de l'hémoglobine (humaine pour l'Hb-Dex-BTC et l'αα-Hb, bovine pour Oxyglobin®) reste(nt) la(es) seule(s) solution(s).

La production d'espèces réactives de l'O_2 est responsable de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+}, c'est-à-dire du passage d'oxyhémoglobine en methémoglobine. Au regard de la forte production d'H_2O_2 en présence d'Oxyglobin®, le taux de metHb après réoxygénation devrait être plus élevé que pour l'αα-Hb. Cependant, le pourcentage de metHb est doublé pour l'Oxyglobin® alors qu'il reste inchangé pour l'αα-Hb, contenant déjà beaucoup de metHb. Même si le mécanisme de surproduction d'H_2O_2 par des HUVEC réoxygénées en présence d'Oxyglobin® reste inconnu, on peut déjà en mesurer les conséquences sur l'oxydation de l'hémoglobine. On peut aussi s'interroger sur le rôle potentiel de la quantité de metHb présente dans l'αα-Hb avant la réoxygénation. En effet, l'H_2O_2 consommé pour l'oxydation de l'Oxyglobin® produit de l'OH° et OH^- qui seront retransformés par la cellule endothéliale en H_2O_2 moins toxique. Enfin, la présence de metHb au contact des cellules endothéliales provoque l'activation de la transcription de HO-1 (Foresti *et al*., 2006). Nos résultats mettent en évidence que, non seulement la réoxygénation en présence de Voluven® ou d'Hb-Dex-BTC provoque une diminution de la transcription de HO-1 mais, qu'avec les autres HBOC (Oxyglobin® et αα-Hb), cette transcription retourne au niveau initial de transcription induit par l'hypoxie elle-même. Cette réaction de la cellule n'est pas étonnante, puisque ces deux HBOC contiennent le plus fort taux (dépassant les 10% du seuil de toxicité pour l'organisme) de metHb et que l'hémoglobine qui les compose n'est pas « protégée » par une modification comme le dextran pour l'Hb-Dex-BTC.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'impact de la réoxygénation sur les facteurs gouvernant la vasomotricité commandée, *via* la synthèse de NO, par les cellules endothéliales. La réoxygénation en présence d'HBOC augmente la production de nitrite et de nitrate. Ces concentrations cumulées de nitrite et de nitrate sont moins importantes en présence d'Hb-Dex-BTC que pour l'Oxyglobin® et l'αα-Hb, et équivalentes pour ces deux derniers. L'hypoxie engendre une vasodilatation pilotée par la production de NO (Paffett *et al*., 2007). Etant donné que l'Hb-Dex-BTC diminue les concentrations de nitrite et de nitrate (par action directe sur l'activité de la eNOS ou piégeage de NO), on peut penser qu'elle induirait une diminution de la vasodilatation engendrée par l'hypoxie. L'Oxyglobin® et l'αα-Hb ne semblent pas avoir cet effet, donc ils ne piègeraient pas NO et n'induiraient pas de retour à l'homéostasie du vaisseau. L'observation de la transcription de la eNOS nous permet

de trancher la question. En effet, la réoxygénation diminue fortement la transcription de la eNOS en deçà de son niveau d'expression basal dans une cellule quiescente, et ce, quel que soit le substitut utilisé. Ceci confirme la dépendance de la eNOS à la PO_2, c'est-à-dire l'induction de sa transcription sous hypoxie et sa diminution après réoxygénation (Coulet *et al*., 2003). Cependant, l'Oxyglobin® induit une transcription plus forte du gène de la eNOS que l'Hb-Dex-BTC pour une retour à l'état d'une cellule quiescente. Donc l'Hb-Dex-BTC semble ne pas piéger NO car, sinon, on assisterait à une augmentation de la transcription de eNOS pour compenser sa baisse de biodisponibilité. L'Oxyglobin® induit à la fois une augmentation du taux d'ARNm de la eNOS et de la concentration nitrite-nitrate comparé aux autres HBOC. Ceci peut s'expliquer par la sensibilité de la transcription de la eNOS à la production d'ERO (López-Ongil *et al*., 1998). Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la transcription (ou stabilité) de l'ARNm de la eNOS en présence d'Oxyglobin® par rapport à l'Hb-Dex-BTC et à l'αα-Hb. En effet, celle-ci induit une plus forte libération d'H_2O_2 que les autres HBOC.

Finalement, l'hypoxie est un stress induisant une réaction inflammatoire par les cellules endothéliales (Arnould *et al*., 1995). A cette inflammation préexistante, peut s'ajouter celle de l'injection de substituts sanguins. L'étude du taux d'ARNm d'ICAM-1 et E-sélectine a montré que la réoxygénation diminuait le stress inflammatoire imposé par l'hypoxie. De plus, dans le cas de ICAM-1, et contrairement à l'Hb-Dex-BTC, l'ajout d'Oxyglobin® ou d'αα-Hb provoque une inflammation au niveau de l'endothélium. L'Hb-Dex-BTC, quant à lui, n'induit que très légèrement la transcription de la E-sélectine comparé au Voluven® (témoin négatif) et aux autres HBOC. L'expression membranaire reste inchangée quel que soit l'HBOC utilisé alors que l'expression de la E-sélectine est réduite en présence d'Hb-Dex-BTC.

L'Hb-Dex-BTC serait l'HBOC, parmi ceux étudiés, induisant le moins d'inflammation lors de la réoxygénation d'HUVEC placées 4 h en hypoxie, donc le plus furtif. Il permettrait un meilleur retour du vaisseau à l'homéostasie en terme de vasomotricité. Enfin, il serait l'HBOC, parmi ceux étudiés, qui induirait le moins de stress oxydatif au moment de la réoxygénation des cellules endothéliales. Dans le cadre de notre étude, c'est-à-dire par rapport aux autres substituts sanguins testés et à la réoxygénation suite à une hypoxie modérée pendant un temps réduit, l'Hb-Dex-BTC s'avère le meilleur candidat.

IV. Impact de la réoxygénation par différents substituts sanguins des cellules endothéliales soumises à **24 h** d'hypoxie modérée (5% O_2) :

IV.1. Hypoxie/réoxygénation et stress oxydatif :

IV.1.1. Production de lactate :

La production de lactate suite à la réoxygénation d'HUVEC hypoxiées 24 h ne présente aucune différence quel que soit le substitut sanguin utilisé (résultats non présentés).

IV.1.2. Production d'H_2O_2 :

Après 24 h d'hypoxie suivie d'une heure de réoxygénation, les HUVEC libèrent 0,3 µM d'H_2O_2 pour 10^6 cellules. La perfusion de Voluven®, Hb-Dex-BTC et αα-Hb diminue cette libération de 2 fois environ, alors que l'utilisation d'Oxyglobin® l'augmente de 3,6 fois (Fig. 63).

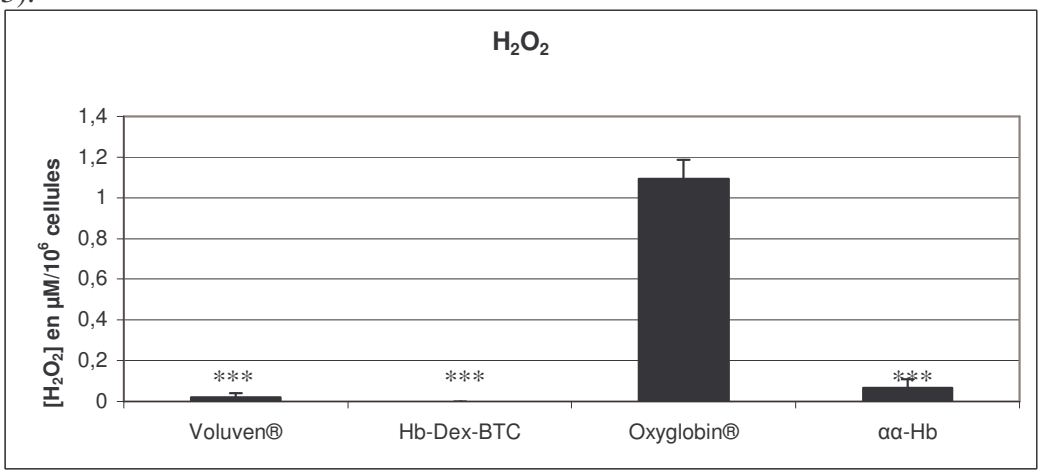


Fig. 63 : Production d'H_2O_2 par des HUVEC soumises à 24 h hypoxie (5% O_2) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. La quantification d'H_2O_2 est réalisée par dosage à la HRP/résorufine (Invitrogen, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3. *** $p \leq 0{,}001$ *versus* Oxyglobin®.

IV.1.3. Autooxydation de l'hémoglobine :

Après 1 h de réoxygénation des cellules endothéliales placées 24 h sous hypoxie, les taux de metHb ne varient pas en ce qui concerne l'αα-Hb et l'Oxyglobin®, mais pour l'Hb-Dex-BTC il augmente de 6% (Tableau XI). Cependant, le pourcentage initial de metHb dans l'Hb-Dex-BTC est inférieur à ceux des deux autres HBOC et l'était aussi dans la solution stock.

Tableau XI : Pourcentage de metHb présent dans chaque échantillon de substitut sanguin avant (stock) et après réoxygénation pendant 1 h d'HUVEC placées préalablement en hypoxie 24 h.

	MetHb	
	Stock	24 h hypoxie
αα-Hb	24 ± 7	26 ± 1
Hb-Dex-BTC	0,5 ± 0,5	6 ± 1
Oxyglobin®	6 ± 5	7,5 ± 0,7

IV.1.4. Transcription du gène HO-1 :

La réoxygénation des HUVEC en présence de Voluven® et d'Hb-Dex-BTC diminue fortement (3 fois) jusqu'au niveau basal, la transcription de HO-1 engendrée par 24 h d'hypoxie (Fig. 64). Cependant, l'Oxyglobin® et l'αα-Hb n'ont pas cet effet. La présence d'Hb-Dex-BTC passerait inaperçue pour les détecteurs impliqués dans la transcription d'HO-1.

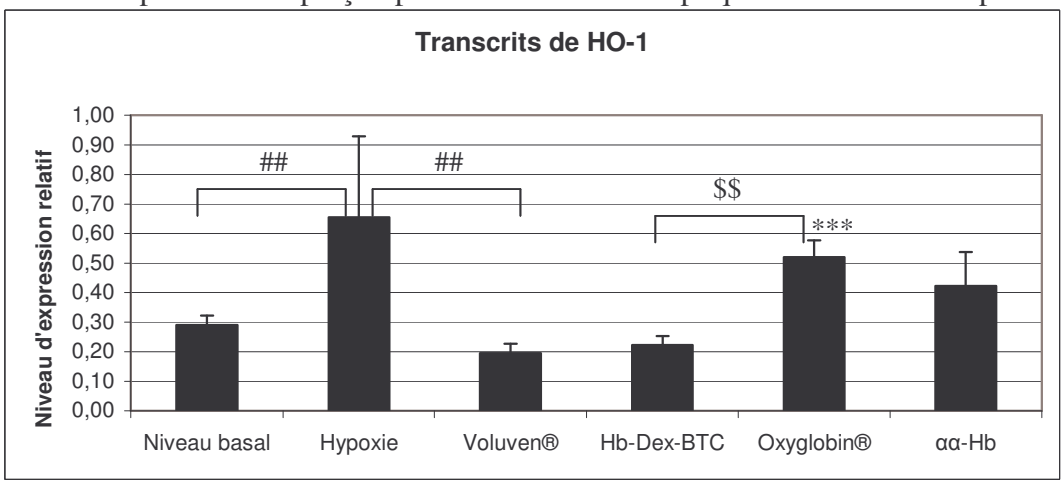


Fig. 64 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de HO-1 après culture des cellules endothéliales pendant 24 h sous hypoxie ($5\%O_2$) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ## $p \leq 0,01$ *versus* hypoxie ; ***$p \leq 0,001$ *versus* Voluven® ; $$ $p \leq 0,01$ *versus* Hb-Dex-BTC.

IV.2. Hypoxie/réoxygénation et facteurs de vasomotricité :

IV.2.1. Production de nitrite/nitrate :

Après 24 h d'hypoxie comme après 4 h, on retrouve la même concentration en nitrite (8-9 µM/10^6 cellules) (Fig. 65). La réoxygénation en présence de Voluven®, Hb-Dex-BTC et αα-Hb a le même effet, c'est-à-dire, diminue fortement la concentration en nitrite. Celle-ci reste la même en présence d'Oxyglobin® qu'après 24 h d'hypoxie.

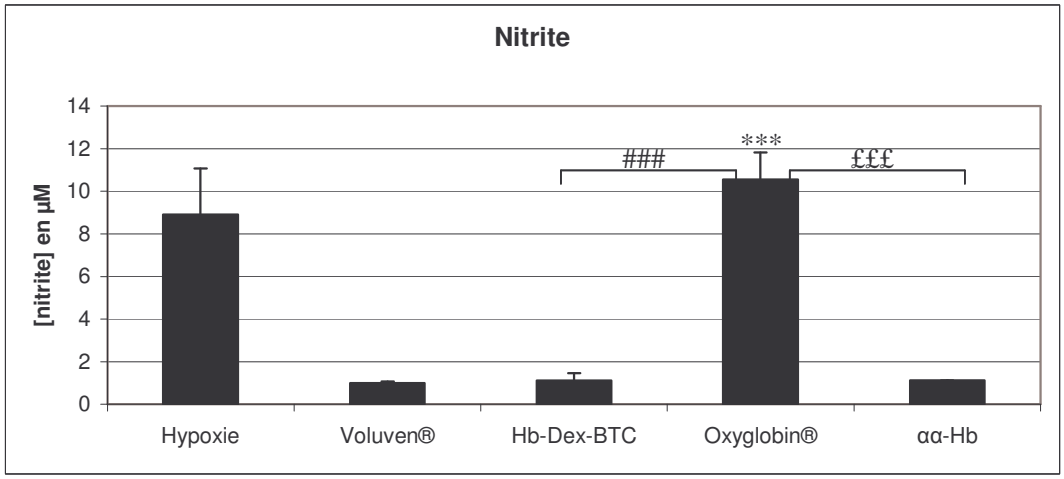


Fig. 65 : Production de nitrite pour 10^6 HUVEC cultivées 24 h en hypoxie et réoxygénées avec différents substituts sanguins. Dosage à l'aide du réactif de *Griess* (R&D system, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, *** $p \leq 0,001$ *versus* Voluven® ; ### $p \leq 0,001$ *versus* Hb-Dex-BTC ; $$$ $p \leq 0,001$ *versus* Oxyglobin®.

L'étude des concentrations de nitrate présente le même profil (Fig. 66). Le taux de nitrate augmente lorsque l'Oxyglobin® est utilisée pour réoxygéner les HUVEC, comparé au trois autres substituts sanguins utilisés.

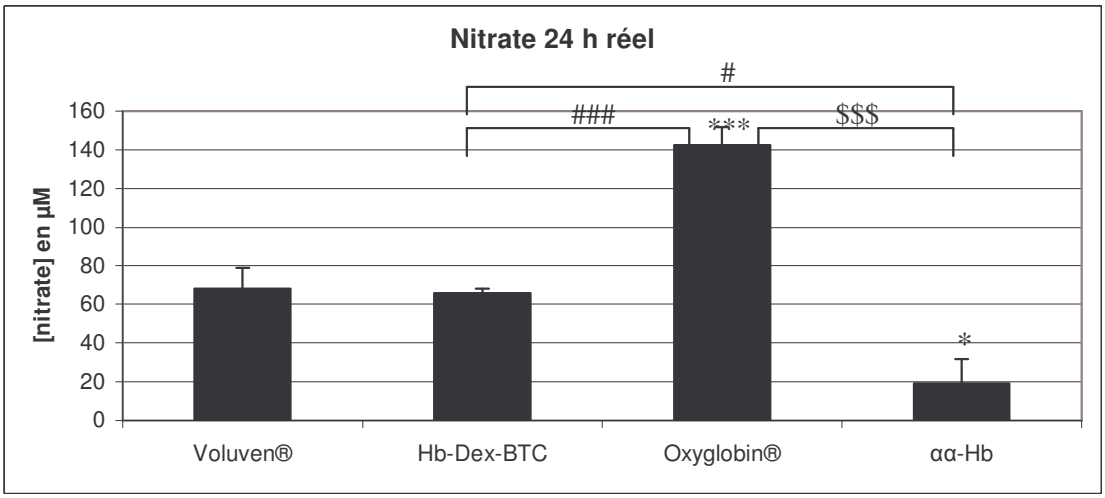


Fig. 66 : Production de nitrate pour 10^6 HUVEC cultivées 24 h en hypoxie et réoxygénées avec différents substituts sanguins. Dosage à l'aide du réactif de *Griess* (R&D system, France) après action de la nitrate réductase (R&D system, France). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,01$ *versus* Voluven® ; # $p \leq 0,05$, ### $p \leq 0,01$ *versus* Hb-Dex-BTC ; $$$ $p \leq 0,01$ *versus* Oxyglobin®.

IV.2.2. Transcription du gène de la eNOS :

L'utilisation de Voluven® pour la réoxygénation des HUVEC après 24 h d'hypoxie n'a aucun effet sur la transcription de eNOS comparée à celle induite par l'hypoxie elle-même (Fig. 67). L'Hb-Dex-BTC augmente le NER de 1,5 fois, l'Oxyglobin® de 2,4 fois. La réoxygénation à l'aide des HBOC testés pourrait donc induire une vasodilatation par augmentation de la quantité de NO synthétisé par les cellules endothéliales.

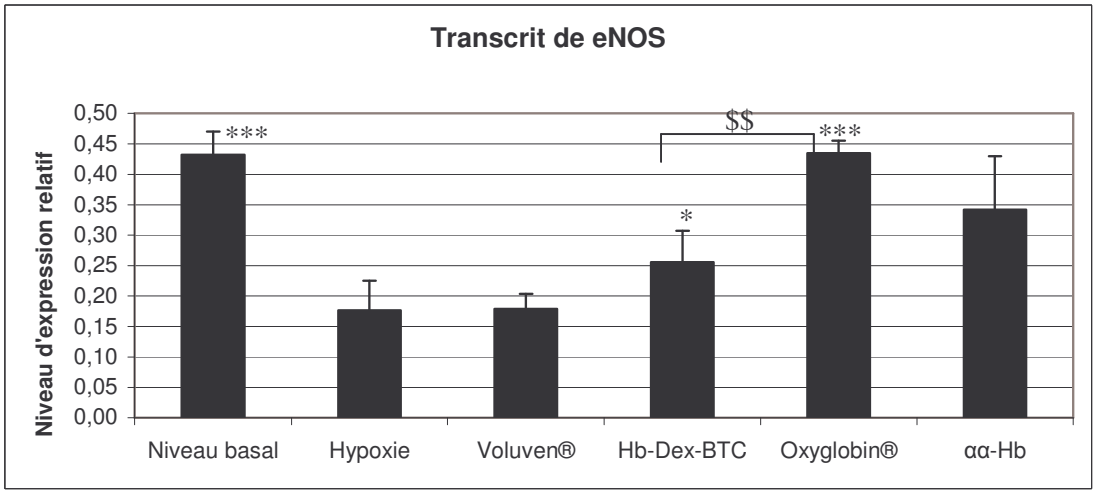


Fig.67 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la eNOS après culture des cellules endothéliales pendant 24 h sous hypoxie ($5\%O_2$) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, * $p \leq 0,05$, ***$p \leq 0,001$ *versus* Voluven® ; $$ $p \leq 0,01$ *versus* Hb-Dex-BTC.

IV.3. Hypoxie/réoxygénation et inflammation :

IV.3.1 Transcription d'ICAM-1 et E-sélectine :

Les niveaux de transcription d'ICAM-1 et E-sélectine présentent approximativement le même profil (Fig. 68 et 69). En effet, la réoxygénation cellulaire en présence de Voluven® ou d'αα-Hb augmente de 6 fois la transcription d'ICAM-1 (jusqu'au niveau) et de 100 fois celle de la E-sélectine comparée au NER après 24 h d'hypoxie. L'utilisation d'Hb-Dex-BTC ou d'Oxyglobin®, accroît davantage ce phénomène (1,6 fois par rapport au Voluven®) pour ICAM-1. La E-sélectine n'est sur-transcrite qu'en présence d'Oxyglobin® (1,7 fois comparé au Voluven®). La réoxygénation pendant 1 h de cellules endothéliales placées 24 h en hypoxie induit une inflammation supérieure à celle de l'hypoxie elle-même.

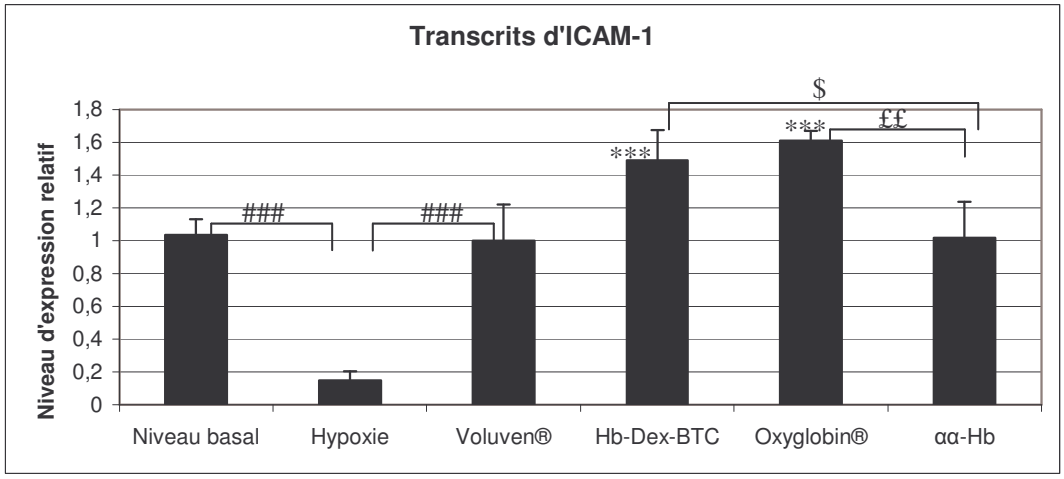


Fig. 68 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène d'ICAM-1 après culture des cellules endothéliales pendant 24 h sous hypoxie ($5\%O_2$) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ###p ≤ 0,001 *versus* hypoxie ; *** p ≤ 0,001 *versus* Voluven® ; $ p≤ 0,05 *versus* Hb-Dex-BTC ; ££ p ≤ 0,01 *versus* Oxyglobin®.

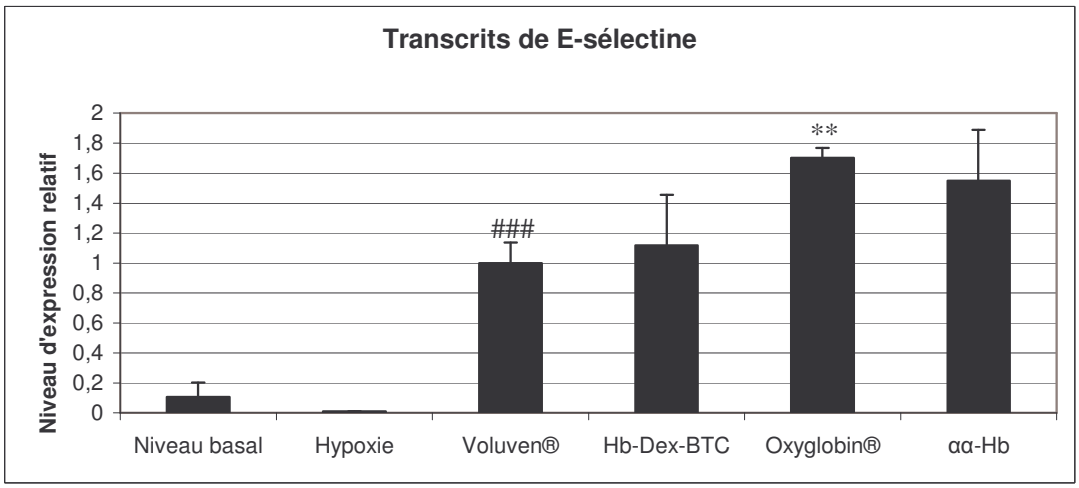


Fig. 69 : Niveaux d'expression relatifs des ARNm du gène de la E-sélectine après culture des cellules endothéliales pendant 24 h sous hypoxie ($5\%O_2$) suivies d'une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3, ### p≤ 0,001 *versus* hypoxie, ** p≤ 0,01 *versus* Voluven®.

IV.3.2. Expression membranaire d'ICAM-1 et E-sélectine :

L'expression membranaire d'ICAM-1 après réoxygénation avec de l'Hb-Dex-BTC est augmentée comparé au Voluven® et aux deux autres HBOC (Fig. 70). L'expression membranaire de la E-sélectine, quant à elle, est diminuée par la réoxygénation en présence d'Hb-Dex-BTC comparé au Voluven® (Fig. 71).

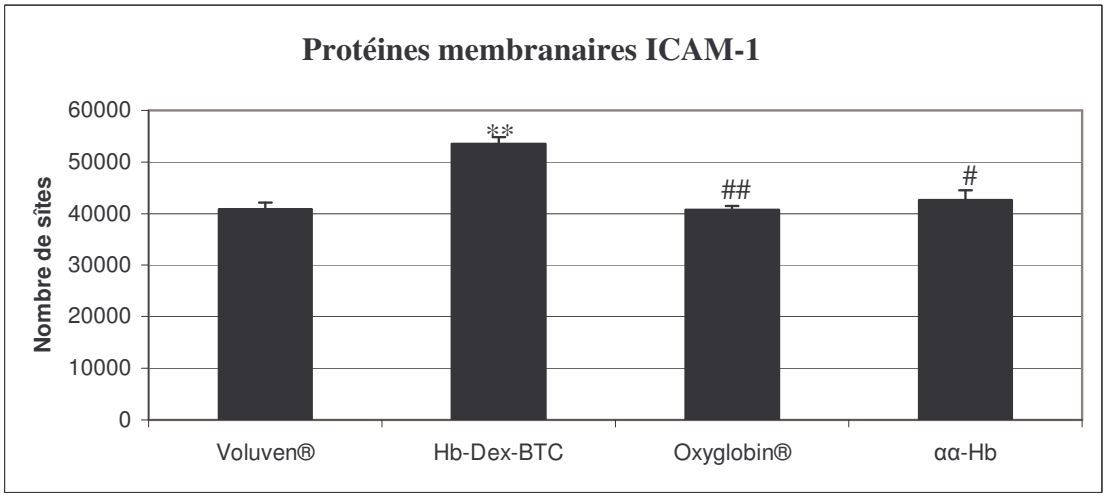


Fig. 70 : Expression membranaire d'ICAM-1 après une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins de cellules endothéliales cultivées 24 h sous hypoxie (5%O_2). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=2. ** p≤ 0,01 *versus* Voluven®, # p≤ 0,05, ## p≤ 0,01 *versus* Hb-Dex-BTC.

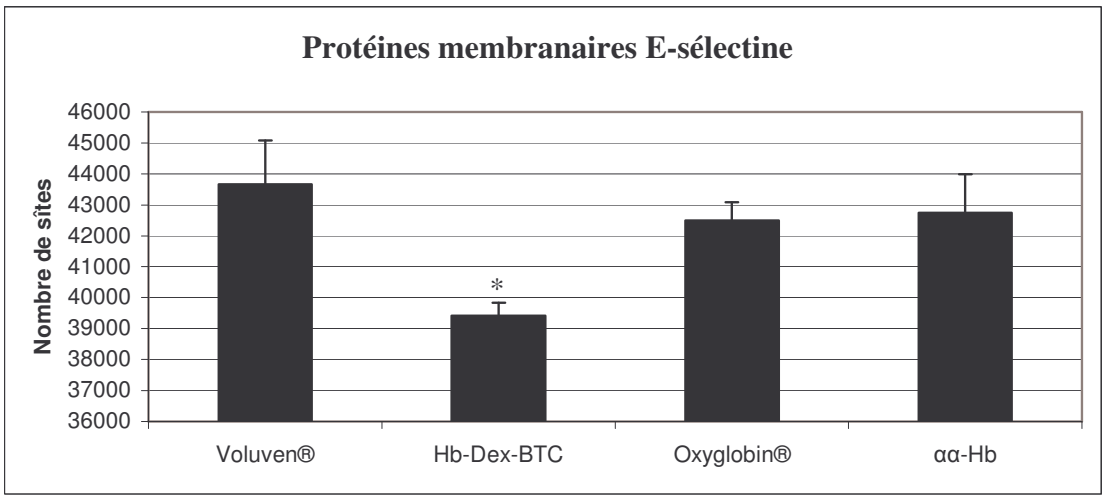


Fig. 71 : Expression membranaire de la E-sélectine après une heure de réoxygénation avec différents substituts sanguins de cellules endothéliales cultivées 24 h sous hypoxie (5%O_2). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=2. * p≤ 0,05 *versus* Voluven®.

V. Discussion : Réoxygénation par différents substituts sanguins d'HUVEC soumises à 24 h d'hypoxie :

La réoxygénation par divers substituts sanguins de cellules endothéliales placées 24 h en hypoxie permet d'étudier l'interaction HUVEC/substituts dans le cadre d'une situation plus chronique, comme l'anémie. Après 24 h sous hypoxie, les HUVEC produisent une quantité maximale d'H_2O_2, tandis que lactate et nitrite sont presque à leur niveau le plus bas. La transcription des gènes activés lors de l'inflammation est nulle, et eNOS et HO-1 recouvrent leur niveau basal de transcription. Nous avons donc étudié le comportement des HUVEC face à une réoxygénation en présence de substituts sanguins transporteurs (HBOC) ou non (Voluven®) d'O_2.

Quel que soit le substitut utilisé, les concentrations de lactate relarguées par les HUVEC pendant la réoxygénation restent invariables. La concentration d'H_2O_2 présente dans le milieu de culture des HUVEC, après réoxygénation avec de l'Oxyglobin®, est nettement supérieure qu'avec les autres substituts. Les mêmes hypothèses que celles émises dans la discussion de la réoxygénation avec l'Oxyglobin® après 4 h d'hypoxie peuvent être avancées. La forte concentration d'H_2O_2 en présence d'Oxyglobin® devrait accroître la formation de metHb. Cependant, le pourcentage de metHb dans la solution d'Oxyglobin® après réoxygénation est identique à celui de la solution stock. La formation de metHb la plus importante est observée avec la solution d'Hb-Dex-BTC. L'oxydation de l'hémoglobine en metHb n'est donc pas corrélée à la production d'H_2O_2 par les HUVEC. La transcription du gène de l'HO-1 n'est pas non plus fonction de la concentration en metHb présente dans les milieux. En effet, elle est maximale pour l'Oxyglobin® et reste inchangée pour l'Hb-Dex-BTC et pour l'αα-Hb alors qu'elles contiennent respectivement 7,5 et 26 % de metHb. Les mécanismes qui régissent l'induction du stress oxydatif pour des HUVEC soumises à l'hypoxie pendant 24 h semblent bien différents de ceux mis en œuvre après 4 h d'hypoxie. Il a été mis en évidence que le dextran a un effet protecteur sur les cellules endommagées par des radicaux libres produits après 24 h d'hypoxie (Hiebert *et al*., 1997). Ceci permettrait d'expliquer l'absence d'H_2O_2 et d'induction de la transcription de HO-1 par la présence d'hémoglobine après réoxygénation.

L'étude des facteurs de vasomotricité, par mesure de la concentration cumulée en nitrite et nitrate, montre qu'elle est nettement supérieure si la réoxygénation est effectuée par de l'Oxyglobin®. Il a été démontré que l'hypoxie induit une vasodilatation des artères systémiques, dont la réoxygénation devrait induire un retour à un diamètre normal du vaisseau

(Greenberg *et al*., 1993). En présence de Voluven®, d'Hb-Dex-BTC et d'αα-Hb, les concentrations sont très inférieures à celles de l'Oxyglobin® et équivalentes entre elles. Ces résultats sont corrélés avec l'augmentation significative du taux d'ARNm de la eNOS en présence d'Oxyglobin®, alors que Voluven®, Hb-Dex-BTC et αα-Hb produisent des taux inférieurs, et équivalents pour Hb-Dex-BTC et αα-Hb. Donc l'Oxyglobin® pourrait avoir deux effets, soit elle piège fortement le NO libéré par les HUVEC, soit elle limite la réoxygénation, ce qui entretiendrait la vasodilatation.

La réoxygénation d'HUVEC placées 24 h sous hypoxie induit une inflammation au travers de l'augmentation de la transcription d'ICAM-1 et E-sélectine. L'utilisation d'Hb-Dex-BTC et d'Oxyglobin® accroît davantage ce phénomène pour ICAM-1, ce qui n'est pas le cas pour l'αα-Hb. Pour la E-sélectine, seule l'Oxyglobin® induit significativement une augmentation de son taux de transcription. Au niveau membranaire, l'Hb-Dex-BTC augmente le nombre de sites ICAM-1 et réduit celui de la E-sélectine. Globalement, la réoxygénation d'HUVEC après 24 h d'hypoxie avec des HBOC induit une plus forte inflammation qu'en présence de Voluven®. L'inflammation serait donc due à la présence d'hémoglobine, ou à l'apport supplémentaire d'O_2 au contact des HUVEC.

VI. Conclusion :

La culture d'HUVEC sous 5% d'O_2 afin de modéliser les effets d'une hypoxie brève (4 h) ou chronique (24 h) compensée par une réoxygénation avec différents substituts sanguins transporteurs ou non d'oxygène, met en jeu des mécanismes de réponses cellulaires relativement différents. Globalement, notre étude montre que l'utilisation d'Hb-Dex-BTC pour la réoxygénation serait la meilleure solution, dans les deux situations, car elle minimise le stress oxydatif et inflammatoire dû à la présence d'hémoglobine. De plus, elle permettrait un meilleur retour à l'homéostasie du vaisseau en ce qui concerne son diamètre.

Partie III

Evaluation de la cytotoxicité de nouvelles hémoglobines

Devant les effets secondaires engendrés par l'administration des différentes générations d'HBOC, d'autres modifications et/ou sources d'hémoglobine ont été envisagées. Notre étude a porté sur la primo-évaluation d'une hémoglobine de nouvelle génération produite par génie génétique par le Dr V. Baudin (INSERM U779, CHU du Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France). C'est une hémoglobine octamérique exprimée chez *E.coli* et obtenue par mutation d'un acide aminé en cystéine pour former deux ponts disulfures (Vasseur-Godbillon *et al*., 2006). Dans un même temps, nous avons évalué la cytotoxicité d'une PEG-Hb préparée par l'équipe du Pr M. Perrella (Université de Milan, Italie), solution témoin susceptible d'harmoniser les protocoles expérimentaux des différentes équipes du projet *EBS*. Pour évaluer la cytotoxicité de ces nouvelles protéines, elles ont été incubées avec des HUVEC et nous avons ensuite observé la morphologie des cellules, leur activité métabolique, ainsi que leur viabilité *via* un test d'apoptose/nécrose.

Ces deux nouvelles hémoglobines ont été synthétisées dans le but d'augmenter la taille de l'hémoglobine pour éviter l'extravasation de l'hémoglobine et limité la vasoconstriction engendrée par l'hémoglobine acellulaire injectée dans la circulation sanguine (Vasseur-Godbillon *et al*., 2006 ; Winslow, 2004 ; Vandegriff *et al*., 2003 ; Manjula *et al*., 2003).

Finalement, des tests préliminaires d'induction de gènes impliqués dans l'inflammation (ICAM-1 et E-sélectine), la vasomotricité (eNOS) et le stress oxydatif (HO-1), sur l'hémoglobine octamérique, ont été effectués.

I. Observation de la morphologie cellulaire :

Les HUVEC ont été incubées 16 h à 37°C sous 5% de CO_2 au contact de différents substituts sanguins pour une dilution à 20% (v/v) et une concentration finale en hémoglobine de 16g/L. Les caractéristiques morphologiques des HUVEC ont alors été observées par microscopie inversée à contraste de phase (Fig. 72). La culture témoin est constituée par des HUVEC cultivées dans du milieu de culture contenant 20% de sérum humain AB. Ces cellules, ainsi que celles incubées avec du Voluven®, forment une monocouche de cellules pavimenteuses, caractéristique des cellules endothéliales. Les cellules incubées avec les HBOC témoins (Hb-

Dex-BTC, Oxyglobin® et αα-Hb) ne semblent pas non plus perturbées. Il en va de même avec l'hémoglobine octamérique. Cependant, les HUVEC incubées avec la PEG-Hb ne forment plus une monocouche. Elles sont devenues rondes et semblent se décoller du support de culture. Cette morphologie cellulaire est typique de cellules endothéliales stressées et dont la diminution de l'adhérence traduit une mort cellulaire. La PEG-Hb semblait donc cytotoxique. Cependant ce type d'hémoglobine ayant déjà été synthétisé auparavant par d'autres équipes et n'induisant pas ce genre de réaction (Nakai *et al*., 1996), nous avons émis l'hypothèse que cette toxicité pouvait être imputable à la présence de PEG libre, produit réputé cytotoxique, dans la solution, et/ou à une forte contamination bactérienne de la solution comportant du fait beaucoup d'endotoxines. L'équipe de M. Perrella a constaté un taux majeur d'endotoxines dans ses échantillons. Les endotoxines présentes dans les solutions de PEG-Hb ont donc été éliminées et la solution de PEG-Hb purifiée, testée à nouveau. Après incubation avec des HUVEC dans les conditions précédemment mentionnées, la morphologie des HUVEC est restée pavimenteuse et le tapis cellulaire intègre (Fig. 73).

Les solutions d'octamère et de PEG-Hb satisfaisant aux premiers critères d'innocuité cellulaire, nous avons approfondi notre étude en mesurant l'activité métabolique de cellules en présence de ces nouvelles hémoglobines.

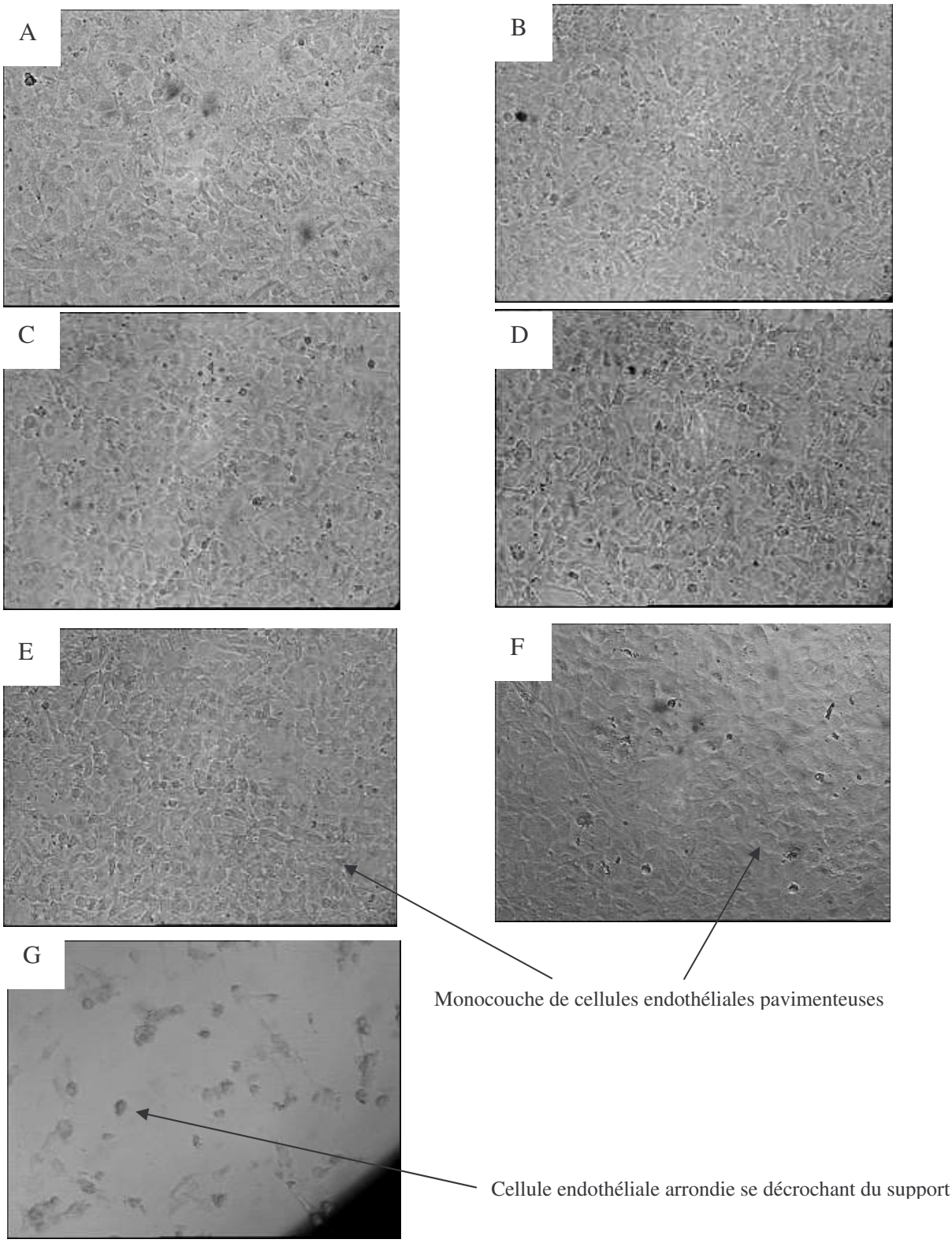


Fig. 72 : Observations par microscopie inversée d'HUVEC incubées 16 h à 37°C, 5% CO_2 avec différents substituts sanguins dilués à 20% pour une concentration finale de 16g/L. A : Témoin milieu, B : Voluven®, C : Hb-Dex-BTC, D : Oxyglobin®, E : αα-Hb, F : Octamère, G : PEG-Hb. Obj. 20, oculaire 10.

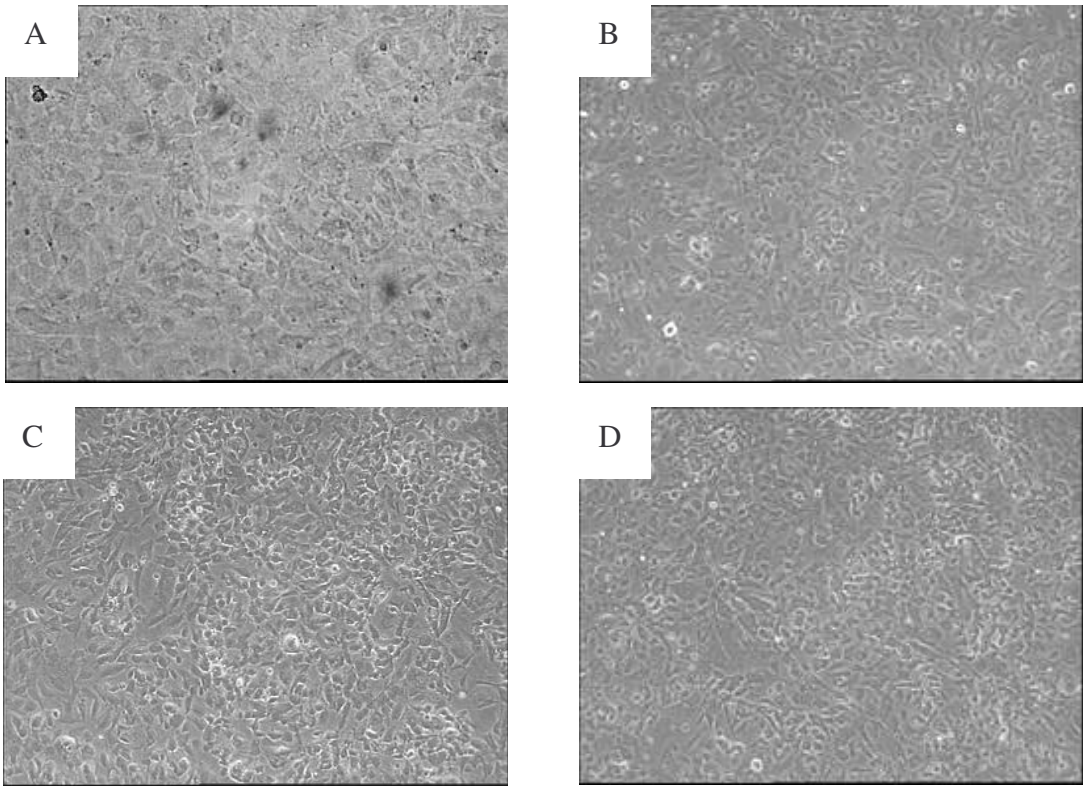


Fig. 73 : Observations par microscopie inversée d'HUVEC incubées 16 h à 37°C, 5% CO_2 avec la solution de PEG-Hb S1 purifiée (B), PEG-Hb S2 (C), PEG-Hb S3 diluées à 20% pour une concentration finale de 16g/L. A : Témoin milieu. Obj 20, oculaire 10.

II. Mesure de l'activité métabolique cellulaire :

L'incubation, pendant 16 h, d'HUVEC avec du Voluven® (notre témoin) est considérée comme aboutissant à l'activité métabolique maximale (i.e. 100%) (Fig. 74).

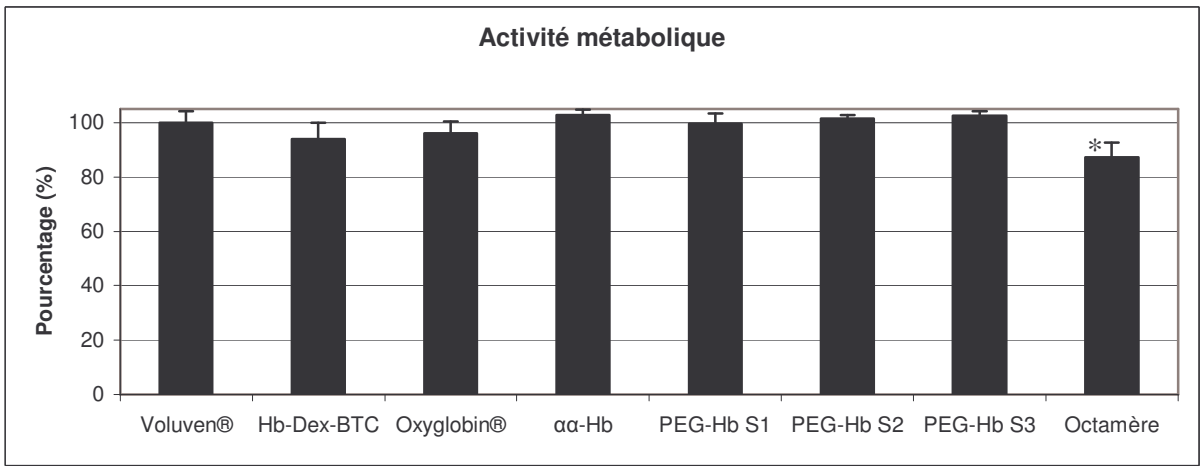


Fig. 74 : Mesure de la viabilité cellulaire par le test Alamar Blue™ (AbD serotec, France). Les HUVEC ont été incubées 16 h en présence de substituts sanguins pour une concentration finale de 16 g/L. n=3 ; * : $p \leq 0,05$ par rapport au Voluven®.

Les cellules mises en présence des HBOC témoins (Hb-Dex-BTC, Oxyglobin® et αα-Hb) présentent une activité métabolique similaire à celle en présence de Voluven®. La PEG-Hb

(purifiée) n'influence pas la réaction de la cellule quelque soit le mode de synthèse utilisé, donc quelque soit le nombre de PEG fixé à l'hémoglobine. Cependant l'octamère diminue légèrement mais significativement (17%) l'activité métabolique des HUVEC. Nous considérons que cette légère diminution d'activité métabolique n'a pas d'influence sur la survie de la cellule ; cependant afin de nous en assurer, des tests de viabilité cellulaire ont été effectués sur ces échantillons.

III. Viabilité cellulaire :

Les substituts sanguins à base d'hémoglobine, de par leur pouvoir oxydant et le stress oxydatif qu'ils peuvent engendrer sur les cellules endothéliales, peuvent induire l'apoptose, voire la nécrose cellulaire. Une culture de cellules classique peut atteindre naturellement 80 à 85 % de cellules viables, 15 à 20 % de cellules en apoptose et un très faible pourcentage de nécrose (1 à 3%) (Jacobi *et al*., 2005). Nos résultats témoins (cellules en présence de milieu) présentent ces mêmes proportions (Fig. 75). Aucun des produits testés ne présente de différence en terme de pourcentages de cellules viables, en apoptose ou en nécrose par rapport au témoin. Les HBOC testés ne semblent donc pas affecter la viabilité cellulaire. Il est à noter que nous n'avons pu appliquer ce protocole à la PEG-Hb purifiée par manque de disponibilité de cette solution.

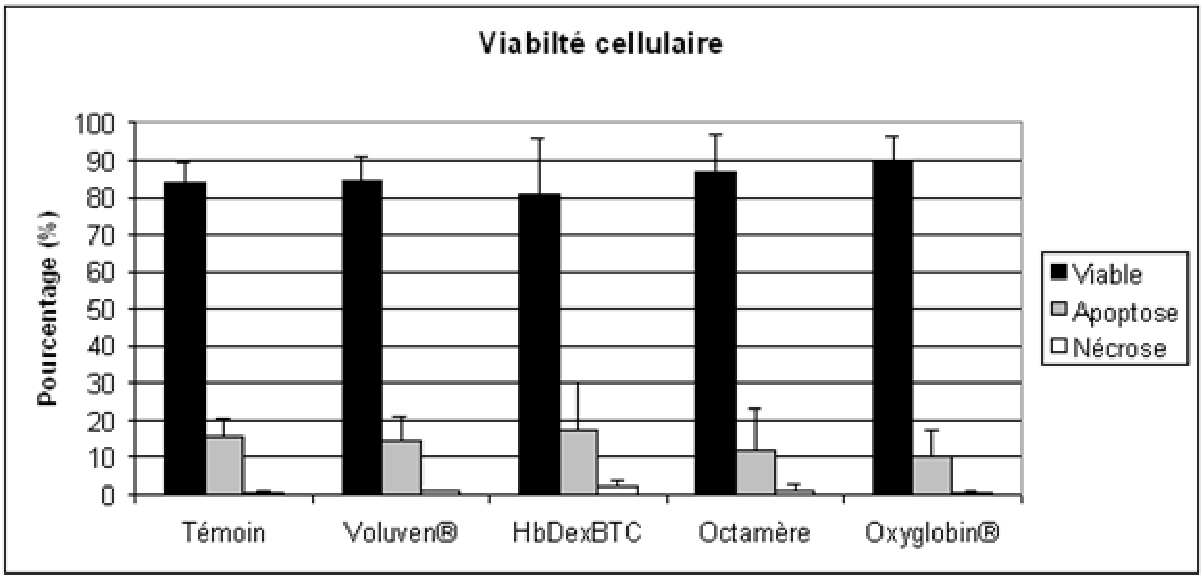


Fig. 75 : Mesure de la viabilité cellulaire d'HUVEC incubées 16 h (à 37°C, 5% CO_2) en présence de différents substituts sanguins avec le kit Vybrant apoptosis (Molecular Probes, France) n=3.

IV. Impact de l'octamère sur la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, la vasomotricité et le stress oxydatif :

Après avoir vérifié l'innocuité de l'octamère sur la viabilité cellulaire, nous avons voulu savoir si cette hémoglobine induisait un changement dans le profil d'expression des gènes des HUVEC. Trois phénomènes clés ont été étudiés, l'inflammation *via* les gènes d'ICAM-1 et d'E-sélectine, la vasomotricité *via* le gène de la eNOS et le stress oxydatif *via* le gène codant pour HO-1.

IV.1. Hémoglobine octamérique et inflammation :

Puisque l'hémoglobine octamérique est produite par génie génétique et exprimée par *E.coli*, on peut se demander si un tel mode de production, associé au caractère inflammatoire de sa présence dans la circulation sanguine, peut influencer la transcription de gènes tels que ICAM-1 et E-sélectine. La quantification du niveau d'expression relatif des ARNmde ces deux gènes, après incubation des HUVEC 16 h en présence d'hémoglobine octamérique, montre une large activation de la transcription d'ICAM-1 et E-sélectine (Fig. 76 et 77).

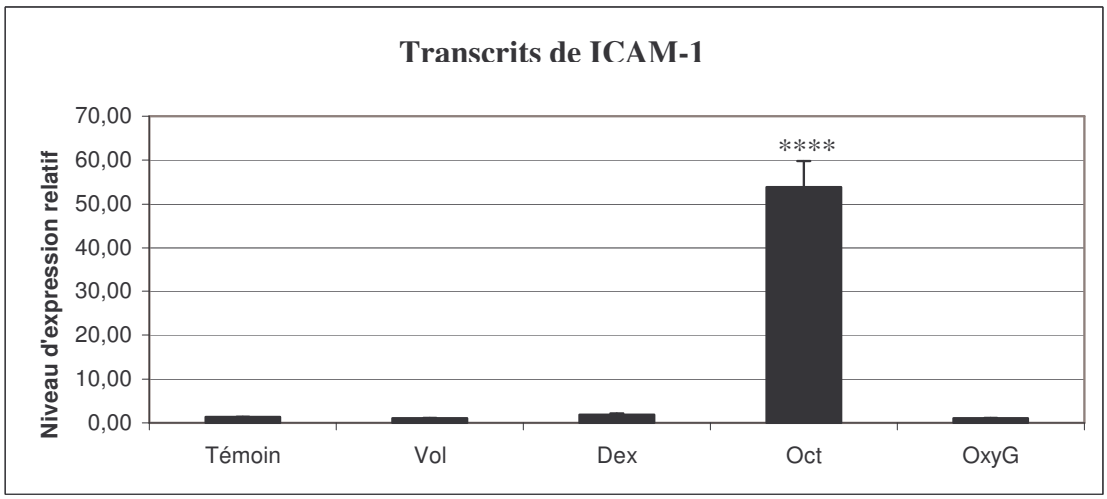


Fig. 76 : Niveau d'expression relatif des ARNm d'ICAM-1 pour des HUVEC incubées 16 h (37°C sous 5% de CO_2) avec différents substituts sanguins. Témoin : Milieu de culture contenant 20% de sérum humain AB. Substituts sanguins dilués à 20% (v/v) dans du milieu de culture : Vol : Voluven®, Dex : Hb-Dex-BTC, Oct : Octamère, OxyG : Oxyglobin® concentration finale de 16g/L. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3 ; **** : $p \leq 0,0001$ par rapport au Voluven®, Hb-Dex-BTC et Oxyglobin®.

Il devenait donc évident que l'octamère induisait un stress inflammatoire sur les HUVEC. Deux hypothèses ont été émises, l'inflammation était soit induite par la protéine elle-même, soit par son mode de préparation. L'expression de la protéine dans *E.coli* se fait en conditions stériles, cependant sa purification, dont les multiples étapes de chromatographie, se

déroulent à 4°C, mais en atmosphère non stérile. La mesure positive du taux d'endotoxines contenues dans les échantillons d'octamère par nos collaborateurs de l'U779, suggère qu'une simple purification pour éliminer les endotoxines suffirait pour réduire le problème inflammatoire. La confirmation de cette hypothèse devrait se faire prochainement.

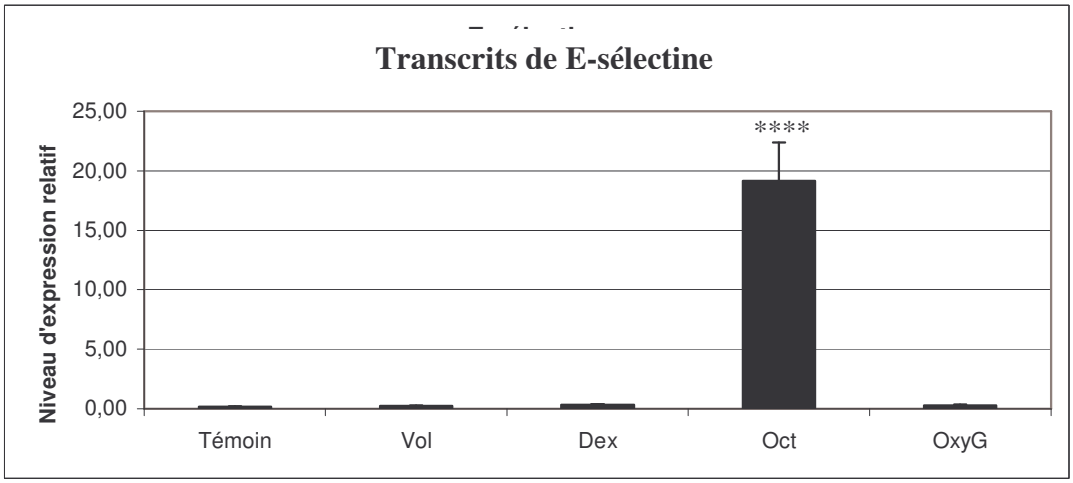


Fig. 77 : Niveau d'expression relatif des ARNm de la E-sélectine pour des HUVEC incubées 16 h (37°C sous 5% de CO_2) avec différents substituts sanguins. Témoin : Milieu de culture contenant 20% de sérum humain AB. Substituts sanguins dilués à 20% (v/v) dans du milieu de culture : Vol : Voluven®, Dex : Hb-Dex-BTC, Oct : Octamère, OxyG : Oxyglobin® concentration finale de 16g/L. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3 ; **** : $p \leq 0,0001$ par rapport au Voluven®, Hb-Dex-BTC et Oxyglobin®.

IV.2. Hémoglobine octamérique et facteurs de vasomotricité :

Il a été largement montré que l'injection d'hémoglobine libre dans la circulation sanguine provoquait une augmentation de la pression artérielle par induction de la vasoconstriction (Kim *et al*., 2005 ; Fitzpatrick *et al*., 2004). La eNOS synthétise NO qui est un médiateur de la vasodilatation et qui serait piégé par l'hémoglobine. L'hémoglobine octamérique a été synthétisée dans le but de limiter la vasoconstriction induite par l'hémoglobine acellulaire. Le niveau d'expression relatif des ARNm du gène de la eNOS, en présence de l'hémoglobine octamérique, est significativement diminué comparé aux autres HBOC (Hb-Dex-BTC et Oxyglobin®) (Fig. 78).

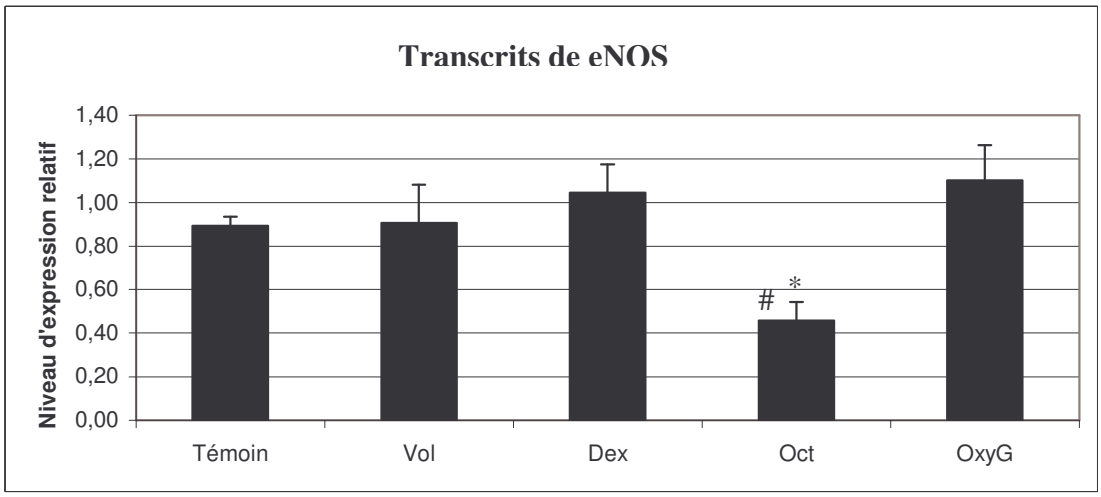


Fig. 78 : Niveau d'expression relatif des ARNm de la eNOS pour des HUVEC incubées 16 h (37°C sous 5% de CO_2) avec différents substituts sanguins. Témoin : Milieu de culture contenant 20% de sérum humain AB. Substituts sanguins dilués à 20% (v/v) dans du milieu de culture : Vol : Voluven®, Dex : Hb-Dex-BTC, Oct : Octamère, OxyG : Oxyglobin® concentration finale de 16g/L. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3 ; * : $p \leq 0,05$ par rapport à l'Hb-Dex-BTC et Oxyglobin® ; # $p \leq 0,05$ par rapport au témoin.

La réaction des cellules endothéliales à la présence d'octamère peut s'expliquer de deux façons différentes. Pour l'une d'elles, une diminution du taux de transcrits d'eNOS implique que l'octamère ne piège pas le NO produit par la cellule et donc n'induirait pas de baisse de sa biodisponibilité. Pour l'autre hypothèse, la transcription de la eNOS ou la stabilité de l'ARNm est, en fait, diminuée par la présence intrinsèque de l'octamère qui pourrait induire une diminution de l'expression de la protéine et donc une diminution de la synthèse de NO. Dans ce cas, on pourrait assister à une vasoconstriction induite par l'inhibition de la synthèse de NO dans la circulation sanguine. Il a été démontré que la transcription ou la stabilité de l'ARNm de la eNOS peut être inhibée ou diminuée par la présence de LDL (*Low density lipoprotein*) oxydées ou de TNF-α au contact des cellules endothéliales (Liao *et al*., 1995 ; Yoshizumi *et al*., 1993). Le TNF-α est produit, entre autres, par l'endothélium en réponse à une inflammation. Or, nous avons observé précédemment que l'octamère induit un fort stress inflammatoire, dû à la présence d'endotoxines. La diminution du taux de transcrits observée suite à l'incubation des HUVEC avec l'octamère pourrait être la conséquence de l'inflammation déclenchée par les endotoxines.

IV.3. Hémoglobine octamérique et stress oxydatif :

L'hémoglobine libre injectée dans la circulation sanguine induit un stress oxydatif dû à son autooxydation en présence d'O_2. Afin de prévoir l'impact du contact entre l'hémoglobine octamérique et les cellules endothéliales, nous avons étudié deux paramètres essentiels à

l'instauration du stress oxydatif. Dans un premier temps, nous avons mesuré le taux d'autooxydation de l'hémoglobine, ou pourcentage de metHb dans la solution et, ensuite, nous avons observé les variations du taux de transcription de HO-1 chez les HUVEC.

IV.3.1. Hémoglobine octamérique et autooxydation :

L'autooxydation de l'hémoglobine est un paramètre important d'évaluation du stress oxydatif appliqué aux cellules endothéliales. Sans compter que, la transformation en metHb rend l'hémoprotéine incapable de transporter l'O_2 et donc inutile pour la réoxygénation des tissus. Les solutions d'octamère sont stockées sous forme HbCO (91%) à -80°C. Après 16 h d'incubation sous 5% CO_2, 95% d'air à 37°C, elles présentent 7% de forme oxy et 75% de metHb, valeur nettement supérieure à celles obtenues avec l'Hb-Dex-BTC et de l'Oxyglobin® (Tableau XII). Ceci montre une faible stabilité de cette hémoglobine modifiée face à l'oxydation. Ce taux élevé de metHb va induire, au contact des cellules, une réaction pouvant se caractériser par l'induction de l'hème oxygénase-1, enzyme nécessaire au catabolisme de l'hème libre pour détoxifier le milieu.

Tableau XII : Concentrations en metHb dans les différentes solutions testées avant (stock) et après incubation 16 h à 37°C, 5% CO_2 au contact d'HUVEC

	MetHb stock en %	MetHb après 1 nuit en %
Hb-Dex-BTC	0,5	41 ± 3
Oxyglobin®	20	62 ± 0,5
Octamère	<5	75 ± 8

IV.3.2. Hémoglobine octamérique et transcription du gène de HO-1 :

HO-1 est une protéine sensible à la concentration d'hémoglobine libre dans la circulation sanguine, ainsi qu'au stress oxydatif (i.e. autooxydation). La variation de la transcription de son gène est donc un bon indicateur qui nous permet de savoir si l'hémoglobine considérée est, ou non, détectée par les cellules endothéliales. L'incubation pendant 16 h d'octamère avec des HUVEC induit considérablement la transcription de HO-1 par rapport au Voluven® (Fig. 79). Ce résultat n'est pas étonnant car le Voluven® ne contient pas d'hémoglobine. Cependant, l'octamère induit une augmentation nettement supérieure du niveau d'expression relatif d'HO-1 comparée à nos deux témoins d'HBOC (Hb-Dex-BTC, Oxyglobin®).

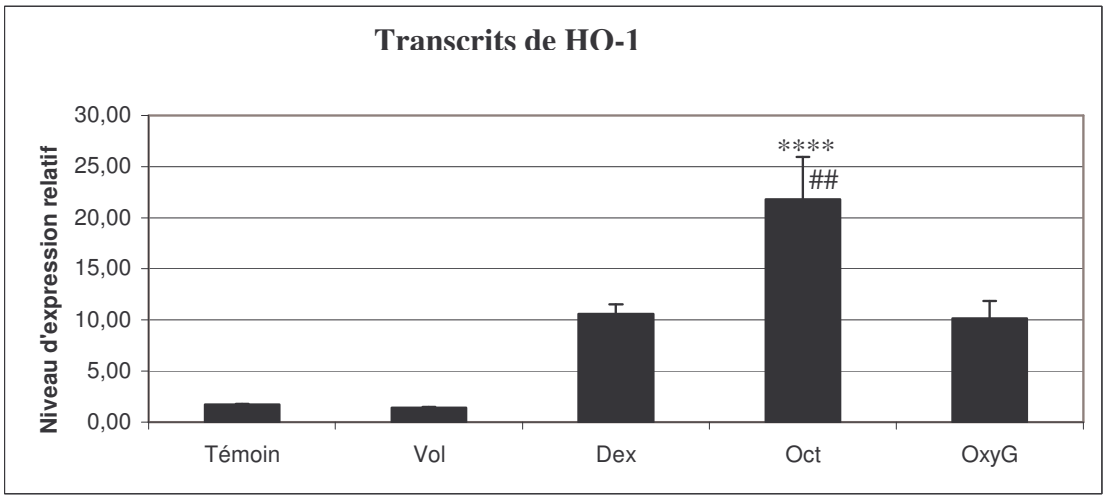


Fig. 79 : Niveau d'expression relatif des ARNm d'HO-1 pour des HUVEC incubées 16 h (37°C sous 5% de CO_2) avec différents substituts sanguins. Témoin : Milieu de culture contenant 20% de sérum humain AB. Substituts sanguins dilués à 20% (v/v) dans du milieu de culture : Vol : Voluven®, Dex : Hb-Dex-BTC, Oct : Octamère, OxyG : Oxyglobin® concentration finale de 16g/L. L'expression des ARNm du gène a été mesurée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire RPS29. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± l'erreur standard à la moyenne. n=3 ; **** : $p \leq 0,0001$ par rapport au Voluven® ; ## : $p \leq 0,01$ par rapport à l'Hb-Dex-BTC et l'Oxyglobin®.

V. Discussion :

Ces premières études *in vitro* de nouvelles solutions d'hémoglobine permettent d'évaluer, d'une part les techniques de synthèse et de purification de l'hémoglobine et, d'autre part, les modifications apportées à la protéine. Nous avons pu confirmer la nécessité de production stérile de l'hémoglobine tout au long des étapes. Toute contamination additionnée à un stress oxydatif provoque une apoptose cellulaire et un décollement du support de culture (Christov *et al*., 2004 ; Bannerman *et al*., 2003), comme c'est le cas pour la PEG-Hb initialement synthétisée. Par contre, une légère contamination n'a d'effet ni sur la morphologie, ni sur la viabilité cellulaire, comme observé avec l'octamère. Cependant, la diminution de l'activité métabolique, engendrée par l'incubation d'octamère avec des HUVEC pendant 16 h, peut être due à la faible contamination de la solution, vérifiée par l'étude de l'inflammation au travers de l'activation de la transcription d'ICAM-1 et E-sélectine.

La PEG-Hb a été synthétisée de trois façons différentes car il a été démontré que le l'augmentation du nombre de thiolation avant couplage au PEG augmentait l'affinité de la PEG-Hb pour l'O_2 (Iafelice *et al*., 2007). Notre étude quant à elle a permis de mettre en évidence que quelque soit le mode de synthèse de la PEG-Hb, soit plus généralement le

nombre de thiolation et de site pégylé, la morphologie cellulaire et l'activité métabolique ne varient pas comparé au témoin.

L'observation du stress oxydatif engendré par l'octamère au contact des HUVEC a révélé sa faible résistance face à l'autooxydation, puisque 75% de la protéine se trouve sous forme de metHb, après 16 h d'incubation à 37°C. Ne disposant pas de témoin Hb libre, nous ne pouvons pas conclure si ce fort taux d'autooxydation est imputable à la non modification de l'Hb ou à la forme octamérique. Des tests quant à l'intégrité de la forme octamérique de l'hémoglobine ont été effectués par nos collaborateurs de l'U779. Ils ont montré que l'octamère n'était pas dissociée en tétramères, dimères ou monomères après nos expériences. La structure de l'octamère est donc conservée et l'utilité première de la mutation, qui est l'augmentation de la taille de l'hémoglobine est conservée. Cependant, la présence de metHb dans les échantillons d'octamère pourrait être responsable de l'activation de HO-1, puisqu'il a déjà été démontré que la metHb pure induit une augmentation de la transcription de HO-1 (Yoshida *et al*., 1998). Or, l'Oxyglobin® présente aussi un fort taux de metHb après incubation (60%), mais n'induit pas plus la transcription de HO-1 que l'Hb-Dex-BTC, qui n'en contient que 40%. Donc, l'activation serait imputable à un autre phénomène, comme l'inflammation que nous avons largement mis en évidence avec la détermination du niveau de transcription d'ICAM-1 et E-sélectine. En effet, il a été démontré que HO-1 était aussi susceptible d'être induite par la présence de TNF-α et IL-1, deux médiateurs de l'inflammation (Terry *et al*., 1998).

L'étude de la transcription de la eNOS a montré une diminution significative par rapport aux HBOC témoins du taux de transcrits. La régulation du taux de transcrit de la eNOS peut s'effectuer au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (destabilisation de l'ARNm) (Papapetropoulos *et al*., 1999). Donc, soit la présence de l'octamère réprime directement la transcription du gène de la eNOS, soit l'ARNm transcrit est déstabilisé. Cependant, il a été démontré que le TNF-α induisait une déstabilisation de l'ARNm de la eNOS (Yoshizumi *et al*., 1993 ; Alonso *et al*., 1997). Finalement, la diminution du taux de transcrit de la eNOS observé en présence d'octamère serait aussi imputable à la contamination de l'échantillon par des endotoxines.

VI. Conclusion :

Ces premiers essais *in vitro* avec l'hémoglobine octamérique paraissent encourageant mais demandent des perfectionnements. Les résultats de cette étude devront être confirmés ou

infirmés en utilisant une solution d'octamère débarrassée de tout contaminant. De plus, il est nécessaire d'effectuer des tests préalables de stabilité de l'hémoglobine modifiée vis-à-vis de l'autooxydation en fonction de la température par exemple. Finalement, si l'autooxydation de l'octamère ne peut être maîtrisée, il serait peut-être utile d'incorporer dans la solution des systèmes anti-oxydants (acide ascorbique, enzymes,…).

Discussion Générale

Discussion générale

Cette étude, financée par le projet *EuroBloodSubstitutes*, avait pour but premier de bâtir une plateforme de techniques d'étude *in vitro*, au plus près des phénomènes rencontrés en clinique, de l'interaction substituts sanguins à base d'hémoglobine/cellules endothéliales. A cet effet, deux systèmes de culture des cellules endothéliales ont été mis au point. Autour de ces systèmes, nous avons développé différentes techniques d'étude des stress oxydatif, inflammatoire et des facteurs impliqués dans la vasomotricité, tant au niveau du comportement de l'hémoglobine, que de celui des cellules endothéliales.

Dans un premier temps, nous avons adapté un système de culture des cellules endothéliales sous contraintes de cisaillement. Ce système a permis de se rapprocher d'une situation de reperfusion d'HBOC pour compenser une hypovolémie sévère, en reproduisant la reprise du flux laminaire au contact des cellules endothéliales. Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons vérifié l'impact de la réoxygénation par des HBOC, sur les cellules endothéliales placées en hypoxie brève permettant de modéliser la compensation d'une hypovolémie à 20% (4 h). Le deuxième protocole permettrait quant à lui de visualiser les effets de l'utilisation de substituts sanguins à base d'hémoglobine dans le cadre d'une anémie (après 24 h d'hypoxie).

I. Evaluation du stress oxydatif :

L'étude du stress oxydatif a mis en évidence une oxydation des HBOC (Hb-Dex-BTC, Oxyglobin®) en metHb lorsqu'ils sont mis au contact des cellules endothéliales cisaillées. Nous avons pu observer une réduction de l'OxHm - composé naturellement présent en faible proportion dans le sang humain - sous contraintes de cisaillement, que nous avons corrélée à l'augmentation de la transcription de HO-1 par les HUVEC. Le flux laminaire appliqué aux HUVEC, combiné à la présence d'HBOC, est donc responsable de l'activation d'un processus de protection des cellules endothéliales face à l'OxHm basé, entre autres, sur l'HO-1. De plus, la présence de metHb est connue pour induire l'activation de la transcription de HO-1. Les proportions de metHb, dans les cultures sous contraintes de cisaillement, sont équivalentes pour l'Hb-Dex-BTC et l'Oxyglobin®. L'induction de la transcription de HO-1 étant plus forte pour l'Oxyglobin® que pour l'Hb-Dex-BTC, nous avons supposé que ce mécanisme se rapportait à la concentration d'OxHm dans le milieu. Donc, au-delà de la concentration en

metHb contenue dans les solutions injectables, le stress oxydatif observé dans de nombreuses études *in vivo* (Alayash, 2001), pourrait être interprété en terme de concentration en OxHm. L'induction de HO-1 par de faibles concentrations d'hème a un effet anti-inflammatoire et cyto-protecteur (Hayashi *et al*., 1999) par la stimulation de la formation de CO et de biliverdine, produits de dégradation de l'hème par HO-1. Cependant, une forte concentration d'hème est délétère pour les tissus, par ses actions pro-oxydante et inflammatoire (Nath *et al*., 2001 ; Wagener *et al*., 2001). Ces actions ne peuvent pas être neutralisées par les propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires des produits de dégradation de l'hème par HO-1. Dans notre étude, les concentrations d'Hb-Dex-BTC et d'Oxyglobin® sont les mêmes ; cependant, elle n'induisent pas HO-1de la même façon. Cette situation pourrait provoquer une réponse différente des cellules endothéliales au niveau inflammatoire.

Après 4 h d'hypoxie, suivies d'une heure de réoxygénation, l'Oxyglobin® induit une augmentation de lactate, H_2O_2 et de son taux de metHb comparé à l'Hb-Dex-BTC et à l'αα-Hb. La transcription d'HO-1 est augmentée à la fois par l'Oxyglobin® et l'αα-Hb. Les résultats, après 24 h d'hypoxie, montrent une augmentation d'H_2O_2 en présence d'Oxyglobin®, alors que le taux de metHb ne varie pas. La production de metHb n'est donc pas corrélée à celle d'H_2O_2. De plus, l'Oxyglobin® induit une élévation du taux de transcription d'HO-1. Donc celle-ci ne semble pas corrélée, dans notre système, au taux de metHb. En rapprochant les résultats après 4 et 24 h d'hypoxie, on peut penser que l'induction de la transcription de HO-1 est engendrée par la production massive d'H_2O_2 par les cellules endothéliales en présence d'Oxyglobin®.

De toutes ces observations, nous avons conclu qu'il est nécessaire de maintenir le taux de metHb en dessous de 10%, seuil maximum de tolérance de l'organisme. Cependant, nous avons montré qu'il était d'autant plus important de mesurer les taux d'OxHm contenus dans les solutions d'HBOC afin de prévoir le stress oxydatif potentiel appliqué, *in vivo*, aux cellules endothéliales lors de la reperfusion.

II. Evaluation de l'inflammation :

L'étude de l'inflammation, induite par la présence d'HBOC au contact des cellules endothéliales cultivées sous contraintes de cisaillement, a montré que ICAM-1 n'est pas influencée par la présence d'HBOC, mais seulement pas le flux laminaire, ceci tant au niveau transcriptionnel, qu'au niveau de son expression membranaire. La E-sélectine paraît plus sensible à la présence d'HBOC associée aux contraintes de cisaillement. En effet, la

transcription de la E-sélectine est augmentée par la présence d'Oxyglobin® et de contraintes de cisaillement, alors que la même culture en présence d'Hb-Dex-BTC, la réprime. Précédemment, nous avons montré que l'induction de la transcription de HO-1 était plus forte pour l'Oxyglobin® que pour l'Hb-Dex-BTC. Donc la répression de la transcription de la E-sélectine ne peut être associée à l'effet anti-inflammatoire du CO et de la biliverdine. Une autre hypothèse concernant la présence de dextran peut être avancée et sera développée ultérieurement. Si nous considérons maintenant l'expression de la protéine au niveau membranaire, nous constatons que la diminution du nombre de sites de E-sélectine sous flux laminaire est effective pour les deux HBOC testés. Celle-ci peut être engendrée par une diminution de son expression au niveau de la membrane, ou à un relargage de la forme soluble de la E-sélectine dans le milieu (Pigott *et al*., 1992).

Pour la levée d'hypoxie, tous les HBOC étudiés induisent une augmentation de la transcription d'ICAM-1 et d'E-sélectine, après 4 h d'hypoxie, avec un effet plus faible en ce qui concerne l'Hb-Dex-BTC. L'étude de l'expression membranaire de ces protéines montre que seule l'Hb-Dex-BTC réduit le nombre de sites de la E-sélectine, comparé aux autres HBOC. Après 24 h d'hypoxie, l'Oxyglobin® induit la transcription d'ICAM-1 et de la E-sélectine, alors que l'Hb-Dex-BTC est impliquée dans celle d'ICAM-1 et augmente l'expression membranaire d'ICAM-1 et d'E-sélectine. Après 4 ou 24 h d'hypoxie, la réoxygénation en présence d'HBOC induit une inflammation qui est cependant plus intense après 24 h qu'après 4h. D'une manière générale, la réoxygénation après 4 ou 24 h d'hypoxie avec l'Hb-Dex-BTC ou l'αα-Hb semble mieux tolérée par la cellule endothéliale qu'en présence d'Oxyglobin®. Ceci montre combien les modifications chimiques apportées à l'hémoglobine, ainsi que sa provenance, pourraient influencer le comportement des cellules endothéliales, et donc des vaisseaux.

Deux informations importantes ressortent de ces études. Tout d'abord, l'utilisation de dextran dans la formulation de l'Hb-Dex-BTC semblerait diminuer l'inflammation engendrée par la présence d'hémoglobine libre au contact des cellules endothéliales. En effet, le dextran rendrait furtives les molécules et ne s'exprimerait que sous contraintes de cisaillement (Ley *et al*., 1989). Cette étude a mis en évidence une diminution de l'adhésion de polynucléaires neutrophiles aux cellules endothéliales, en présence de dextran et proportionnellement aux contraintes de cisaillement appliquées (maximum de 70% à 1 Pa). Notre étude permettrait d'aller plus loin dans cette observation en supposant que le dextran réprimerait, par un

mécanisme inconnu, la transcription de la E-sélectine, uniquement sous contraintes de cisaillement.

La deuxième information, découlant de cette première constatation, est l'importance, dans l'étude des phénomènes inflammatoires engendrés par les HBOC, de l'observation de l'expression de la E-sélectine. En effet, sur les phénomènes courts étudiés ici (6 h de cisaillement, 4 h d'hypoxie) la E-sélectine est la seule à produire une réponse. Ceci s'explique par son implication dans la phase précoce (*rolling*) de la diapédèse. Nous ne pouvons que regretter le manque d'étude dans la littérature sur la E-sélectine en présence d'HBOC.

III. Evaluation de la vasoconstriction :

L'approche des facteurs impliqués dans la vasomotricité a mis en évidence une augmentation, en proportion équivalente, de la concentration de NO en présence d'Oxyglobin® et d'Hb-Dex-BTC sous contraintes de cisaillement, alors qu'ils n'ont aucun effet sur la transcription du gène de la eNOS. En effet, nous savons que l'Hb-Dex-BTC présente une réduction du piégeage de NO dû à une diminution de l'accessibilité du site de fixation de NO, comparé à l'hémoglobine A (Jia *et al*., 2004). En outre, il a été démontré que NO induisait un *feed-back* négatif sur l'activité de la eNOS et non sur celle de la iNOS (Griscavage *et al*., 1995). L'augmentation de NO pourrait alors être due à l'activation de la iNOS, induite par l'inflammation engendrée par la combinaison de la présence d'HBOC et du flux laminaire (Geller *et al*., 1993 ; Ozawa *et al*., 2004). Paradoxalement, un fait majeur est à remarquer pour l'Oxyglobin® qui provoque, en condition statique, une forte augmentation de la quantité d'ARNm de la eNOS, et sous flux laminaire, une annulation de cet effet jusqu'au niveau basal, induit par le flux laminaire lui-même. Ce phénomène reste difficile à expliquer, mais rend compte de l'importance du cisaillement des cellules endothéliales dans l'étude de la présence d'HBOC dans la circulation sanguine.

La présence d'Hb-Dex-BTC au moment de la réoxygénation après 4 h d'hypoxie a montré que la production de NO était diminuée comparée à celle mesurée en présence d'Oxyglobin® ou d'αα-Hb. En revanche, seule la présence d'Oxyglobin® au contact des cellules endothéliales induit la transcription de la eNOS. Il ne semble donc pas y avoir de corrélation entre la production de NO et la transcription de la eNOS après 4 h d'hypoxie, alors qu'après 24 h, NO et la transcription de la eNOS sont stimulés par la réoxygénation en présence d'Oxyglobin®. Les mécanismes mis en œuvre après ces deux durées d'hypoxie ne

sont pas exactement les mêmes, mais d'une façon générale, seule l'Oxyglobin® aurait un effet sur la vasomotricité, responsable, sans doute, d'une augmentation de la vasodilatation. Mais ceci paraît difficile à concevoir.

Finalement, nos études, autant sur la reperfusion que sur la réoxygénation montrent que NO ne serait pas impliqué dans la vasoconstriction engendrée par l'administration d'hémoglobine. Nos observations peuvent être appuyées par celles de Tsaï et ses collaborateurs qui ont montré que des hémoglobines modifiées causant la même réduction de biodisponibilité de NO dans la circulation sanguine, n'induisent pas forcément de vasoconstriction. La PEG-Hb semble maintenir le flux sanguin alors que l'Oxyglobin® et l'αα-Hb provoquent une vasoconstriction. Seuls le type de modification de l'hémoglobine, donc sa taille, et son affinité pour l'O_2 seraient en cause (Tsai *et al*., 2006). En effet, la PEG-Hb est la plus grosse protéine qu'ils ont étudiée, les plus petites molécules serait donc vasoactives (Sakai *et al*., 2000). Selon ce raisonnement, la moins vasoactive des hémoglobines modifiées que nous avons étudiées serait l'Hb-Dex-BTC. Leur deuxième hypothèse concerne l'affinité de l'HBOC pour l'O_2. En effet, un apport excessif en O_2 mène à un autorégulation du diamètre du vaisseau par vasoconstriction périphérique (Tsaï *et al*., 2003). Donc plus la P_{50} des HBOC est faible, plus les phénomènes de vasoconstriction sont limités. Parmi nos HBOC, l'Hb-Dex-BTC est celle présentant la plus faible P_{50} (23 contre 27 pour l'Oxyglobin® et 29,5 pour l'αα-Hb). Cette étude confirme celle de Fitzpatrick *et al*., qui avaient mis en évidence une vasoconstriction suite à l'injection d'Hemopure® (version humaine de l'Oxyglobin®) sans piégeage de NO (Fitzpatrick *et al*., 2004).

D'autre part, NO serait impliqué dans l'apport en O_2 aux tissus suite à une hémorragie (Cabrales *et al*., 2005). Ces auteurs montrent qu'une diminution de l'apport en O_2 aux tissus par la circulation sanguine, suite à une hémorragie, engendre une augmentation de la délivrance de l'O_2 aux tissus chez des souris déficientes en eNOS. Donc la présence de NO dans la circulation sanguine limite la consommation d'O_2 par les tissus. Dans nos conditions expérimentales, la concentration de NO est augmentée par les contraintes de cisaillement et la présence d'HBOC. Ceci pourrait donc être extrapolé à une meilleure oxygénation des tissus suite à la reperfusion avec des HBOC. Il est à noter qu'il existe une sous-forme de NOS dans la mitochondrie (mtNOS) découverte en 1995 (Kobzik *et al*., 1995). A ce jour, son gène n'est pas caractérisé, mais il a été démontré que NO produit par ces mitochondries, en quantité plus importante que celui produit par la eNOS, est responsable d'une inhibition de la respiration cellulaire (Brodsky *et al*., 2002 ; Giulivi, 1998 ; Alvarez *et al*., 2003 ; Ghafourifar *et al*.,

1997). Plus récemment, Dedkova et ses collaborateurs ont mis en évidence une mtNOS dans les cellules endothéliales (Dedkova *et al*., 2004). Dans notre cas, on peut imaginer que la production de NO, alors que la transcription de la eNOS est sous-régulée, pourrait être engendrée par la mtNOS.

IV. Evaluation d'hémoglobines de nouvelle génération :

Les premières études sur l'hémoglobine octamérique ont montré une faible résistance de la protéine à l'oxydation après 16 h d'incubation à 37°C au contact d'HUVEC. Du fait de ce fort taux de metHb, la transcription de HO-1 est très activée, sans pour autant induire le catabolisme de l'octamère, car la séparation par chromatographie n'a montré aucune dissociation de l'octamère. De plus, l'induction de la transcription de HO-1 est beaucoup moins forte pour l'Oxyglobin® qui contient des taux de metHb comparables à l'octamère. La surtranscription de HO-1 pourrait être induite par des mécanismes inflammatoires indépendants de la nature même de la protéine. Cependant, ces études préliminaires attestent du bon comportement de tels types d'HBOC, ce qui permet d'envisager d'évaluer maintenant leurs capacités oxyphoriques, et leur toxicité dans notre système de culture sous contraintes de cisaillement.

Conclusion & Perspectives

Conclusion et Perspectives

L'évaluation de l'impact des substituts sanguins *in vitro* sur des cellules endothéliales est peu utilisée. En effet, les études en cours concernent toutes l'évaluation *in vivo* chez l'animal et la plupart du temps n'ont fait l'objet d'un primo-évaluation *in vitro* qu'à minima. Ce travail original, sur la combinaison de contraintes de cisaillement et des différentes formes d'HBOC, met en évidence la nécessité, pour toutes les études *in vitro*, de tester les HBOC au contact de cellules endothéliales cisaillées. En effet, ce mode de culture fait apparaître des différences majeures, essentiellement sur la transcription de la eNOS (ou stabilité de l'ARNm) pour l'Oxyglobin® et la E-sélectine pour l'Hb-Dex-BTC, dans la réponse des cellules comparée à un culture en condition statique. Un complément d'étude avec d'autres formes d'hémoglobine modifiée permettrait d'ailleurs d'approfondir cette approche de la mécanotransduction.

La deuxième partie de notre étude sur la réoxygénation d'HUVEC cultivées sous hypoxie modérée montre que la transcription de HO-1 n'est pas corrélée, dans notre système, au taux de metHb. En rapprochant les résultats après 4 et 24 h d'hypoxie, on peut penser que l'induction de la transcription de HO-1 est engendrée par la production massive d'H_2O_2 par les cellules endothéliales en présence d'Oxyglobin®. Au niveau des marqueurs de vasoconstriction, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la production de NO et la transcription de la eNOS après 4 h d'hypoxie, alors qu'après 24 h, NO et la transcription de la eNOS sont stimulés par l'apport d'oxygène en présence d'Oxyglobin®.

D'une manière générale, la réoxygénation après 4 ou 24 h d'hypoxie avec l'Hb-Dex-BTC ou l'αα-Hb semble mieux tolérée par la cellule endothéliale qu'avec l'Oxyglobin®. Ceci montre combien les modifications chimiques apportées à l'hémoglobine, ainsi que sa provenance, pourraient influencer le comportement des cellules endothéliales humaines.

Les premières études sur l'hémoglobine octamérique, même si elles ont été entachées par un problème de pureté, ouvrent un nouveau concept qui pourrait s'avérer intéressant en terme de production massive, au niveau industriel, d'hémoglobine modifiée sans agent chimique et structurellement stable.

Dans de prochaines recherches, il pourrait être envisagé d'améliorer le système de culture des cellules endothéliales sous contraintes de cisaillement dans le cadre de l'étude de l'interaction cellules endothéliales/ HBOC. En effet, il serait possible d'y inclure des systèmes

antioxydants comme l'acide ascorbique ou des catalases pour limiter l'autooxydation de l'hémoglobine et se rapprocher au plus près des phénomènes présents dans la circulation sanguine. De plus, il serait intéressant de cultiver les cellules endothéliales sous contraintes de cisaillement, d'induire une ischémie par arrêt de la pompe péristaltique, pouvant éventuellement conduire à l'hypoxie, et de reproduire les conditions de reperfusion en introduisant des HBOC dans le circuit. Ce nouveau système nous permettrait d'allier les résultats obtenus dans les différentes parties de ces travaux afin de créer un modèle d'étude plus complet, et surtout plus proche de la réalité clinique. Et finalement, pour aller plus loin dans l'étude de la vasomotricité sous contraintes de cisaillement, nous pouvons envisager l'application d'un banc de cisaillement récemment développé au laboratoire et consistant en l'application de contraintes de cisaillement à des artères ombilicales endothélialisées.

Références bibliographiques

Réferences bibliographiques

Aird W.C. Endothelial cell heterogeneity. Crit. Care Med. 2003, 31:S221-S230.

Alayash AI. Oxidative mechanisms of hemoglobin-based blood substitutes. Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 2001, 29:415-25.

Alayash A.I. Oxygen therapeuthics : can we tame haemoglobin? Nat. Rev. Drug. Discov. 2004, 3:152-159. Review.

Allen R.T., Hunter W.J., Agrawal D.K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 1997. 37:215-228.

Alonso J, Sánchez de Miguel L, Montón M, Casado S, López-Farré A. Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha. Mol. Cell. Biol. 1997, 17:5719-26.

Alvarez S, Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 305:771-775.

Applegate L.A., Luscher P., Tyrrell R.M. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. Cancer Res. 1991, 51:974-978.

Arnal J.F., Dinh-Xuan A.T., Pueyo M., Darblade B., Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. Cell Mol Life Sci. 1999, 55:1078-1087.

Arnet U.A., Mcmillan A., Dinerman J.L., Ballermann B., Lowenstein C.J. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. J. Biol. Chem. 1996, 271:15069-15073.

Arnould T., Michiels C., Janssens D., Delaive E., Remacle J. Hypoxia induces PMN adherence to umbilical vein endothelium. Cardiovasc Res. 1995, 30:1009-1016.

Babu A.N., Damle S.S., Moore E.E., Ao L., Song Y., Johnson J.L., Weyant M., Banerjee A., Meng X., Fullerton D.A. Hemoglobin-based oxygen carrier induces hepatic heme oxygenase 1 expression in Kupffer cells. Surgery. 2007, 142:289-294.

Bannerman D.D., Goldblum S.E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003, 284:899-914.

Blackwell R.Q., Liu C.S., Wang C.L. Hemoglobin Ta-Li: 83 Gly leads to Cys. Biochim. Biophys. Acta. 1971, 243:467-474.

Brecher M.E., Hay S.N. Bacterial contamination of blood components. Clin. Microbio.l Rev. 2005, 18:195-204.

Brodsky SV, Gao S, Li H, Goligorsky MS. Hyperglycemic switch from mitochondrial nitric oxide to superoxide production in endothelial cells. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2002, 283:2130-2139.

Busse R., Fleming I. Vascular endothelium and blood flow. Handb. Exp. Pharmacol. 2006, 176:43-78.

Cabrales P., Tsai A.G., Frangos J.A., Intaglietta M. Role of endothelial nitric oxide in microvascular oxygen delivery and consumption. Free Radic. Biol. Med. 2005, 39:1229-1237.

Carlos T.M., Harlan J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood. 1994, 84:2068-2101. Review.

Caron A., Menu P., Faivre-Fiorina B., Labrude P., Alayash A., Vigneron C. Systemic and renal hemodynamics after moderate hemodilution with HBOCs in anesthetized rabbits. Am. J. Physiol. 2000, 278:H1974-1983

Catalano C.E., Choe Y.S., Ortiz de Montellano P.R. Reactions of the protein radical in peroxide-treated myoglobin. Formation of a heme-protein cross-link. J. Biol. Chem. 1989, 264:10534-10541.

Cerra F.B., Lajos T.Z., Montes M., Siegel J.H. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. Surgery. 1975, 78:95-104.

Chang T.M. Evolution of artificial cells using nanobiotechnology of hemoglobin based RBC blood substitute as an example. Artif Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 2006, 34:551-566.

Chien S. Molecular basis of rheological modulation of endothelial functions:importance of stress direction. Biorheology 2006, 43:95–116.

Christov A., Ottman J.T., Grammas P. Vascular inflammatory, oxidative and protease-based processes: implications for neuronal cell death in Alzheimer's disease. Neurol Res. 2004, 26:540-546.

Cooke J.P. Flow, NO, and atherogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100:768-770.

Cotran R.S., Moyadas-Norton T. Endothelial adhesion molecules in health and disease. Path. Biol. 1998, 46:164-170.

Coulet F., Nadaud S., Agrapart M., Soubrier F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. J Biol Chem. 2003, 278:46230-46240.

Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. J. Leukoc. Biol. 1998, 63:1-14.

Davies P.F., Volin M.V., Joseph L., Barbee K.A. Endothelial responses to hemodynamic shear stress: spatial and temporal considerations. Vascular endothelium. Physiology, pathology, and therapeutic opportunities. Bron and Schwartz. 1997, Ed. Schattauer.

Dedkova EN, Ji X, Lipsius SL, Blatter LA. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2004, 286:406-415.

Degitz K., Li L.J., Caughman S.W. Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. J Biol Chem. 1991, 266, 14024-14030.

Dewey C.F. Jr., Bussolari S.R., Gimbrone M.A. Jr., Davies P.F. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. J Biomech Eng. 1981, 103:177-185.

Dreier J., Störmer M., Kleesiek K. Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products. Transfus. Med. Rev. 2007, 21:237-254.

Dull R.O., DeWitt B.J., Dinavahi R., Schwartz L., Hubert C., Pace N., Fronticelli C. Quantitative assessment of hemoglobin-induced endothelial barrier dysfunction. J. Appl. Physiol. 2004, 97:1930-1937.

Edmunds N.J., Moncada S., Marshall J.M. Does nitric oxide allow endothelial cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? In vivo and in vitro studies. J. Physiol. 2003, 546:521-527.

Fablet C., Marden M.C., Green B.N., Ho C., Pagnier J., Baudin-Creuza V. Stable octameric structure of recombinant hemoglobin alpha(2)beta(2)83 Gly-->Cys. Protein Sci. 2003, 12:690-695.

Faivre-Fiorina B., Caron A., Fassot C., Fries I., Menu P., Labrude P., Vigneron C. Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs. Am. J. Physiol. 1999, 276:H766-H770.

Faller D.V. Endothelial cell responses to hypoxic stress. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1999, 26:74-84. Review.

Feng X., Yan W., Wang Z., Liu J., Yu M., Zhu S., Xu J. Hydroxyethyl starch, but not modified fluid gelatin, affects inflammatory response in a rat model of polymicrobial sepsis with capillary leakage. Anesth. Analg. 2007, 104:624-630.

Fitzpatrick C.M., Savage S.A., Kerby J.D., Clouse W.D., Kashyap V.S. Resuscitation with a blood substitute causes vasoconstriction without nitric oxide scavenging in a model of arterial hemorrhage. J. Am. Coll. Surg. 2004, 199:693-701.

Flaherty J.T., Pierce J.E., Ferrans V.J., Patel D.J., Tucker W.K., Fry D.L. Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. Circ Res. 1972, 30:23-33.

Fleming P., Ferguson E., Townsend E., Lowe K.C. Perceptions in transfusion medicine: a pilot field study on risk and ethics for blood and blood substitutes. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2007, 35: 149-56.

Foresti R., Bains S., Sulc F., Farmer P.J., Green C.J., Motterlini R. The interaction of nitric oxide with distinct hemoglobins differentially amplifies endothelial heme uptake and heme oxygenase-1 expression. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006, 317:1125-1133.

Forestier F., Janvier G. - Actualités sur les solutés de remplissage en anesthésie. In : SFAR, éd. Conférences d'actualisation. 42e Congrès national d'anesthésie et réanimation. 2000. 151-163.

Forstermann U. and Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. N-S. Arch. Pharmacol. 1995, 352:351-364. Review.

Geller D.A., Nussler A.K., Di Silvio M., Lowenstein C.J., Shapiro R.A., Wang S.C., Simmons R.L., Billiar T.R. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993, 90:522-526.

George P., Irvine D.H. The reaction between metmyoglobin and hydrogen peroxide. Biochem. J. 1952, 52:511-517.

Geyer R.P., Monroe R.G., Taylor K. Survival of rats having red cells totally replaced with emulsified fluorocarbon. Fed. Proc. 1968, 27:384.

Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. FEBS Lett. 1997, 418:291-296.

Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. Biochem. J. 1998, 332:673-679.

Greenberg B., Kishiyama S. Endothelium-dependent and -independent responses to severe hypoxia in rat pulmonary artery. Am J Physiol. 1993, 265(5):H1712-1720.

Griscavage J.M., Hobbs A.J., Ignarro L.J. Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. Adv. Pharmacol. 1995, 34:215-234.

Groot E., de Groot P.G., Fijnheer R., Lenting P.J. The presence of active von Willebrand factor under various pathological conditions. Curr. Opin. Hematol. 2007, 14:284-289.

Guidance for industry, criteria for safety and efficacity evaluation of oxygen therapeutics as red blood cells substitutes. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. October 2004.

Han H.C., Ku D.N. Contractile responses in arteries subjected to hypertensive pressure in seven-day organ culture. Ann Biomed Eng. 2001, 29:467-475.

Haney C.R., Buehler P.W., Gulati A. Purification and chemical modifications of hemoglobin in developing hemoglobin based oxygen carriers. Adv. Drug Deliv. Rev. 2000, 40:153-169.

Harrison D.G., Widder J., Grumbach I., Chen W., Weber M., Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. J. Intern. Med. 2006, 259:351-63. Review.

Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular

leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. Circ. Res. 1999, 85:663-671.

Hiebert L., Ping T. Protective effect of dextran sulfate and heparin on adult rat cardiomyocytes damaged by free radicals. J Mol Cell Cardiol. 1997, 29:229-235.

Hsieh H.J., Cheng C.C., Wu S.T., Chiu J.J., Wung B.S., Wang D.L. Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. J Cell Physiol. 1998, 175:156-162.

Iafelice R, Cristoni S, Caccia D, Russo R, Rossi-Bernardi L, Lowe KC, Perrella M. Identification of the sites of deoxyhaemoglobin PEGylation. Biochem. J. 2007, 403:189-196.

Ichikawa H., Kokura S., Aw T.Y. Role of endothelial mitochondria in oxidant production and modulation of neutrophil adherence. J Vasc Res. 2004, 41:432-444.

Inada Y., Kurozumi T., Shibata K. Peroxidase activity of hemoproteins. I. Generation of activity by acid or alkali denaturation of methemoglobin and catalase. Arch. Biochem. Biophys. 1961, 93:30-36.

Jacobi J., Kristal B., Chezar J., Shaul S.M., Sela S. Exogenous superoxide mediates pro-oxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. Free Radic. Biol. Med. 2005, 39:1238-1248.

Jia Y., Wood F., Menu P., Faivre B., Caron A., Alayash A.I. Oxygen binding and oxidation reactions of human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran. Biochim. Biophys. Acta. 2004, 1672:164-173.

Keyse S.M., Tyrrell R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989, 86:99-103.

Kim H.W., Greenburg A.G. Mechanisms for vasoconstriction and decreased blood flow following intravenous administration of cell-free native hemoglobin solutions. Adv. Exp. Med. Biol. 2005, 566:397-401.

Kinnula V.L., Mirza Z., Crapo J.D., Whorton A.R. Modulation of hydrogen peroxide release from vascular endothelial cells by oxygen. Am J Respir Cell. Mol. Biol. 1993, 9:603-609.

Kinoshita A., Nakayama Y., Kitayama T., Tomita M. Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. FEBS. J. 2007, 274:1449-1458.

Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 211:375-381.

Kourembanas S. Hypoxia and carbon monoxide in the vasculature. Antioxid. Redox Signal. 2002, 4:291-299. Review.

Kreimeier V., Thiel M., Peter K. Small-volume hyperosmolar resuscitation. Acta Anesthesiol. Scand. Suppl. 1997, 14:302-306.

Kumar V.B., Viji R.I., Kiran M.S., Sudhakaran P.R. Endothelial cell response to lactate: implication of PAR modification of VEGF. J. Cell. Physiol. 2007, 211:477-485.

Lathem W. The renal excretion of hemoglobin: regulatory mechanisms and the differential excretion of free and protein-bound hemoglobin. J. Clin. Invest. 1959, 38:652-658.

Laurindo F.R.M., Pedro M.A., Barbeiro H.V., Pileggi F., Carvalho M.H.C., Augusto O., deLuz P.L. Vascular free radical release: ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. Circ Res. 1994, 74:700-709.

Lawson C., Ainsworth M., Yacoub M., Rose M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. J. Immunol. 1999, 162:2990-2996.

Laxenaire M.C., Charpentier C., Feldman L. - Réactions anaphylactoïdes aux substituts colloïdaux du plasma : incidence, facteurs de risque, mécanismes. Enquête prospective multicentrique française. - Ann. Fr. Anesth. Réan. 1994, 13:301-310.

Levy A., Kuppusamy P., Rifkind J.M. Multiple heme pocket subconformations of methemoglobin associated with distal histidine interactions. Biochemistry. 1990, 29:9311-9316.

Ley K., Lundgren E., Berger E., Arfors K.E. Shear-dependent inhibition of granulocyte adhesion to cultured endothelium by dextran sulfate. Blood. 1989, 73:1324-1330.

Liao J.K., Shin W.S., Lee W.Y., Clark S.L. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1995, 270:319-324.

Linberg R., Conover C.D., Shum K.L., Shorr R.G. Hemoglobin based oxygen carriers: how much methemoglobin is too much? Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 1998, 26:133-148.

Lincz L.F. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. Immunol. Cell Biol. 1998, 76:1-19.

López-Ongil S., Hernández-Perera O., Navarro-Antolín J., Pérez de Lema G., Rodríguez-Puyol M., Lamas S., Rodríguez-Puyol D. Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. Br. J. Pharmacol. 1998, 124:447-454.

Mc Coubrey W.K.Jr., Huang T.J., Maines M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. Eur. J. Biochem. 1997, 247:725-732.

Manjula BN, Tsai A, Upadhya R, Perumalsamy K, Smith PK, Malavalli A, Vandegriff K, Winslow RM, Intaglietta M, Prabhakaran M, Friedman JM, Acharya AS. Site-specific PEGylation of hemoglobin at Cys-93(beta): correlation between the colligative properties of

the PEGylated protein and the length of the conjugated PEG chain. Bioconjug. Chem. 2003, 14:464-472.

Michiels C., Arnould T., Remacle J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1497:1-10. Review.

Min J., Jin Y.M., Moon J.S., Sung M.S., Jo S.A., Jo I. Hypoxia-induced endothelial NO synthase gene transcriptional activation is mediated through the tax-responsive element in endothelial cells. Hypertension. 2006, 47:1189-1196.
Montgomery K.F., Osborn L., Hession C., Tizard R., Goff D., Vassallo C., Tarr P.I., Bomsztyk K., Lobb R., Harlan J.M., Pohlman T.H. Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, 88:6523-6527.

Morigi M., Zoja C., Figliuzzi M., Foppolo M., Micheletti G., Bontempelli M., Saronni M., Remuzzi G., Remuzzi A. Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. Blood 1995, 85:1696-1703.

Motterlini R., Foresti R., Bassi R., Calabrese V., Clark J.E., Green C.J. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. J. Biol. Chem. 2000, 275:13613-13620.

Nagel T., Resnick N., Atkinson W.J., Dewey C.F.Jr., Gimbrone M.A.Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1994, 94:885-891.

Nakai K., Ohta T., Sakuma I., Akama K., Kobayashi Y., Tokuyama S., Kitabatake A., Nakazato Y., Takahashi T.A., Sadayoshi S. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1996, 28:115-123.

Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya CV, Manivel JC, Haggard JJ, Croatt AJ, Payne WD, Alam J. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. Kidney Int. 2001, 59:106-117.

Nishiwaki Y., Yokota T., Hiraoka M., Miyagishi M., Taira K., Isobe M., Mizusawa H., Yoshida M.. Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 310:1062-1066.

Osawa Y., Korzekwa K. Oxidative modification by low levels of HOOH can transform myoglobin to an oxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, 88:7081-7085.

Ozawa N., Shichiri M., Iwashina M., Fukai N., Yoshimoto T., Hirata Y. Laminar shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium. Hypertens. Res. 2004, 27:93-99.

Otrock Z.K., Mahfouz R.A., Makarem J.A., Shamseddine A.I. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. Blood Cells Mol. Dis. 2007, sous presse.

Paffett M.L., Walker B.R. Vascular adaptations to hypoxia: molecular and cellular mechanisms regulating vascular tone. Essays Biochem. 2007, 43:105-119.

Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. Cardiovasc. Res. 1999, 43:509-520.

Pigott R., Dillon L.P., Hemingway I.H., Gearing A.J. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992, 187:584-589.

Pillonel J., Laperche S, Etablissement Français du sang. Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). Euro. Surveill. 2005, 10:5-8.

Powell C.S., Jackson R.M. Mitochondrial complex I, aconitase, and succinate dehydrogenase during hypoxia-reoxygenation : modulation of enzyme activities by MnSOD. Am. J. Physiol-Lung. C. 2003, 285:L189-198.

Pries A.R., Kuebler W.M. Normal endothelium. Handb. Exp. Pharmacol. 2006, 176:1-40.

Qureshi A.I., Suarez I. Use of hypertonic saline solutions in treatment of cerebral edema and intracranial hypertension. Crit. Care Med. 2000, 9:3301-3313.

Rahman A., Kefer J., Bando M., Niles W.D., Malik A.B. E-selectin expression in human endothelial cells by TNFα-induced oxidant generation and NF-κB activation. Am. J. Physiol. 1998, 275:L533-L544.

Reeder B.J., Svistunenko D.A., Sharpe M.A., Wilson M.T. Characteristics and mechanism of formation of peroxide-induced heme to protein cross-linking in myoglobin. Biochemistry 2002, 41:367-375.

Resnick N., Gimbrone M.A. Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. FASEB J. 1995, 9:874-882.

Riess J.G. Perfluorocarbon-based oxygen delivery. Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 2006, 34:567-580.

Rogers M.S., Patel R.P., Reeder B.J., Sarti P., Wilson M.T., Alayash A.I. Pro-oxidant effects of cross-linked haemoglobins explored using liposome and cytochrome c oxidase vesicle model membranes. Biochem. J. 1995, 310:827-833.

Rouger P. Evolution of transfusion risks over a 15-year period (1987-2002). Ann. Fr. Anesth. Reanim. 2004, 23:1102-1106.

Sahni S.K. Endothelial cell infection and hemostasis. Thromb. Res. 2007, 119:531-549.

Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O(2) carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.. 2000, 279:H908-915.

Sampath R., Kukielka G.L., Smith C.W., Eskin S.G., McIntire L.V. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro.Ann Biomed Eng. 1995, 23:247-256.

Sandler S.G., Yu H., Rassai N. Risks of blood transfusion and their prevention. Clin. Adv. Hematol. Oncol. 2003,1:307-313.

Siemionow M., Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsur. 2004, 24:468-475. Review.

Silkworth J.B., McLean B., Stehbens W.E. The effect of hypercholesterolemia on aortic endothelium studied en face. Atherosclerosis 1975, 22:335-348.

Stassen J.M., Arnout J., Deckmyn H. The hemostatic system. Curr. Med. Chem. 2004, 11:2245-2260.

Stehbens W.E. Endothelial cell mitosis and permeability. Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci. 1965, 50:90-92.

Tait J.F., Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. Arch. Biochem. Biophys. 1992, 298:187-191.

Terry C.M., Clikeman J.A., Hoidal J.R., Callahan K.S. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. Am J Physiol. 1998, 274:H883-891.

Tsai A.G., Cabrales P., Manjula B.N., Acharya S.A., Winslow R.M., Intaglietta M. Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. Blood. 2006, 8:3603-3610.

Tsai AG, Vandegriff KD, Intaglietta M, Winslow RM. Targeted O2 delivery by low-P50 hemoglobin: a new basis for O2 therapeutics. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003, 285:H1411-1419.

van Engeland M., Nieland L.J., Ramaekers F.C., Schutte B., Reutelingsperger C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry. 1998, 31:1-9.

Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. Transfusion. 2003, 43:509-516.

Vanin A.F., Bevers L.M., Slama-Schwok A, Van Faassen E.E. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. Cell. Mol. Life Sci. 2007, 64:96-103.

Vasseur-Godbillon C, Sahu SC, Domingues E, Fablet C, Giovannelli JL, Tam TC, Ho NT, Ho C, Marden MC, Baudin-Creuza V. Recombinant hemoglobin betaG83C-F41Y. FEBS J. 2006, 273:230-241.

Veeramachaneni N.K., Harken A.H., Cairns C.B. Clinical implications of hemoglobin as a nitric oxide carrier. Arch. Surg. 1999, 134:434-437.

Vollaard N.B., Reeder B.J., Shearman J.P., Menu P., Wilson M.T., Cooper C.E. A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo. Free Radic. Biol. Med. 2005, 39:1216-1228.

Wagener F.A.D.T.G., Feldman E., De Witte T., Abraham N.G. Heme induces the expression the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E -selectin in vascular endothelial cells. Proc. Soc .Exp. Biol. Med. 1997, 216:456-463.

Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T, Figdor CG. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. Blood. 2001, 98:1802-1811.

Wall R.T., Counts R.B., Harker L.A., Striker G.E. Binding and release of factor VIII/von Willebrand's factor by human endothelial cells. Br. J. Haematol. 1980, 46:287-298.

Weber M., Hagedorn C.H., Harrison D.G., Searles C.D. Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. Circ Res. 2005, 96:1161-1168.

Wechezak A.R., Viggers R.F., Sauvage L.R. Fibronectin and F-actin redistribution in cultured endothelial cells exposed to shear stress. Lab Invest. 1985, 53:639-647.

Welbourn C.R., Goldman G., Paterson I.S., Valeri C.R., Shepro D., and Hechtman H.B. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. Br. J. Surg. 1991, 78:651-655. Review.

Wertheimer S.J., Myers C.L., Wallace R.W., Parks T.P. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. J Biol Chem. 1992, 267:12030-12035.

Wessells H., Teal T.H., Engel K., Sullivan C.J., Gallis B., Tran K.B., Chitaley K. Fluid shear stress-induced nitric oxide production in human cavernosal endothelial cells: inhibition by hyperglycaemia. B.J.U. Int. 2006, 97:1047-1052.

White C.R., Frangos J.A. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2007, 362:1459-1467.

Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive polyethylene glycol-hemoglobin conjugate. Artif. Organs. 2004, 28:800-806.

Yoshida N., Granger D.N., Anderson D.C., Rothlein R., Lane C., Kvietys P.R. Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. Am. J. Physiol. 1992, 262:H1891-1898.

Yoshida T., Biro P., Cohen T., Muller R.M., Shibahara S. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. Eur. J. Biochem. 1998, 171:457-461.

Yoshizumi M., Perrella M.A., Burnett J.C. Jr., Lee M.E. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. Circ. Res. 1993, 73:205-209.

Zembowicz A., Tang J.L., Wu K.K. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. J. Biol. Chem. 1995, 270:17006-17010.

Ziegelstein R.C., He C., Hu Q. Hypoxia/reoxygenation stimulates Ca2+-dependent ICAM-1 mRNA expression in human aortic endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2004, 322:68-73.

Ziegler T., Bouzourene K., Harrison V.J., Brunner H.R., Hayoz D. Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998, 18:686-692.

Annexes

Annexe 1

A. Composition du tampon HBSS :

Hank's Balanced Salts Solution : HBSS		
Composants	Concentration (g/L)	Fonction
Chlorure de potassium	0,4	Constitution isotonique du milieu
Phosphate de potassium	0,6	
Chlorure de sodium	8,0	
Phosphate de sodium	0,048	
D-Glucose	1,0	Source de carbone
Rouge de phénol	0,011	Indicateur coloré
Bicarbonate de sodium (Sigma, France)	0,35	pH

B. Composition du milieu de culture des cellules endothéliales à 20% et 10% de sérum humain AB :

Milieu de culture des cellules endothéliales		
Composants	Quantité	Fonction
Milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol (Sigma, France)	40 % ou 45%	Source d'acides aminés, de sels inorganiques, de vitamines
Milieu M199 sans rouge de phénol (Gibco, France)	40 % ou 45%	
Sérum humain AB décomplémenté (Etablissement français du sang, Nancy)	20 % ou 10%	Source de facteurs de croissance
Fungizone® (Gibco, France)	2,5 µg/mL	Antifongique
Pénicilline Streptomycine (Gibco, France)	50 UI/mL 50 µg/mL	Bactériolytique
L-Glutamine (Gibco, France)	2 mM	Acide aminé
HEPES (Sigma, France)	40 mM	Tampon

C. Composition du PBS sans calcium ni magnésium pH 7,2 :

NaCl anhydre (Prolabo, France) : 8 g

KCl anhydre (Merck, France) : 0,2 g

Na_2HPO_4, $7H_2O$ (Sigma, France) : 2,68 g

KH_2PO_4 anhydre (Prolabo, France) : 0,19 g

H_2O distillée : 1 L

Annexe 2

A. Protocole du dosage d'H_2O_2 par le kit *Amplex® Red hydrogen peroxide assay* (Invitrogen, France) :

Réactifs	**Volume (µL)**
Echantillon à doser ou eau ultra-pure ou milieu	50
Ample®x Red à 10 mM	50
HRP	50
Lire la DO à 570 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité	

B. Protocole de dosage du lactate. La DO_1 sert de blanc et sera ultérieurement retranchée à la DO_2 pour calculer l'absorbance finale de l'échantillon :

Réactifs	**Concentrations finales**
Tampon de réaction	6,24 µg/µL
NAD+	2,9 µg/µL
GPT	0,15 U/µL
Echantillon à doser/eau ultra-pure/milieu	(100 µL)
Eau ultra-pure	(qsp 1160 µL)
Lire la DO_1 à 340 nm = DO du blanc	
L-LDH	63,33 U/µL
Lire la DO_2 à 340 nm après 30 min d'incubation à 37°C	

C. Protocole du dosage des nitrites par le réactif de *Griess* (Molecular Probes®, Invitrogen, France) :

Réactifs	**Volume (µL)**
Echantillon ou milieu ou eau ultra-pure	150
eau ultra-pure	130
réactif de *Griess*	20
Lire la DO à 570 nm après 30 min d'incubation à 570 nm	

D. Protocole du dosage des nitrates par la nitrate réductase/réactif de *Griess* (Total NO/Nitrite/Nitrate, R&D systems, France) :

Réactifs	**Volume (µL)**
Echantillon ou milieu ou eau ultra-pure	50
NADH	25
Nitrate réductase	25
Incubation 30 min à 37°C	
réactif de *Griess*	100
Lire la DO à 570 nm après 10 min d'incubation à température ambiante à 570 nm	

Annexe 3

A. Réalisation de la *reverse transcription* (RT) :

Préparation de la réaction de la RT		Programme de RT
- Eau sans nucléase	qsp 20 µL	25°C/5 min
- ARN	qsp 1 µg	42°C/30 min
- 5X Transcript reaction Mix	4 µL	85°C/5 min
- Reverse transcriptase	1 µL	

B. Test des amorces :

Séquences des amorces sens et antisens sélectionnées pour la PCR quantitative :

gènes	Amorces sens 5'-3'	Amorces antisens 5'-3'	Tm en°C	Taille de l'amplicon
RPS 29	AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTG TAC TG	AGA CAC GAC AAG AGC GAG AA	60	150
ICAM-1	CAA GGC CTC AGT CAG TGT GA	CCT CTG GCT TCG TCA GAA TC	60	143
E-sélectine	AGC TTC CCA TGG AAC ACA AC	CTG GGC TCC CAT TAG TTC AA	60	66
eNOS	GAT GCT CCC AAC TTG ACC TTG ACC AT	TAG GTC TTG GGG TTG TCA GG	60	115
HO-1	GAA AAG CAC ATC CAG GCA AT	GCT GCC ACA TTA GGG TGT CT	60	142

Réalisation de qPCR :

Mélange réactionnel de la qPCR	Programme amorce 58°C ou 60°C
- 5 µL d'ADNc dilué au 1/50ème ou eau (blanc) ou RT^{-} (témoin négatif de reverse transcription) - 12,5 µL de Mix SYBR Green 2X - 0,75 µL d' amorces sens et antisens à 10 µM - 6 µL d'eau distillée filtrée autoclavée Chaque échantillon est testé deux fois	- 3 min à 95°C - 1 min à 58°C ou 60°C - 10 s à 95°C } 50 cycles - 1 min à 95°C - 1 min à 55°C Courbe de fusion ou *melting curve* de 55 à 95°C

C. Efficacité de PCR des amorces des différents gènes étudiés :

Gène	Efficacité de PCR en %
RPS 29	103
ICAM-1	117
E-sélectine	109
eNOS	106
HO-1	115

Annexe 4

Composition en billes de calibration du Qifikit (Dako, France) :

Population de billes	Nombre d'anticorps monoclonaux fixés
A	4000
B	17 000
C	59 000
D	200 000
E	490 000

Publication

Hemoglobin shearing EC induces oxidative stress, vasomotion and inflammation

Caroline Gaucher-Di Stasio[a], Estelle Paternotte[a], Christine Prin-Mathieu[c], Brandon J. Reeder[d], Gaël Poitevin[b], Pierre Labrude[a], Jean-François Stoltz[a], Chris E. Copper[d], Patrick Menu[a].

[a]Groupe Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR 7563 IFR 111, Faculté de médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[b]Unité mixte UHP-INSERM U684, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[c]Laboratoire d'immunologie, Faculté de Médecine - CHU Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[d] Department of Biological Sciences, University of Essex, Wivenhoe Park, Colchester, Essex CO4 3SQ, UK.

* Corresponding author: Pr Patrick MENU Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR 7563 IFR 111, Faculté de médecine, Avenue de la Forêt de Haye, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel: +33 3 83 68 34 60. Fax: +33 3 83 68 34 59; E-mail address: patrick.menu@medecine.uhp-nancy.fr.

Abstract:

The lack of blood donations and the emerging threat of infections from blood and blood products had led to develop blood substitutes. The more recent hemoglobin based oxygen carrier (HBOC) has been shown to induce side effects like hypertension due to vasoconstriction, inflammation and oxidative stress. Theoretically, HBOC are able to restore volemia and transport oxygen after a hemorrhagic shock. The reperfusion leads to the restoration of the blood flow in vessels. We propose an innovative approach, closer to clinical situations, to assess in vitro HBOC impact on endothelial cells (EC) like oxidative stress, vasoactive factors production and inflammation reactions. EC were cultivated under a laminar flow to reproduce the return of shear stress (SS) during the reperfusion. The oxidative stress was assessed monitoring the variation of metHb concentration, heme oxidatively modified (OxHm) and the transcriptional variation of heme oxygenase I (HO-1). We showed that HO-1 transcription was induced by (OxHm) instead of metHb. Vasoactive factors like total NO variation and eNOS transcription seemed to be inversely correlated. E-selectin investigation was more sensitive than ICAM-1 one. The main results obtained show how it is essential to take into account the restoration of SS to understand side effects of HBOC injection.

Key words: Endothelial cells; blood substitutes; shear stress; oxidative stress; vasomotion; inflammation

Introduction

Blood from donors is a limited resource and its transfusion is associated with significant adverse effects; hence there is great interest in blood substitutes and oxygen carrying compounds. Different categories of blood substitutes are available today, like plasma expanders, Perfluorocarbon emulsions (PFC) and Hemoglobin-Based Oxygen Carriers (HBOC). Various chemically modified HBOC obtained from natural sources or using recombinant technology are currently under clinical investigations. Chemical modifications including polymerization, cross-linking, conjugation with macromolecules (polyethylene glycol (PEG) or dextran), and encapsulation into phospholipids vesicles were undergone to increase hemoglobin (Hb) vascular half-life and oxygen release properties [1]. Although, blood substitutes have been extensively studied, side reactions still persist [2].

When injected in the blood stream, the HBOC are in direct contact with endothelial cells (EC). Despite the poor information available in the literature on in vitro interactions of Hb solutions with EC, oxidative stress, vasoactive factors regulation and inflammation have been underlined [3]. The oxidative stress is essentially induced by Hb autooxidation into metHb in the presence of oxygen leading to the formation of reactive oxygen species (ROS) like hydrogen peroxide [4, 5]. ROS generated by autooxidation can lead to oxidative reactions, including ferrylHb formation. FerrylHb and MetHb are cytotoxic and cannot transport O_2 anymore [4]. Because autooxidation can occur naturally in the blood when Hb leaks out of the red blood cells, EC contain a protective system of detoxification [6]. Part of this system includes heme oxygenase (HO). Furthermore, one of the major consequences of increased vascular ROS production is a reduction of endothelial nitric oxide (NO) bioavailability [7]. The reduction of NO bioavailability is implied in the vasoconstriction observed in vivo after the administration of HBOC [8-10]. Indeed, Hb is known to scavenge NO, decreasing its bioavailability for smooth muscle cells [11]. Both NO synthesis and eNOS

transcriptional regulation are interesting to investigate because an increase in eNOS transcription could counter NO depletion in the circulation. Finally, HBOC are able to induce inflammation due to their exogenous origin. The endothelium is implied in leukocytes diapedesis by InterCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and E-selectin membrane expression. ICAM-1 has been extensively investigated to highlight the inflammatory effect of HBOC on EC [12-15] whereas E-selectin not. A study of both of them seems to be imperative because a change in the early (E-selectin) and later (ICAM-1) stages of diapedesis can transform the inflammatory response of EC faced with Hb.

However, vascular EC are constantly subjected to shear stress (SS) imposed by blood flow. The application of SS to EC activates a number of mechanosensors. This mechanosensing regulates the functional behavior of EC under healthy and disease conditions. Mechanosensing is implicated in the stimulation of genes containing a SS response element (SSRE) in their promoter like ICAM-1 [16], eNOS [17]. Reperfusion of an organism after a large hemorrhage restores SS. So, both the introduction of HBOC and the return of laminar flow onto EC can act in synergy to amplify or minimize phenomena observed during reperfusion.

In this study, we propose a novel method that closely represents physiological conditions, to assess the impact of blood substitutes on EC. We have tested two different HBOC, compared to a plasma expander, to approach oxidative stress, vasoactive factors regulation and inflammatory responses of EC. We demonstrated that SS is an essential parameter that influences the interaction of HBOC and EC. Our results and our novel strategy are a new way to drive blood substitutes or other pharmacological molecules screening in vitro to limit animals use during experimental studies.

Materials and methods

Blood substitutes

Two modified Hb solutions were studied (Table 1) and prepared as follows: Dex-BTC-Hb, obtained from Pasteur Mérieux Serums et Vaccins, is human Hb conjugated to dextran–benzene-tetracarboxylate macromolecules. The conjugation increases oxygen half-saturation pressure (P_{50}) and vascular half-life [18]. Oxyglobin® (Biopure Corporation, USA), provided by Dr. A. Alayash (Center for Biologics Evaluation, Food and Drug Administration, Bethesda, MD, USA), is a glutaraldehyde-polymerized bovine Hb.

These Hb solutions were diluted at 16 g/L in culture medium. This value corresponds to the plasmatic Hb concentration after a 1/5 volemic compensation of the total blood volume with a 80 g/L HBOC solution. This Hb concentration in the plasma simulates levels observed in clinical situations of hemodilution, such as cardiopulmonary bypass or resuscitation from hypovolemic shock. Controls were Voluven® 6% (w/v) (Fresenius Kabi, France) diluted at 1/5 in culture medium or culture medium alone. Voluven® is a 130 kDa hydroxyethyl starch (HES) exhibiting an oncotic pressure close to HBOC studied.

Cell culture and seeding

Human umbilical vein EC (HUVEC) were isolated from three different donors for each experiment according to the method of Jaffe and coworkers [19]. HUVEC were cultured at 37°C, 5% CO_2 in 25 cm^2 tissue-culture-treated flask in complete medium. This medium consisted of an equal mixture of M199 and RPMI1640 without phenol red, supplemented with 20% (v/v) pooled human serum, 2 mmol/L L-glutamin, 20 mmol/L HEPES, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 2.5 mg/mL Fungizon®. HUVEC, at the first culture passage, were seeded for 48 h, at 10 000 cells/cm^2 on glass slides coated with 1% gelatin (Sigma, France).

Flow system

We used a rectangle parallel flow chamber equipped with one silicone gasket 0.024 cm thickness (H) containing a rectangular opening of 1.8 cm width (w) and 3.2 cm length. Glass slides seeded with cells were assembled with parallel flow chambers by vacuum (about -450 mbar). A steady flow rate was generated by a peristaltic pump (Masterflex®, Cole Parmer, USA), and HUVEC were submitted to laminar SS for 6 h at 1 Pa at 37°C oxygenated at 5% CO_2.

Slides seeded with HUVEC placed in an incubator at 37°C with 5% CO_2 were used as static controls.

Measurement of metHb formation

MetHb levels before and after experiments were quantified spectrophotometrically between 450 and 700 nm using an algorithm to measure MetHb in the presence of OxyHb.

Measurement of nitrate formation

The sum of NO, nitrite and nitrate was quantified in cell supernatants using the commercially available Total NO/Nitrite/Nitrate kit (R&D systems, France). To eliminate protein interference with the assay, the cell culture supernatants were subjected to two ultrafiltrations with 50 KDa and 10 KDa microcon (Millipore, France). Concentrations in µM were expressed for 10^6 cells.

Quantitative Real-time PCR (qPCR)

Total RNA from HUVEC was extracted with a combination of the TRIzol® reagent (Invitrogen, France) for lysis and the RNeasy minikit (Qiagen, France). One microgram total

RNA was reverse transcribed into cDNA using iScript^{TM} cDNA Synthesis kit (Bio-rad, France) according to the manufacturer instructions.

qPCR was performed using the SYBR Green qPCR kit (Bio-rad, France) in the iCycler real-time PCR detection system (Bio-rad, France) according to the manufacturer instructions. RPS29 was used as an internal control to normalize gene interest amplification results. Gene expression analysis was performed using the gene expression analysis for iCycler® iQ Real-Time PCR Detection System 1.0 (Biorad, France).

Quantification of ICAM-1 and E-selectin sites on EC surface

EC were detached from glass slides with 0.05% trypsin/EDTA (Sigma, France). Cells were incubated 30 min at room temperature with 1/50 of monoclonal ICAM-1 or E-selectin antibody (Santa Cruz, France) and then with 1/50 of the secondary antibody (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes, France). Finally, cells were fixed with 300 µL of 1% paraformaldehyde for 10 min. Fluorescent intensities were measured with Cytomics FC500 (Beckman Coulter, France). The quantification of ICAM-1 and E-selectin number of sites was performed using the Dako Qifikit (Dako, France).

Quantification of oxidatively modified heme

Oxidatively modified heme (OxHm) was measured by HPLC as previously described [20]. Briefly, samples were filtered through a 0.22 µm filter and injected onto an Agilent HP1100 HPLC fitted with a Zorbax StableBond C3 column (250mm x 4.6mm, plus guard column 12.5mm x 4.6mm) and the optical spectrum monitored with a diode array spectrophotometer.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean ± standard errors of the mean (SEM) for each experiment (n = 3). One-factor ANOVA with PLSD Fisher correction (Statview IVs, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA) was used to analyze the data. p values ≤ 0.05 were considered as significant.

Results

Interrelation between SS, HBOC oxidation and HO-1 transcription

The levels of metHb (Table 2) in stock solutions were low (9 %) for both HBOC. After 6 h of incubation with HUVEC, the percentage of metHb was significantly raised but was equivalent (around 26%) between solutions whatever conditions.

To measure whether the autooxidation of HBOC induces an oxidative response from EC, we monitored the transcription of HO-1 (Fig. 1A). The application of SS on HUVEC enhanced the transcription of HO-1 as shown with culture medium. The introduction of Voluven® in the SS system seemed to minimize this HO-1 transcription induction. In the presence of both HBOC under static condition, HO-1 transcription is increased. The combination of Oxyglobin® with SS reduced the transcription of HO-1 whereas Dex-BTC-Hb and SS did not change significantly its relative expression level (REL) compared with static condition. Our results indicated no correlation between metHb percentage and HO-1 transcription. So, we investigated OxHm, which is naturally present in the blood and is not correlated with metHb content [20]. Hb, when introduced to ROS such as H_2O_2, will undergo redox cycling, inducing various radical and radical like species. Oxidative damage to the heme moiety breaks the conjugation in one of the pyroll rings, changing it from a b-type to a d-type chlorine heme. Thus the formation of OxHm is a marker for the production of radical species through ferric-ferryl Hb redox cycling and hence can report on the oxidative

environment of its milieu. As in the transcription of HO-1 with Oxyglobin® and Dex-BTC-Hb (Fig. 1A), the quantity of OxHm (Fig. 1B) was lower under dynamic than static conditions. For Dex-BTC-Hb, the diminution of HO-1 transcription was not significant, but the diminution of OxHm was less important too. So, in our culture system, Hb containing OxHm was more able to induce HO-1 transcription than metHb.

Interrelation between SS, HBOC and vasoactive factors

To investigate the effects of HBOC on vasoconstriction, we focused on nitrate production and eNOS transcription. NO in solution is quickly transformed into nitrite and nitrite into nitrate by Hb [21]. EC did not produce nitrate when cultivated with medium both under static or dynamic conditions (Fig. 2A). The presence of Voluven® enhanced the quantity of nitrate in both conditions compared with the medium alone. However, SS coupled with Voluven® decreased nitrate concentration compared with the static control. This phenomenon is quite strange because HES is not able to turn nitrite into nitrate. The incubation of HUVEC with both HBOC presented the same profile in terms of nitrate production. Indeed, cells seemed to produce more nitrate under static condition in presence of HBOC than with medium. The SS coupled with HBOC showed a large increase of nitrate concentration. Indeed, SS is known to enhance the production of the relaxation factor NO [22]. eNOS transcription and/or mRNA stabilization are induced by SS (medium condition) (Fig. 2B). The introduction of Voluven® in the system cancelled the difference between static and dynamic culture. When Dex-BTC-Hb was present, the amount of eNOS transcripts was increased under static condition compared with the same culture with medium. But no change was observed when SS and Dex-BTC-Hb were applied onto cells. With Oxyglobin®, the amount of eNOS transcripts was higher under static than under dynamic condition. It seems that SS was able to offset the inducer power of Oxyglobin® in static condition. Finally, the

main information following these two experiments was an inverse correlation between nitrate production and eNOS transcription.

Interrelation between SS, HBOC and inflammation

The inflammation induced on EC by SS and HBOC, was investigated with the transcription and membrane expression of E-selectin and ICAM-1. E-selectin transcription and expression onto the plasma membrane increased (15 and 1.7 times respectively) under SS (medium) (Fig. 3A). Voluven® amplified the reaction of EC for E-selectin transcription (103 times vs static). However, it did not change E-selectin membrane expression (dynamic versus static) (Fig. 3B). Both HBOC showed a E-selectin transcriptional profile totally different. Indeed, the presence of Dex-BTC-Hb with EC cultivated under SS seemed to inhibit the transcription of E-selectin (11.5 times) compared with static condition (Fig. 3A), whereas no change was observed concerning the pattern of E-selectin membrane expression (Fig. 3B). Oxyglobin® and SS induced a huge increase of E-selectin transcription level (9 times) (Fig. 3A) and a small increase of its number of sites on the plasma membrane (1.4 times) (Fig. 3B).

The transcription and membrane expression of ICAM-1 were induced by SS (medium) (Fig. 4A and B) [23-26]. Voluven® did not change ICAM-1 mRNA REL (static versus dynamic) compared with medium (Fig. 4A) whereas it cancelled the induction of ICAM-1 membrane expression observed with medium (Fig. 4B). The perfusion of HBOC with EC showed the same profile as Voluven® for ICAM-1 membrane expression. ICAM-1 transcription was increased under static condition with Dex-BTC-Hb and Oxyglobin® compared with Voluven®. However, under dynamic culture, none of HBOC induced a transcription variation of ICAM-1 compared with static conditions (Fig. 4A). ICAM-1 seemed less sensitive to our culture system and blood substitutes tested than E-selectin.

Discussion

In this study, we compared the oxidative stress, vasoactive factors production and inflammation induced by the combination of SS and HBOC on EC.

The oxidative stress induced by the combination of HBOC and SS on EC was highlighted using three techniques. Firstly, we quantified the metHb levels with or without shearing. In the stock solution, we measured less than 10% of metHb, which is under the limit of free metHb tolerated in the bloodstream by the human body [27]. After 6 h and whatever are the culture conditions, the percentage of metHb increased until around 26% meaning that under 5% CO_2, Hb autooxidized and SS did not amplify this phenomenon. This fairly strong increase could be associated with an absence of antioxidant system in our experiments.

HO-1 transcription was not correlated with metHb concentration. qPCR analysis showed that Voluven® was able to limit the SS impact on HO-1 transcription by EC. Voluven® is a HES known to decrease oxidative stress [28]. HO-1 contains an antioxidant response element in its promoter [29]. So, Voluven® decreased HO-1 transcription by decreasing the oxidative stress induced by SS [29]. The introduction of HBOC in contact with EC increased HO-1 transcription, which was due to the hemoprotein presence. However, under SS the transcription of HO-1 decreased significantly when Oxyglobin® was used and a little for Dex-BTC-Hb. These results are independent of metHb levels but correlated with the quantity of OxHm. Indeed, under SS, the percentage of OxHm decreased for both HBOC. The OxHm formation is a new way to better understand oxidative stress when HBOC are injected in the bloodstream. Indeed, the restoration of SS will induce HO-1 transcription that will finally break down OxHm to detoxify blood.

The study of vasoactive factors like eNOS transcription and nitrate production showed an inverse correlation with the different blood substitutes studied. So either NO do a negative feedback on eNOS transcription or it is produce by another NOS. Recently, a mitochondrial

NOS (mtNOS) has been described [30]. It is able to produce more NO than eNOS does [31]. We can also hypothesize a role for iNOS in NO production because iNOS produces much more NO than eNOS and is known to be implied in the increase of NO production by EC submitted to SS [32]. Indeed, under SS, Voluven® reduced nitrate production compared with static conditions. HES are known to decrease an inflammation already engaged [33] as done by SS. However, eNOS transcription was reduced by Voluven® and Dex-BTC-Hb under SS compared with SS alone. Voluven® and Dex-BTC-Hb seemed to be able to cancel the activation of eNOS SSRE induced by SS. So, the regulation of NO production is complex and probably due, in our system, to a combination of eNOS and iNOS regulation. Furthermore, the profile of eNOS REL was particular for Oxyglobin®. Indeed, the application of SS on HUVEC incubated with Oxyglobin® seemed to reduce the upregulation of eNOS transcription induced by Oxyglobin® alone. These results are contradictory but show how studying HBOC impact on EC submitted to SS is important.

The last observation on NO production in our system concerned the Hb scavenging capacity for NO. Indeed, since 1986, it has been hypothesized that the vasoconstriction occurring after HBOC injection in an animal was due to NO scavenging by Hb. Conversely, in our study nor Dex-BTC-Hb either Oxyglobin® seemed to scavenge NO because nitrate levels increase. Our findings seemed to confirm a more recent hypothesis demonstrating that vasoconstriction was due to Hb size (modification) and oxygen affinity [10].

Finally, we would like to highlight whether if the participation of ICAM-1 and E-selectin in the response to SS and/or HBOC presence was equivalent.

E-selectin mediates the adhesion of neutrophils on activated endothelium [34]. More precisely, it is implicated into the rolling phase of neutrophils in vitro under physiological SS [35]. We observed an induction of E-selectin mRNA transcription by SS, phenomenon also described by Punchard and coworkers [36]. Voluven® combined with SS seemed to

imbalance the inflammation induced by SS for E-selectin membrane expression. Lang et al. demonstrated that HES reduced the inflammatory response in patients undergoing major surgery compared to a crystalloid-based volume therapy [37]. So, they hypothesized that this will be most likely due to an improved microcirculation with reduced endothelial activation and less endothelial damage. Furthermore, Küpper and coworkers demonstrated a diminution of leukocytes adhesion in rat treated with lipopolysaccharide after administration of hydroxyethyl starch 6% [38]. Moreover, Nishiwaki and collaborators demonstrated that E-selectin inhibition inhibited leukocytes adhesion on EC [39]. Our results precise that E-selectin is implied. So, in addition to volemia restoration, Voluven® is endowed with a great anti-inflammatory power.

Finally, we observed a higher induction of ICAM-1 transcription after incubation with Dex-BTC-Hb than with Oxyglobin®, either in static or dynamic conditions. However, after 6 h of SS applied on HUVEC in presence of blood substitutes, we mainly observed E-selectin transcription variation whereas neither ICAM-1 transcription nor membrane expression varied. The major fact to discuss in these results is the reaction of HUVEC cultivated under SS with Dex-BTC-Hb. Indeed, the transcription level of E-selectin felt down compared to the same culture under static conditions. Dextran is known to inhibit leukocytes adhesion on EC under SS constraints [40]. So the coupling of this polysaccharide on the Hb could inhibit the transcription of E-selectin, which could allow diminishing leukocytes adhesion on EC surface. Indeed, Nishiwaki and collaborators demonstrated that E-selectin gene silencing inhibited leukocytes adhesion on EC [39]. Finally, Oxyglobin® will be endowed of a greater inflammatory power than Dex-BTC-Hb. Indeed, we can anticipate an increase of E-selectin membrane expression after several hours of perfusion with Oxyglobin®, which could announce a greater leukocytes adhesion on EC. So for longer experiments, we could

hypothesize that the utilization of Dex-BTC-Hb would be better to minimize EC inflammation reaction induced by SS, which could be extrapolated to reperfusion.

We opened a new way to predict the potential oxidative stress applied on EC by the injection of HBOC in the circulation through determining the quantity of OxHm in solutions. We hypothesized that NO synthesis by EC submitted to SS and HBOC was due either by eNOS and iNOS submitted to a complex regulation. Furthermore, we demonstrated that none of the two HBOC studied here scavenge NO corroborating Tsaï and coworkers concerning the vasoconstriction reasons [11]. We demonstrated that SS can influence inflammation response of EC in contact with different blood substitutes. It seemed that E-selectin was more implicated in the inflammatory response induced by HBOC on EC than ICAM-1.

Conclusion

The study of HBOC impact on EC cultivated under SS brought supplementary information, which is closer to the physiological response cells when HBOC are injected in the bloodstream. With this new model and data, a novel area to study, in vitro, pharmaceutics to be injected in the bloodstream has been opened. Indeed, we imagine that this laminar SS system will be also applicable to assess the interaction of blood substitutes with EC and blood itself as the fluid applying SS.

Acknowledgments

We thank the EuroBloodSubstitutes project for supporting this work.

Abbreviations

Dex-BTC-Hb: Dextran-Benzen tetracarboxylate-hemoglobin

EC: Endothelial cells

eNOS/iNOS: endothelial/inducible NO synthase

Hb: Hemoglobin

HBOC: Hemoglobin Oxygen Carriers

HES: Hydroxy ethyl starch

HO-1: Heme oxygenase-1

ICAM-1: Intercellular adhesion molecule

MetHb: met hemoglobin

NO: Nitric oxide

OxHm: Oxydatively modified heme

PEG: Polyethylene glycol

PFC: Perfluorocarbon

REL: Relative expression level

ROS: Reactive oxygen species

SS: Shear stress

SSRE: Shear stress response element

References

[1] Inayat MS, Bernard AC, Gallicchio VS, Garvy BA, Elford HL, Oakley OR. Oxygen carriers: A selected review. *Transfus Apher Sci*. **34**:25-32; 2006.

[2] Alayash AI, D'Agnillo F, Buehler PW. First-generation blood substitutes: What have we learned? Biochemical and physiological perspectives. *Expert Opin Biol Ther*. **7**:665-675; 2007.

[3] Guidance for industry, criteria for safety and efficacity evaluation of oxygen therapeutics as red blood cells substitutes. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. October 2004. http://www.fda.gov/cber/gdlns/oxytherbld.htm

[4] Giulivi C and Cadenas E. Heme protein radicals: Formation, fate, and biological consequences. *Free Radic Biol Med*. **24**:269-279; 1998.

[5] Goldman DW, Breyer RJ 3rd, Yeh D, Brockner-Ryan BA, Alayash AI. Acellular hemoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium: A role for ferryl iron. *Am J Physiol*. **275**:H1046-1053; 1998.

[6] Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology letters*. **157**:175-188; 2005.

[7] Landmesser U. Harrison D. G. Drexler H. Oxidant stress—a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *Eur J Clin Pharmacol*. **62**:13–19; 2006.

[8] Cabrales P, Tsai AG, Frangos JA, Intaglietta M. Role of endothelial nitric oxide in microvascular oxygen delivery and consumption. *Free Radic Biol Med*. **39**:1229-1237; 2005.

[9] Fitzpatrick CM, Savage SA, Kerby JD, Clouse WD, Kashyap VS. Resuscitation with a blood substitute causes vasoconstriction without nitric oxide scavenging in a model of arterial hemorrhage. *J Am Coll Surg*. **199**:693-701; 2004.

[10] Tsai AG, Cabrales P, Manjula BN, Acharya SA, Winslow RM, Intaglietta M. Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. *Blood*. **108**:3603-3610; 2006.

[11] Sampei K, Ulatowski JA, Asano Y, Kwansa H, Bucci E, Koehler RC. Role of nitric oxide scavenging in vascular response to cell-free hemoglobin transfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **289**:H1191-1201; 2005.

[12] Cheng AM, Moore EE, Johnson JL, Walsh MD, Ao L, Moore PK, Banerjee A. Polymerized hemoglobin induces heme oxygenase-1 protein expression and inhibits intercellular adhesion molecule-1 protein expression in human lung microvascular endothelial cells. *J Am Coll Surg*. **201**:579-584; 2005.

[13] Toussaint-Hacquard M, Devaux Y, Longrois D, Faivre-Fiorina B, Muller S, Stoltz J.F, Vigneron C, Menu P. Biological response of human aortic endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions developed as potential blood substitutes. *Life sciences.* **72**:1143-1157; 2003.

[14] Wagener, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. **216**:456-463; 1997.

[15] Wagener FA, da Silva JL, Farley T, de Witte T, Kappas A, Abraham NG. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther*. **291**:416-423; 1999.

[16] Degitz K, Li LJ, Caughman SW. Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *J Biol Chem*. **266**:14024-14030; 1991.

[17] Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. **291**:C803-816; 2006.

[18] Jia Y, Wood F, Menu P, Faivre B, Caron A, Alayash AI. Oxygen binding and oxidation reactions of human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran. *Biochim Biophys Acta*. **1672**:164-173; 2004.

[19] Jaffe A.E., Nachman R.L., Becker C.G. and Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* **52**:2745–2756; 1973.

[20] Vollaard NB, Reeder BJ, Shearman JP, Menu P, Wilson MT, Cooper CE. A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo. *Free Radic Biol Med*. **39**:1216-28; 2005.

[21] Keszler A, Piknova B, Schechter AN, Hogg N. The reaction between nitrite and oxyhemoglobin: A mechanistic study. *J Biol Chem*. *J Biol Chem*. **283**:9615-22; 2008.

[22] Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res*. **76**:536-543; 1997.

[23] Gaucher C, Devaux C, Boura C, Lacolley P, Stoltz JF, Menu P. In vitro impact of physiological SS on endothelial cells gene expression profile. *Clin Hemorheol Microcirc*. **37**:99-107; 2007.

[24] Morigi M, Zoja C, Figliuzzi M, Foppolo M, Micheletti G, Bontempelli M, Saronni M, Remuzzi G, Remuzzi A. Fluid SS modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood*. **85**:1696-703; 1995.

[25] Sampath R, Kukielka GL, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV. SS-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng*. **23**:247-256; 1995.

[26] Wasserman SM, Mehraban F, Komuves LG, Yang RB, Tomlinson JE, Zhang Y, Spriggs F, Topper JN. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid SS. *Physiol Genomics*. **12**:13-23; 2002.

[27] Kinoshita A, Nakayama Y, Kitayama T, Tomita M. Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. *FEBS J*. **274**:1449-1458; 2007.

[28] Tsai MC, Chen WJ, Ching CH, Chuang JI. Resuscitation with hydroxyethyl starch solution prevents nuclear factor kappaB activation and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *Shock*. **27**:527-533; 2007.

[29] Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, Wasserman MA, Medford RM, Jaiswal AK, Kunsch C. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem*. **278**:703-711; 2003.

[30] Dedkova EN, Ji X, Lipsius SL, Blatter LA. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. **286**:406-415; 2004.

[31] Brookes PS. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion*. **3**:187-204; 2004.

[32] Ozawa N, Shichiri M, Iwashina M, Fukai N, Yoshimoto T, Hirata Y. Laminar SS up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium. *Hypertens Res*. **27**:93-99; 2004.

[33] Lv R, Zhou ZQ, Wu HW, Jin Y, Zhou W, Xu JG. Hydroxyethyl starch exhibits antiinflammatory effects in the intestines of endotoxemic rats. *Anesth Analg*. **103**:149-155; 2006.

[34] Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*. **84**:9238-9242; 1987.

[35] Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest*. **92**:2719-2730; 1993.

[36] Punchard MA, Stenson-Cox C, O'cearbhaill ED, Lyons E, Gundy S, Murphy L, Pandit A, McHugh PE, Barron V. Endothelial cell response to biomechanical forces under simulated vascular loading conditions. *J Biomech*. **40**:3146-3154; 2007.

[37] Lang K, Suttner S, Boldt J, Kumle B, Nagel D. Volume replacement with HES 130/0.4 may reduce the inflammatory response in patients undergoing major abdominal surgery. *Can J Anaesth*. **50**:1009-1016; 2003.

[38] Küpper S, Mees ST, Gassmann P, Brodde MF, Kehrel B, Haier J. Hydroxyethyl starch normalizes platelet and leukocyte adhesion within pulmonary microcirculation during lps-induced endotoxemia. *Shock*. **28**:300-308; 2007.

[39] Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, Miyagishi M, Taira K, Isobe M, Mizusawa H, Yoshida M. Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. **310**:1062-1066; 2003.

[40] Ley K, Lundgren E, Berger E, Arfors KE. Shear-dependent inhibition of granulocyte adhesion to cultured endothelium by dextran sulfate. *Blood*. **73**:1324-30; 1989.

Figure legends:

Figure 1. HBOC, SS and oxidative stress

A. HO-1 mRNA REL in HUVEC cultivated under static (grey) or dynamic (black) 6 h, 1 Pa conditions with Voluven®, Dex-BTC-Hb, Oxyglobin® or medium. B. Oxidatively modified heme (OxHm) measured as a percentage of overall heme concentration by reverse-phase HPLC. Error bars represent the SEM. n=3, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ versus static; ### $p \leq 0.001$ versus static Voluven®; ++ $p \leq 0.01$ versus static Dex-BTC-Hb; $$$ $p \leq 0.001$ versus dynamic Voluven®; § $p \leq 0.05$ versus dynamic Dex-BTC-Hb.

Figure 2. HBOC, SS and vasoconstrictive factors

A. Nitrate levels in supernatant of EC cultivated under static (grey) or dynamic (black) 6h, 1 Pa conditions with Voluven®, Dex-BTC-Hb, Oxyglobin® or medium. B. eNOS mRNA REL in HUVEC cultivated under the same condition as A. Calculation were made using the gene expression analysis for iCycler® iQ Real-Time PCR Detection System 1.0 (Biorad, France). Error bars represent the SEM. n=3, * $p \leq 0.05$ versus static; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ versus dynamic medium; ££ $p \leq 0.05$, £££ $p \leq 0.01$ versus static medium; $$ $p \leq 0.01$, $$$ $p \leq 0.001$ versus dynamic Voluven®; +++ $p \leq 0.001$ versus static Dex-BTC-Hb.

Figure 3. HBOC, SS and E-selectin profil

A. E-selectin mRNA REL in HUVEC cultivated under static (grey) or dynamic (black) 6 h, 1 Pa conditions with Voluven®, Dex-BTC-Hb, Oxyglobin® or medium. B. E-selectin number of sites using flow cytometry analyses (Cytomics FC500, Beckman Coulter, France) and a Qifikit (Dako, France) on HUVEC cultivated in the same conditions as A. Results expressed as the mean ± SEM. n=3, *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ versus static; # $p \leq 0.05$ versus dynamic medium; $ $p \leq 0.05$ dynamic Oxyglobin® versus dynamic Dex-BTC-Hb..

Figure 4. HBOC, SS and ICAM-1 profile

A. ICAM-1 mRNA REL in HUVEC cultivated under static (grey) or dynamic (black) 6 h, 1 Pa conditions with Voluven®, Dex-BTC-Hb, Oxyglobin® or medium. B. Quantification of ICAM-1 number of sites using flow cytometry analyses (Cytomics FC500, Beckman Coulter, France) and a Qifikit (Dako, France) on HUVEC cultivated in the same conditions as A. Error bars represent the SEM. n=3, *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$ dynamic versus static; # $p \leq 0.05$ dynamic Oxyglobin® versus dynamic Dex-BTC-Hb.

Clinical Hemorheology and Microcirculation 37 (2007) 99–107
IOS Press

In vitro impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile

C. Gaucher [a,*], C. Devaux [b], C. Boura [a], P. Lacolley [b], J.-F. Stoltz [a] and P. Menu [a]
[a] *Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR 7563 IFR 111, Faculté de médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[b] *Unité mixte UHP-INSERM U684 Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

Abstract. In the vascular system, the shear applied to the vascular wall activates mechano-sensors located on endothelial cells (ECs) leading to a modification in the gene expression profile. We applied laminar shear stress at 1 Pa on ECs for 6 h and measured by quantitative real time PCR the expression modulation of genes implied in inflammation (ICAM-1 and E-selectin), oxidative stress sensing (HO-1) and vascular tone modulation (eNOS). We showed that all these genes are shear stress inducible. ICAM-1 is more up-regulated than E-selectin suggesting different levels of implication in inflammatory responses and different modes of induction (SSRE, cytokine). Laminar shear stress induces an oxidative stress translated into HO-1 up-regulation, and a possible vasodilatation through the induction of eNOS. Our laminar shear stress system opens a novel and interesting frame in the evaluation of the impact on ECs and blood cells of new pharmacological substances injected in the bloodstream.

Keywords: Laminar shear stress, inflammation, oxidative stress, vasomotion, endothelial cells

1. Introduction

Vascular endothelial cells (ECs) are constantly subjected to shear stress imposed by blood flow. ECs perform many important functions such as cellular migration, proliferation and vascular wall remodelling, the production, secretion and metabolism of biochemical substances and the modulation of contractility of vascular smooth muscle cells (SMCs), as well as serving as a permeability barrier. In addition to their modulations by chemical ligands, ECs and SMCs respond to mechanical factors such as shear stress and stretch, and these responses play a significant role in regulating vascular functions.

If the biological effects of mechanical forces applied to the vascular wall are now relatively well described [3,18,19], mechanisms explaining the transduction from a mechanical stimulus to a physiological response (secretion, receptor expression, gene activation) remain difficult to understand.

The application of shear stress to ECs activates a number of mechano-sensors. The mechanosensing, mediated by shear, regulates the functional behaviour of ECs in health and disease. It modulates the expression of a number of genes namely those concerning the proliferation or growth arrest [11] and atheroprotection [20]. It is implicated in the stimulation of genes containing a shear stress response element (SSRE) in their promoter. Inflammatory genes like the InterCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) contain a SSRE [5] whereas E-selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)

*Corresponding author: Caroline Gaucher, Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR 7563 IFR 111, Faculté de médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 34 67; Fax: +33 3 83 68 34 59; E-mail: caroline.gaucher@medecine.uhp-nancy.fr.

1386-0291/07/$17.00 © 2007 – IOS Press and the authors. All rights reserved

do not [15,27]. Gene implied in vasoconstriction modulation like the endothelial NO synthase (eNOS) contains also a SSRE [16], whereas the heme oxygenase I (HO-1) implied in the catabolism of heme into biliverdin, CO, and iron does not.

Many flow systems to approach physiological interactions between ECs and the blood flow (oscillatory, laminar, pulsatile flow) have been developed during last years [2,21,29]. We adapted a system to study the impact of laminar flow on ECs via the observation of the expression variation of inflammatory, oxidative sensor and vasomotive genes. This system reproducing a laminar flow has been validated with a mathematical simulation and cytoskeleton rearrangement in ECs [13].

Finally, this work proposes to combine a physiological laminar shear stress (1 Pa) and the description of its impact on the genes profile expression of HUVECs. We screened genes implied in various phenomena: inflammation (ICAM-1 and E-selectin), vasomotion (endothelial NO Synthase: eNOS) and oxidative stress sensing (Heme Oxygenase-1: HO-1).

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and seeding

Human Umbilical Vein ECs (HUVECs) were isolated from three different donors for each experiment according to the method of Jaffe and coworkers [8]. HUVECs were cultured at 37°C in 5% CO_2 in 25 cm^2 tissue-culture-treated flask in complete medium. This medium consisted of an equal mixture of medium M199 and medium RPMI1640, supplemented with 20% pooled human serum (provided by 8–12 different donors), 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2.5 mg/ml fungizon®. Before each experiment, slides and Petri dishes were decontaminated by UV irradiation during 15 min. HUVECs, at the first culture passage, were seeded for 48 h, at 10 000 cells/cm^2 on glass coated with 1% gelatin (Sigma, France). For shear stress experiments, a medium containing 10% human serum was used instead of 20%.

2.2. Flow system

We used a rectangle parallel flow chamber equipped with one silicone gasket 0.024 cm thickness (H) containing a rectangular opening of 1.8 cm width (w) and 3.2 cm length. Three glass slides coated with gelatin and seeded with cells were assembled with the parallel flow chamber by vacuum (about -450 mbar). Because of the large value of w/H (20 : 1), the down stream flow region can be calculated by the following formula: $\lambda = 6\mu Q/wH^2$ where μ is the dynamic viscosity of the media (0.8 mPa.s) which is measured by a coaxial cylinder viscometer (Low-Shear 30, Contraves, France) at 37°C.

A steady flow rate was generated by a peristaltic pump (Masterflex®, Cole Parmer, USA), and HUVECs were submitted to laminar shear stress for 6 h at 1 Pa with medium at 37°C oxygenated at 5% CO_2, 95% air (Fig. 1).

Two slides seeded with HUVECs were placed in an incubator at 37°C with 5% CO_2 and were used as a static control to show the impact of laminar shear stress on cells.

2.3. Morphological modification

Photography of HUVECs cultivated under static or dynamic conditions were taken using an inverted microscope (Phase contrast IMT2, Olympus, France; magnification $\times 20$) and the visilog (5.0) analyser.

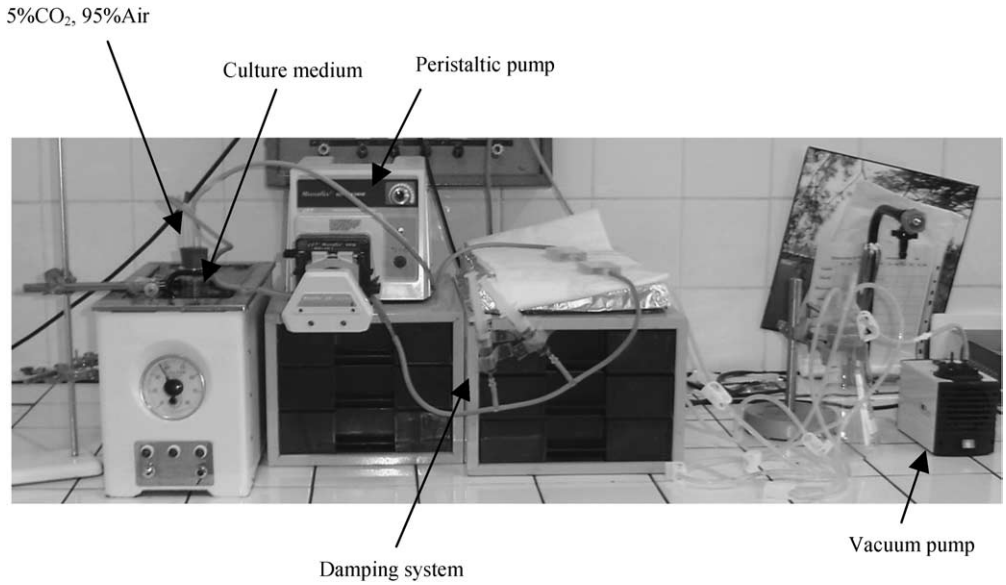


Fig. 1. Photography of the laminar flow apparatus.

2.4. Cytoskeleton rearrangement

Cytoskeleton rearrangement was visualized by immunofluorescence staining of actin fibers. Cells were stained before (control) and after dynamic cultivation for actin fibers with Phalloïdin Alexa® 488 (Molecular Probes, USA) and for nucleus with propidium iodide (PI) (Molecular Probes, USA). Briefly, cells were fixed in PAF 1% for 10 min, permeabilized with Triton 0.5% for 15 min. Afterwards, cells were incubated 45 min at 37°C with Phalloïdin Alexa® 488 diluted at 1/100 in Triton 0.5%. After washing, the nucleus was stained 30 min with PI at 1 μg/ml in RPMI1640 without phenol red. Immunostaining was observed by confocal microscopy (Leica, Germany) using 488 line with a 40× magnification and 1.25 numerical aperture.

2.5. RNA isolation and quantification

Total RNA from HUVECs cultivated under dynamic or static conditions were extracted using a technique which combines two methods widely used: the TRIzol® reagent (Invitrogen, France) technique and the RNeasy minikit (Qiagen, France). Briefly, cells were washed with cold sterile PBS and incubated 5 min with 1 ml of TRIzol® reagent allowing cell lysis. Cell lysate is then mixed with 200 μl of chloroform and centrifuged at 12 000g for 15 min. The upper phase containing RNA was transferred onto the column contained in the RNeasy mini kit. Next steps were performed according to the manufacturer instructions. This technique provided a sufficient quantity of highly pure RNA.

One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNA in a total volume of 20 μl using iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-rad, France) according to the manufacturer instructions.

2.6. Real-time quantitative PCR (qPCR)

Real-time quantitative PCR was performed on cDNA using the SYBR Green qPCR kit (Bio-rad, France) in the iCycler real-time PCR detection system (Bio-rad, France) according to the manufacturer

instructions. Briefly, 5 μl of cDNA were mixed with 12.50 μl of the 2X SYBR Green Mix and 300 nM of each primer in a final volume of 25 μl. RPS29 was used as an internal control to normalize gene interest amplification results.

Sample were firstly subjected 3 min to 95°C, then 50 cycles of 60°C for 1 min and 95°C for 10 s and finally, one cycle at 95°C for 1 min and one cycle at 55°C for 1 min.

Gene expression analysis was performed using the gene expression analysis for iCycler® iQ Real-Time PCR Detection System 1.0 (Biorad, France).

2.7. Statistical analysis

The results were expressed as a mean $\pm$ SEM for each gene ($n = 3$). One-factor ANOVA with PLSD Fisher correction (Statview IVs, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA) was used to analyze the data. p values $\leqslant 0.05$ were considered as significant.

3. Results and discussion

3.1. Morphological modification

HUVECs were exposed to laminar shear stress for 6 h at 1 Pa and then cell morphology was examined. The HUVECs monolayer cultivated on slides coated with gelatin under static conditions is shown in Fig. 2A. As expected, HUVECs culture is a pavement-like monolayer with continuous contact. The monolayer is 90% confluent. It is the ideal condition allowing cells rearrangement under flow conditions. We show that after shearing, most of the cells is still present on the slide coated with gelatin (Fig. 2B). Furthermore, HUVECs are aligned in the flow direction showing that cells are motive and sense the constraint model by the laminar shear stress. We succeed in developing a protocol allowing cells to be physiologically sheared and realigned in the flow direction.

3.2. Cytoskeleton rearrangement

Actin fibers were labelled in HUVECs cultured under static (as control) or dynamic conditions. We can observe on the static control (Fig. 3A) that actin fibers are not oriented and disposed on the cell periphery.

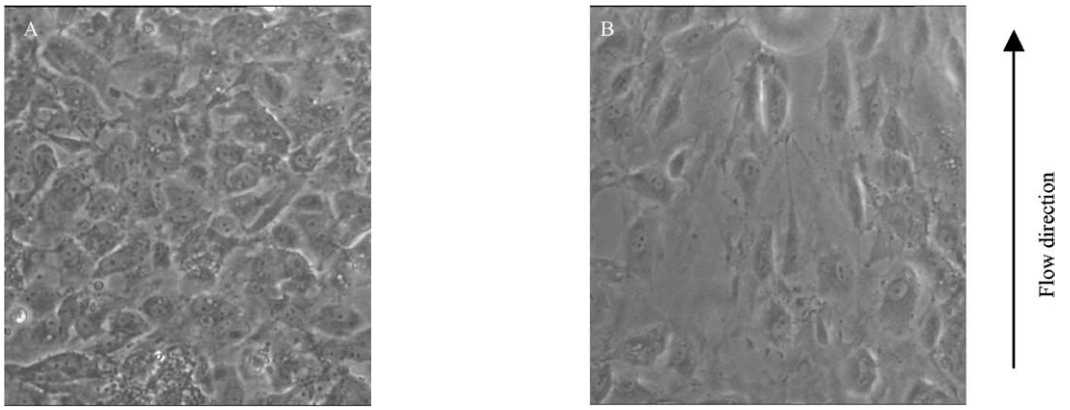


Fig. 2. Appearance of HUVECs cultured under static condition (A) or exposed to laminar shear stress (B) 6 h at 1 Pa. Picture taken by inverted microscopy (original magnification, $\times 20$).

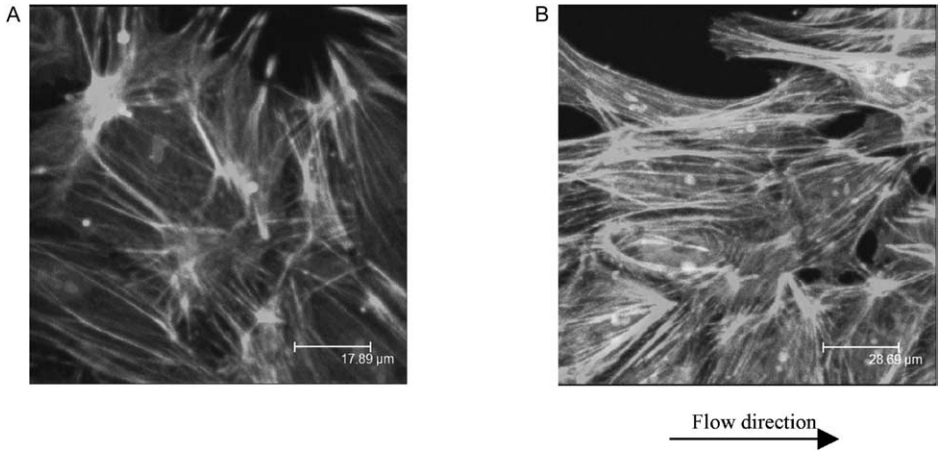


Fig. 3. Confocal microscopy observation of cells cultured under static (A) or dynamic (B) 6 h, 1 Pa conditions. Cytoskeleton actin fibers were labelled with phaloïdin Alexa® 488 and nuclei with propidium iodide (PI). (Objective 40×/NA 1.25, Leica, Germany).

After 6 h of 1 Pa laminar shear stress (Fig. 3B), actin fibers appear aligned in the direction of the flow. They cover the entire cells and are organized as a dense network. White and colleagues [28] showed that actin can be organized into stress fibers in vascular ECs *in situ*. Actin fibers were oriented parallel to the vessel axis and to the direction of blood flow. Our results suggested that conditions applied to ECs are enough to induce cell orientation and moreover, actin fibers alignment in the flow direction. We succeed in the development of a shearing system reproducing, *in vitro*, ECs physiological rearrangement in blood vessels.

3.3. Gene expression induction by shear stress

Quantitative RT-PCR analyses were performed before and after dynamic culture. The relative expression level (REL) of genes implicated in inflammatory response such as ICAM-1 and E-selectin, oxidative stress and vasoconstriction as HO-1 and eNOS were measured and compared to their expression by the static control.

3.3.1. Shear stress and inflammation

ICAM-1 and E-selectin are two membrane receptors implicated in the recruitment of leukocytes during inflammatory process. We highlighted the inflammatory response induced on HUVECs by shear stress comparing static and dynamic REL of mRNA from ICAM-1 and E-selectin. In static condition, the REL of these genes (Fig. 4) is really weak 0.14 (ICAM-1) and 0.27 (E-selectin) and coherent as well as with Montgomery and with Wertheimer and collaborators works [12,26]. In shear condition, the REL of both genes increases. Indeed, Fig. 5 shows a 31 times increase of ICAM-1 mRNA REL and 15 times for E-selectin in sheared HUVECs compared to the static control. These observations suggest that our protocol creates a laminar shear stress inducing an inflammatory response on HUVECs. Several experiments reported in the literature measure the activation induced by shear stress on ECs. They all differ from our experiment from the laminar flow system used to the technique utilized to highlight gene expression variation. Among these studies, two are particularly interesting for our work. Nagel and coworkers [14] showed an increase of ICAM-1 mRNA level after 2 h with a maximum at 8 h of

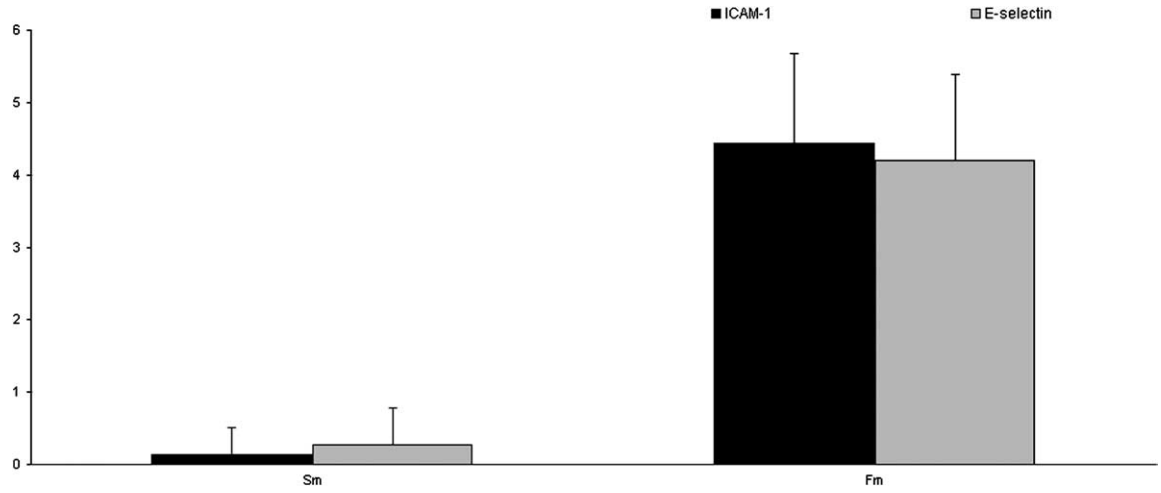


Fig. 4. mRNA relative expression level of inflammatory genes ICAM-1 (black) and E-selectin (grey) under static or dynamic 6 h, 1 Pa conditions. Genes expression were quantified by real time quantitative PCR. Quantities were normalized to the quantity of RPS29 mRNA. Data shown are a mean of duplicate determinations of three independent experiments. Error bars represent the SEM. Calculation were made using the gene expression analysis for iCycler® iQ Real-Time PCR Detection System 1.0 (Biorad, France). $^{*}p \leqslant 0.05$ versus static.

1 Pa laminar shear stress. However with these conditions, they did not observe any variation of the E-selectin level measured by northern blot. Furthermore, we showed in our study that E-selectin mRNA REL is two times less increased than ICAM-1 (1.7 times less). Our observation is relieved by Sampath and colleagues [17] work who demonstrated that E-selectin mRNA was less responsive to laminar shear stress than ICAM-1. They showed that after an hour of exposure to flow E-selectin mRNA level was slightly reduced but remained at its initial level after 6 hours. ICAM-1 up-regulation by shear stress was also confirmed by Wasserman and colleagues [22] who showed by qPCR that ICAM-1 was upregulated 11 times by 1 Pa laminar shear stress during 24 h. Finally our results confirm that laminar shear stress induces an inflammatory response on HUVECs after 6 h by increasing the transcription of ICAM-1. Furthermore, we demonstrated that E-selectin is also up-regulated but at a lower level than ICAM-1 suggesting different levels of implication of both proteins during inflammation. Indeed, ICAM-1 possesses a SSRE in its promoter [5] whereas E-selectin does not [27]. Our results confirm that both genes are not induced using the same pathway or not at the same time.

3.3.2. Shear stress and oxidative stress/vasomotion

To further investigate the hypothesis that steady laminar shear stress may regulate potentially atheroprotective genes, we examined the behaviour of the endothelial isoform of NO Synthase (eNOS). eNOS produces NO which is thought to play a central role in vascular homeostasis [7,25]. Specifically in atherogenesis, NO has been demonstrated to inhibit thrombosis, cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression, leukocyte adhesion to endothelium, and smooth muscle cells proliferation and migration [4,7,25]. Taken together, these observations suggest that NO is an important atheroprotective molecule. As demonstrated in Fig. 5A, eNOS mRNA REL is increased 17 times in dynamic versus static condition. This result corroborates results reported recently demonstrating laminar shear stress up-regulation of eNOS mRNA in bovine aortic endothelial cells (BAECs) cultivated in a cone-in-plate viscometer [24]. eNOS mRNA up-regulation (9 times) appears very quickly after the application of a

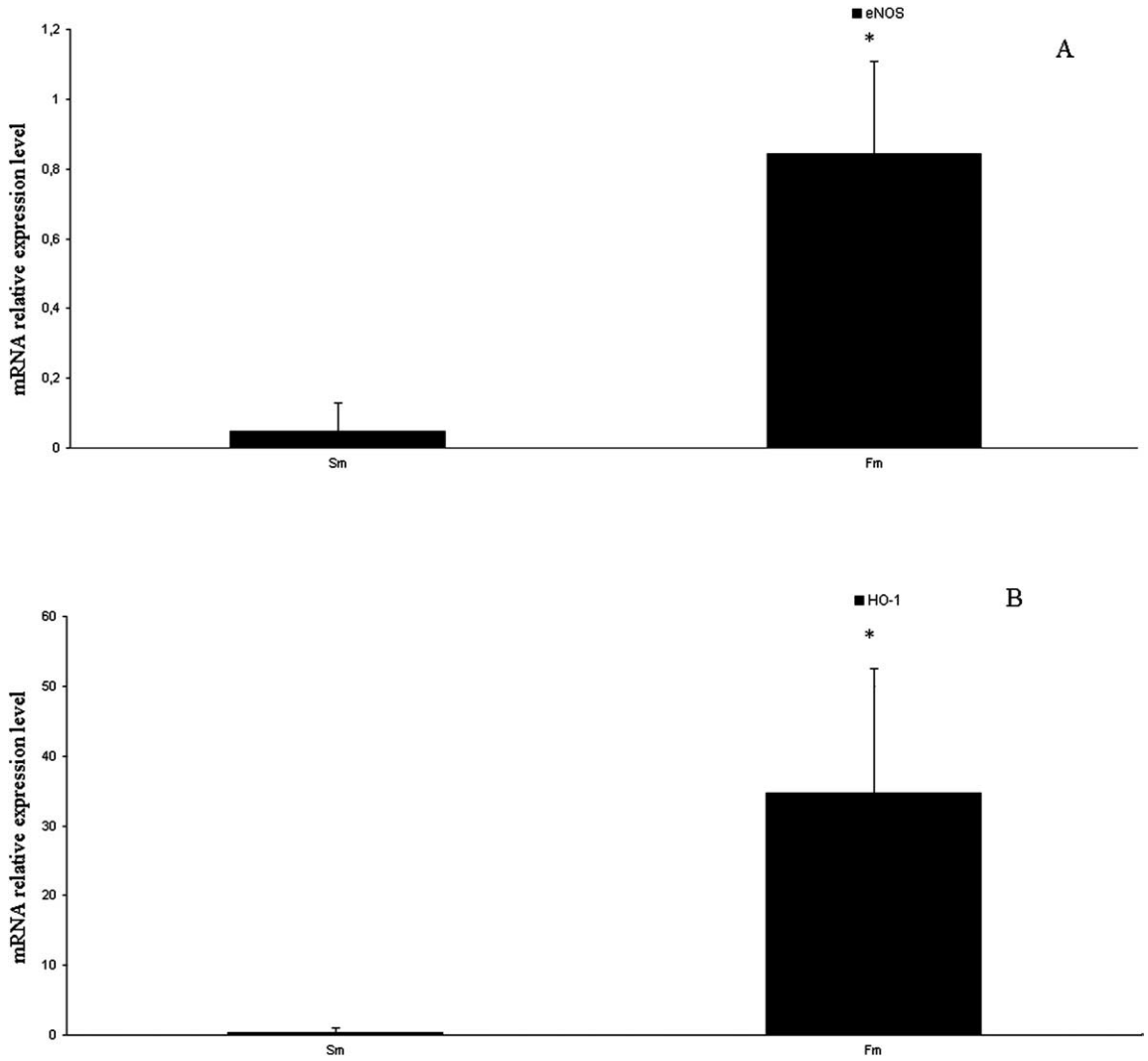


Fig. 5. mRNA relative expression level of a vasomotion gene eNOS (A) and an oxidative stress gene HO-1 (B) under static or dynamic 6 h, 1 Pa conditions. Genes expression were quantified by real time quantitative PCR. Quantities were normalized to the quantity of RPS29 mRNA. Data shown are a mean of duplicate determinations of three independent experiments. Error bars represent the SEM. Calculation were made using the gene expression analysis for iCycler® iQ Real-Time PCR Detection System 1.0 (Biorad, France). $^{*}p \leqslant 0.05$ versus static.

physiological laminar shear stress (1.5 Pa during 6 h). We can conclude that eNOS behaviour face to laminar shear stress is equivalent in different cell lines (HUVECs/BAECs).

It has also been shown that laminar shear stress stimulates the production of reactive oxygen species (ROS) like $O_2^{\circ -}$ by ECs [6,10]. The heme oxygenase 1 (HO-1) is a redox sensitive gene in many cell types [1,9]. We measured the mRNA REL of HO-1 in HUVECs submitted to shear stress. Figure 5B shows that 1 Pa laminar shear stress up-regulates HO-1 mRNA REL 124 folds. This is a huge up-regulation in comparison to Warabi and collaborators [23] who showed that the induction of HO-1 is shear stress level-dependant at low shears (0.004–0.2 Pa) and reaches a plateau at 0.02 Pa. Maximum induction, near 12–13 folds, was observed as early as 4 h after stimulation and continued for up to

24 h. Our results confirm that HO-1 is shear stress inducible and can be more induced with a highly but physiological shear stress.

4. Conclusion

In this study, we showed that HUVECs gene expression is correlated to shear stress generated by a laminar flow system developed in our lab. Furthermore, laminar shear stress induces: (1) oxidative stress via a huge induction of HO-1; (2) a possible vasoconstriction, eNOS up-regulation will probably increase NO synthesis; (3) Inflammation through ICAM-1 and E-selectin translation increase at different levels. Moreover, these results suggest that our protocol is enough sensitive to exhibit the major (HO-1, ICAM-1) and the less inducible (eNOS and E-selectin) markers of shear stress mechanosensing on ECs.

This laminar flow system will be very interesting to evaluate the impact of pharmacological substances injected in the bloodstream. Indeed the first barrier encounter in blood vessels is ECs. Their behaviour face to these circulating additives will be a great indicator for secondary effects of drugs like inflammation, vasoconstriction, oxidative stress, leakage in the interstitial medium ...

Acknowledgements

We thank the European Union through the *EuroBloodSubstitutes* Project funded by the European Union 6th Framework Programme, the Association pour la Recherche sur le cancer (ARC), "Région Lorraine" and Fondation pour la recherche médicale (FRM) for the financial supports.

References

[1] L.A. Applegate, P. Luscher and R.M. Tyrrell, Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells, *Cancer Res.* **51** (1991), 974–978.
[2] B.R. Blackman, G. Garcia-Cardena and M.A. Gimbrone, Jr., A new in vitro model to evaluate differential responses of endothelial cells to simulated arterial shear stress waveforms, *J. Biomech. Eng.* **124** (2002), 397–407.
[3] S. Chien, Molecular basis of rheological modulation of endothelial functions: importance of stress direction, *Biorheology* **43** (2006), 95–116.
[4] R. De Caterina, P. Libby, H.B. Peng, V.J. Thannickal, T.B. Rajavashisth, M.A. Gimbrone, Jr, W.S. Shin and J.K. Liao, Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, *J. Clin. Invest.* **96** (1995), 60–68.
[5] K. Degitz, L.J. Li and S.W. Caughman, Cloning and characterization of the 5′-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene, *J. Biol. Chem.* **266** (1991), 14024–14030.
[6] G.W. De Keulenaer, D.C. Chappell, N. Ishizaka, R.M. Nerem, R.W. Alexander and K.K. Griendling, Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase, *Circ. Res.* **82** (1998), 1094–1101.
[7] G.J. Dusting, Nitric oxide in cardiovascular disorders, *J. Vasc. Res.* **32** (1995), 143–161.
[8] A.E. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker and C.R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, *J. Clin. Invest.* **52** (1973), 2745–2756.
[9] S.M. Keyse and R.M. Tyrrell, Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989), 99–103.
[10] F.R. Laurindo, A. Pedro Mde, H.V. Barbeiro, F. Pileggi, M.H. Carvalho, O. Augusto and P.L. da Luz, Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism, *Circ. Res.* **74** (1994), 700–709.
[11] K. Lin, P.P. Hsu, B.P. Chen, S. Yuan, S. Usami, J.Y. Shyy, Y.S. Li and S. Chien, Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (2000), 9385–9389.

[12] K.F. Montgomery, L. Osborn, C. Hession, R. Tizard, D. Goff, C. Vassallo, P.I. Tarr, K. Bomsztyk, R. Lobb, J.M. Harlan and T.H. Pohlman, Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991), 6523–6527.
[13] S. Muller, S. Legrand, X. Wang, P. Waché and J.-F. Stoltz, Actin filaments and shear stress in vascular endothelial cells, *Problems in Fluid Mechanics and Hydrology* **1** (1999), 299–306.
[14] T. Nagel, N. Resnick, W.J. Atkinson, C.F. Dewey, Jr. and M.A. Gimbrone, Jr., Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells, *J. Clin. Invest.* **94** (1994), 885–891.
[15] A.S. Neish, A.J. Williams, H.J. Palmer, M.Z. Whitley and T. Collins, Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter, *J. Exp. Med.* **176**(6) (1992), 1583–1593.
[16] A. Papapetropoulos, R.D. Rudic and W.C. Sessa, Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system, *Cardiovasc. Res.* **43** (1999), 509–520.
[17] R. Sampath, G.L. Kukielka, C.W. Smith, S.G. Eskin and L.V. McIntire, Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro, *Ann. Biomed. Eng.* **23** (1995), 247–256.
[18] Y.J. Shyy, H.J. Hsieh, S. Usami and S. Chien, Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994), 4678–4682.
[19] J.F. Stoltz, D. Dumas, X. Wang, E. Payan, D. Mainard, F. Paulus, G. Maurice, P. Netter and S. Muller, Influence of mechanical forces on cells and tissues, *Biorheology* **37** (2000), 3–14.
[20] J.N. Topper, J. Cai, D. Falb and M.A. Gimbrone, Jr., Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996), 10417–10422.
[21] T.G. van Kooten, J.M. Schakenraad, H.C. Van der Mei and H.J. Busscher, Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* **26** (1992), 725–738.
[22] S.M. Wasserman, F. Mehraban, L.G. Komuves, R.B. Yang, J.E. Tomlinson, Y. Zhang, F. Spriggs and J.N. Topper, Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress, *Physiol. Genomics* **12**(1) (2002) 13–23.
[23] E. Warabi, Y. Wada, H. Kajiwara, M. Kobayashi, N. Koshiba, T. Hisada, M. Shibata, J. Ando, M. Tsuchiya, T. Kodama and N. Noguchi, Effect on endothelial cell gene expression of shear stress, oxygen concentration, and low-density lipoprotein as studied by a novel flow cell culture system, *Free Radic. Biol. Med.* **37** (2004), 682–694.
[24] M. Weber, C.H. Hagedorn, D.G. Harrison and C.D. Searles, Laminar shear stress and 3′ polyadenylation of eNOS mRNA, *Circ. Res.* **96** (2005), 1161–1168.
[25] A. Wennmalm, Nitric oxide (NO) in the cardiovascular system: role in atherosclerosis and hypercholesterolemia, *Blood Press.* **3** (1994), 279–282.
[26] S.J. Wertheimer, C.L. Myers, R.W. Wallace and T.P. Parks, Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate, *J. Biol. Chem.* **267** (1992), 12030–12035.
[27] J. Whelan, P. Ghersa, R. Hooft van Huijsduijnen, J. Gray, G. Chandra, F. Talabot and J.F. DeLamarter, An NF kappa B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription, *Nucleic Acids Res.* **19** (1991), 2645–2653.
[28] G.E. White, M.A. Gimbrone, Jr. and K. Fujiwara, Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells in situ, *J. Cell Biol.* **97** (1983), 416–424.
[29] T. Ziegler, K. Bouzourene, V.J. Harrison, H.R. Brunner and D. Hayoz, Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18** (1998), 686–692.

ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING
Volume 10, Number 7, 2008
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ars.2007.1982

Editorial

How to Evaluate Blood Substitutes for Endothelial Cell Toxicity

CAROLINE GAUCHER and PATRICK MENU

ABSTRACT

The most common and widely transplanted tissue worldwide is blood. But concerns about safety and adequacy of blood transfusion have fostered 20 years of research into blood substitutes such as oxygen carriers based on modified hemoglobin (Hb). Chemically modified or genetically engineered Hb developed as oxygen therapeutics are designed to restore blood volume and to correct oxygen deficit due to ischemia in a variety of clinical settings. Uncontrolled oxidative reactions mediated by large amounts of cell-free Hb and their reactions with various oxidant/antioxidant and cell signalling systems emerge as an important pathway of toxicity. Hemoglobin can react with oxygen and NO, leading to the production of reactive oxygen or nitrogen species. Inside the bloodstream, oxidized Hb and ROS/RNS are in direct contact with endothelial cells (EC). Thus, chain reactions may trigger molecular and cellular biology, causing oxidative stress-related pathologies. This editorial presents an overview of interactions between Hb (modified or not) and EC. We also propose a wide range of techniques and methods to assess oxidative stress and inflammation responses of EC after exposure to Hb. This editorial can serve as a guide to evaluate *in vitro* toxicity of new Hb molecules. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1153–1162.

SAFE BLOOD TRANSFUSION, A CHALLENGE FOR THE FUTURE

BLOOD TRANSFUSION IS ASSOCIATED with significant adverse effects such as potential virus transmission. Furthermore, as the need for fresh blood for transfusion increases, the requirement for an easily produced artificial blood substitute becomes evident. After several decades of intensive efforts, research has not succeeded in producing a safe oxygen carrier.

Hemoglobin-Based Oxygen Carriers (HBOC) transport oxygen, that indicates their use when blood loss is extensive (*i.e.*, volume replacement must be associated with oxygen contribution). They are derived from purified hemoglobin (Hb), which is an obvious candidate as a blood substitute with a number of desirable characteristics. Hemoglobin is the natural protein transporting O_2 from lung to organs with a high capacity for O_2 transport and release. It lacks the numerous and complex antigens of the red blood cells (RBC) membrane, hence it appears to be universally compatible. It is a "robust" molecule, stable under standard storage conditions *(i.e.*, frozen or lyophilized).

The first clinical trial using unmodified Hb was undertaken by Amberson and colleagues in 1949 (4), and indicated complications such as severe kidney toxicity. Improved purification alleviated some, but not all the adverse effects of Hb. However, due to the purification methods used to remove endotoxins and cellular ghosts, 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) was also removed, which resulted in a decrease of O_2 delivery (23). Furthermore, free Hb when released in the circulation and diluted in the plasma can dissociate into dimers (43), resulting in a short circulatory half-life and renal toxicity. This problem has been addressed by a variety of chemical modifications, such as polymerization, cross-linking, conjugation with macromolecules like polyethylene glycol (PEG) or dextran, hybridization with

Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

iron–cobalt, nickel–iron, or iron–zinc, and encapsulation into phospholipid vesicles (6, 40, 52, 85).

Intravenous injection of purified Hb results in chest pain, bradycardia, hypertension, decrease in urine output and endogenous creatinine clearance (75). Subsequently, Hb was chemically modified by polymerization with glutaraldehyde to increase molecular weight in order to increase vascular retention time and decrease renal toxicity. Examples of such first-generation polymerized Hb products are Polyheme® (Northfield laboratories, Inc., Evanston, IL), Hemopure® (Biopure corporation, Cambridge, MA), and Hemolink® (Hemosol Corporation, Mississauga, Canada) (93). Given the heterogeneity of the glutaraldehyde reaction and possible secondary reactions (53), research has focused on a simpler molecule, the $\alpha\alpha$-Hb (Baxter Healthcare, Deerefield, IL). This compound was stabilized by intramolecular cross-linking between α chains by bis(dibromosalicyl)fumarate (DBBF), so that neither polymerization nor subunit dissociation was possible. Unfortunately, $\alpha\alpha$-Hb was shown to be intensively vasoconstrictive (38).

A number of new and largely unresolved safety-related problems have arisen during preclinical development and in clinical trials of the current generation of HBOC. This includes vasoconstriction (27, 82), pro-inflammatory activity, and oxidative stress (35) (Fig. 1). At the time of writing, therefore, there is no blood substitute available for a "safe" human transfusion. However, the need for blood substitutes remains a current problem.

Free Hb suitable for HBOC production may be extracted from bovine or outdated human blood or produced by genetically modified microorganisms (bacteria or yeast) (Table 2). The latter technique is a relatively new and exciting avenue of research. Indeed, it allows the production and the modification of Hb without any contamination [*e.g.*, human immunodeficiency virus (HIV) or bovine spangiform encephalopathy (BSE)] or, because cross-linking may be achieved by genetic manipulation, chemical products. A European project entitled "Euro Blood Substitutes" (EBS) (www.eurobloodsubstitutes. com, accessed 2/15/08) was funded within the European Union 6th Framework Programme. The EBS Project aims to develop a technological platform for producing novel heme proteins and blood substitute components using micro-organisms as "cell factories."

When injected intravenously, HBOC come into contact with blood cells but also with the endothelium, which covers the luminal surface of blood vessels from the heart to the smallest capillaries. The endothelium is a biologically active monolayer of endothelial cells (EC), providing an interface between blood flow and tissues. They are involved in vasomotion through synthesis of nitric oxide (NO), for example, homeostasis through interaction with platelets, atherosclerosis, angiogenesis, and inflammation via the expression of membrane receptors for leukocytes. EC can sense the physical and/or chemical properties of blood substitutes and regulate their behavior.

Publications dealing with HBOC/EC interactions refer to EC from various origins (bovine or human), extracted from diverse

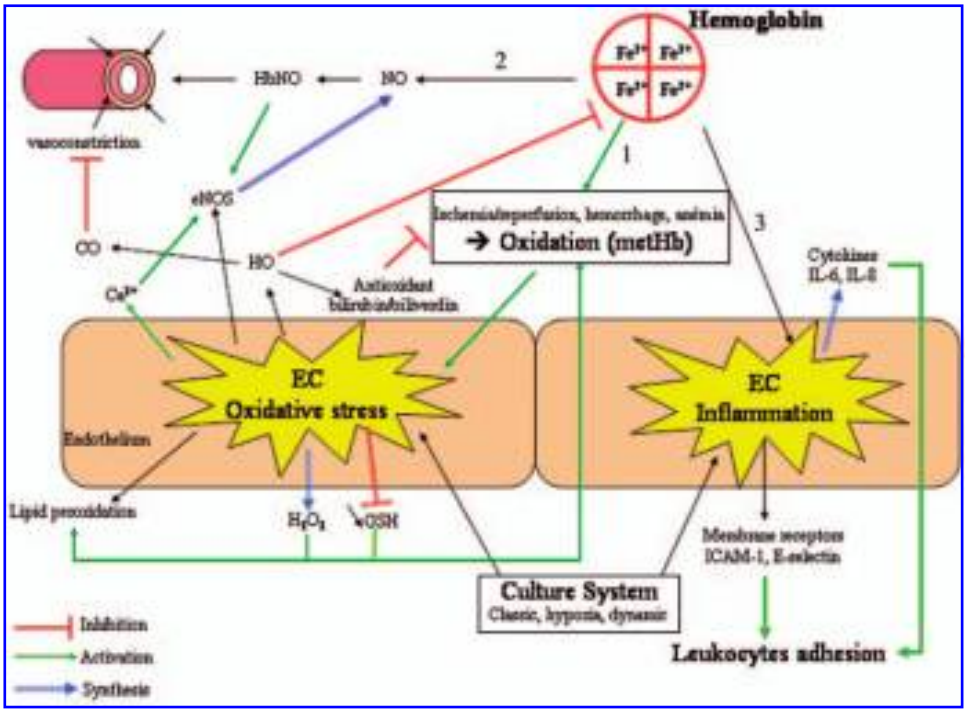


FIG. 1. Oxidative stress, inflammation, and adaptation of endothelial cells. **1.** Hemoglobin (Hb) is oxidized into methemoglobin (metHb) by oxidative stress engendered by hemorrhage, ischemia/reperfusion, or anemia. Oxidative stress on endothelial cells (EC) induces lipid peroxidation, H_2O_2, and Ca^{2+} leakage from the cells. It lowers reduced glutathione (GSH) concentration. MetHb upregulates the transcription and activity of the heme-oxygenase-1 (HO-1). This leads to reduce the oxidative stress (biliverdin) and vasoconstriction (CO). **2.** Hb can scavenge NO, decreasing its bioavailability and inducing vasoconstriction. **3.** Hb can induce inflammatory reactions and potentiate leukocytes recruitment by EC.

Table 1. Different Types of Endothelial Cells Used in the Studies Quoted in Text

Type	*Signification*	*References*
BAEC	Bovine aortic EC	20–22, 44, 71
BPAEC	Bovine pulmonary artery EC	117
HAEC	Human aortic EC	102
HCAEC	Human coronary artery EC	98
HMVEC	Human lung microvascular EC	18
HUVEC	Human umbilical vein EC	34, 97, 108, 109

EC, endothelial cells; N.D., non determined.

tissues (arteries or veins) (Table 1). cause structure and phenotypes of EC vary between animals and segments of the vascular tree (3), EC origin makes a huge difference in experimental results. One can wonder what is the interest to use animal cells in the place of human cells. The greater choice should be between the different sites of the vasculature. Arteries, veins, and microvessels are not submitted to the same oxygen partial pressure and do not have the same structure. Indeed, the main functions of the endothelium are differentially regulated between different sites of the vascular tree and from one moment to the next (2). For example, endothelial nitric oxide synthase expression is higher on the arterial side of the circulation of organs (72). The choice of EC type should be driven by the application of the HBOC tested.

Experimental procedures leading to the FDA approval of a new pharmacological molecule start from (a) physico-chemical characterization of the product, (b) *in vitro* activation of cells, (c) *ex vivo* experiments on isolated organs, (d) *in vivo* tests, and end with clinical evaluation in humans (35). Paradoxically, few studies on the *in vitro* impact of blood substitutes on EC are available in the literature.

One of our purposes is to assemble or facilitate access to a substantial part of the information a scientist needs to monitor HBOC interactions with EC *in vitro*. We hope to be as extensive as possible on all phenomena observed. This editorial completes a recent review published on this subject (10). Our reflections are a guide for *in vitro* evaluation of the new Hb toxicity.

OXIDATIVE STRESS, THE JANUS FACE OF HEMOGLOBIN

Hb: a versatile protein

Aerobic organisms are endowed with enzymatic oxidant defense systems, which provide protection against activated oxygen species. Damage caused by reactive oxygen species can be greatly amplified if free redox active iron is present (37, 100). One abundant source of potentially toxic iron is exogenous (HBOC) and endogenous heme, which can enhance oxidant-mediated cellular damage (7, 8, 36, 66, 73).

HBOC are used to reoxygenate organs and tissues when the blood loss is so extensive that it perturbs hemodynamic parameters. Indeed, blood oxygen carrying capacity is so low that the metabolism becomes anaerobic, inducing oxidative stress. HBOC injections complicate the situation because they typically have a higher affinity for O_2 than Hb inside RBC. So, the amount of oxyhemoglobin (HbO_2) in the blood vessels is higher and, because oxidative stress is already engaged and HbO_2 has the capacity to auto-oxidize, the production of reactive oxygen species is substantial. Moreover, the injection of free Hb into the bloodstream can overload the Hb detoxification system.

Hydrogen peroxide (H_2O_2), produced by superoxide dismutase, is reportedly able to generate hydroxyl radicals when it reacts with free ferrous iron (Fe^{2+}) oxidizing to ferric Fe^{3+} (Fenton reaction). H_2O_2 can also convert oxyhemoglobin (Fe^{2+}) into methemoglobin (Fe^{3+}), which cannot transport O_2 and is toxic (32). H_2O_2 can also react with metHb as well as other heme proteins to produce a higher oxidation state of the iron, ferryl or Fe^{4+} (20, 31, 33, 42), which can initiate membrane lipid peroxidation and/or oxidize other macromolecules.

Oxidative stress plays a major role in the pathogenesis of EC, inducing dysfunction such as hypertension, inflammation, and atherosclerotic cardiovascular diseases. Because of their direct and continuous contact with the circulating blood, EC are particularly sensitive targets for oxidative products generated by free Hb. Several *in vitro* studies showed that Hb (at low concentration) either can be directly cytotoxic or can alter the EC biology inducing cytoskeleton alterations (15) and sensitization to H_2O_2 (9).

Purified Hb or HBOC preparations in their reduced forms (Fe^{2+}) are not, by themselves, cytotoxic to EC (17, 18). However, the highly reactive Fe^{4+} and, to a lesser extent, its Fe^{3+} forms can induce significant cytotoxicity. EC contain a protective system to detoxify the blood from Hb leakage out of the RBC (48). Part of this system includes heme oxygenase.

Endothelial cell self-defense: heme oxygenase

Heme oxygenase (HO) was discovered in the 1960s (80) as the major heme catabolic enzyme that converts heme into biliverdin and carbon monoxide (CO), and releases iron. Although HO contributes to homeostasis of heme metabolism by oxidizing any excess of heme released from senescent RBC, it also appears to play an important role in defense against oxidative stress. Indeed, HO produces biliverdin and bilirubin (the reduced form of biliverdin), which are two physiologically effective antioxidants.

Three HO isozymes HO-1, HO-2, and HO-3 have been described (54, 76). HO-1, which is distributed ubiquitously in mammalian tissues, is induced strongly and rapidly by many compounds that elicit cell injury like inflammatory cytokines, oxidants, and NO (5, 22, 45). Furthermore, HO-1 induction is an indispensable *in vivo* response in the protection of kidneys against acute heme protein toxicity (62). The natural substrate of HO, heme, is itself a potent inducer of the enzyme (96). Furthermore, ferric heme is known to increase HO-1 mRNA level (76). So, HBOC auto-oxidation into metHb can also induce HO-1.

Cheng and collaborators demonstrated that polymerized Hb (Polyheme, Northfield Laboratories) induces the synthesis of HO-1 protein in a time-dependent manner in human lung microvascular endothelial cells (HMVEC) (15). Wagener and collaborators found that the contribution of HO-1 and HO-2 isoforms to the total HO activity in human umbilical vein

endothelial cells (HUVEC) exposed to heme was 70% due to HO-1 and 21% to HO-2 (89).

HO-1 also increases the production of endogenous CO, inducing vasodilation (90, 68). Hb is known to scavenge NO, thus decreasing its physiological availability and causing vasoconstriction. So HO-1 induction by modified Hb, by enhancing the production of CO, can reduce the effect of NO scavenging by heme and diminish the consequent vasoconstriction.

The delicate balance of nitric oxide

NO was discovered to be a potent vasodilator in 1979 (34) and later identified as the endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (41, 67). It is synthesized *in vivo* from L-arginine by three NO synthases isoenzymes (NOS), including neuronal (nNOS, NOS I), inducible NOS (iNOS, NOS II), and endothelial NOS (eNOS, NOS III). A mitochondrially-localized NOS (mtNOS) was discovered in 1995 (47) and recently identified in EC (21). It produces more NO than eNOS do (13). For the moment, no publication on NO produced by mtNOS due to the presence of HBOC is available.

eNOS is expressed in EC as a constitutive enzyme and produces picomolar to nanomolar amounts of NO for short periods in response to receptor stimulation (acetylcholine, bradykinin) or shear stress. NO through its vasodilator activity is crucial for the maintenance of vascular homeostasis. Moreover, it has recently been discovered that RBC exhibit an active and functional endothelial type NO synthase. RBC-NOS regulates deformability of the RBC membrane and inhibit activation of platelets (46). NO is a puissant molecule interacting with blood cells (RBC, platelets, leukocytes), and vascular wall (endothelium, smooth muscle cells) (91). While excessive NO production is generally associated with tissue injury, it is important to note that NO constitutively produced by endothelium is believed to play a protective role in the microvasculature by inhibition of platelet and neutrophil adhesion to endothelial monolayers (1).

Preclinical and clinical studies reported that the major adverse effect induced by Hb solutions is a transient vasoconstriction (87), presumably due to NO scavenging by heme. Another situation that decreases NO concentration in the bloodstream is its reaction with reactive oxygen species which promotes the formation of NO_2^- (nitrite) and NO_3^- (nitrate).

The reactions between Hb and NO are important factors determining how NO works *in vivo* and may mediate the biological effects of free Hb on EC. Injection of a HBOC solution increases the amount of free Hb in the blood and promotes the reaction between NO and Hb. NO can react with either deoxy or oxyHb, forming nitrosylhemoglobin (HbNO) and methemoglobin plus NO_3^-, respectively (70).

Unmodified oxyHb induced a higher NO_2^-/NO_3^- formation ratio in normal human coronary artery EC, whereas an improved

Table 2. Different Types of Hemoglobin and Modified HemoglobinU in Studies Quoted in Text

Designation	*Origin*	*Molecular weight (kDa)*	*Modification*	*References*
Hemin	ND	ND	None	85, 93
Hemoglobin, Hb, ferrous, Oxy Hb, free Hb, stroma free Hb, HbAg, unmodified Hb	Bovine Human	64	None	13, 16, 33, 53, 54, 75, 76
Methomoglobin, MetHb, Ferric Hb, hemin	ND	64	None	7, 48, 74, 75, 85, 86
Mesoporphyrin	ND		None	74, 75
Dex-BTC-Hb	Human	200	Conjugated with dextran benzene-tetracarboxylate	11, 25, 79
$\alpha\alpha$-Hb, αDBBF-Hb, DBBF-Hb	Human	64	Intramolecularly cross-linked with dibromosalicylfimarate	17, 18, 33, 54, 62, 79
Polymerized α-DBBF-Hb	Human	400	Polymerization with bis(maleoglycylamide) polyethylene (BMAA-PEG)	33
Polynitroxylated $\alpha\alpha$-Hb	Human	ND	Polynitroxylated	62
Liposome encapsulated Hb	Human	212 nm	Encapsulation	59, 95
Hb polytaur	α-Human and β-bovine		Polymerization of Hb-minotaur	23
PolyHb, polyheme	Human	ND	Polymerization	14
o-Raffinose cross-linked Hb, hemolink	Human	128	Cross-linked with o-raffinose	94
Hb cross-linked intra- and intermolecularly with o-adenosine	Bovine	ND	Crosslinked intra- and intermolecularly with o-adenosine	76
Erythrocytes lysates	Human	ND	Lysis	15, 94

blood substitute consisting of Hb crosslinked intra and intermolecularly with o-adenosine decreased it (78). So unmodified oxyHb can scavenge endothelial NO. Finally Simoni *et al*. reported that Hb induced hemodynamic changes mediated, in part, by the disruption of NO vasodilator activity (78).

eNOS transcription and translation could balance NO scavenging by HBOC infusions. HAEC incubated for 3 h in the presence of two different Hb derivatives, Dex-BTC-Hb and $\alpha\alpha$-Hb, did not exhibit any change of mRNA or protein expression (81).

To show the impact of different substances on vasomotion, experimental models of veins or arteries have been developed consisting of vascular rings mounted in tissue baths. Exposure of vascular rings to Hb results in vasoconstriction (33, 60, 86). Chavez–Negrete and co-workers showed that there was no difference between stroma-free Hb and starch-hemoglobin (MW: 200–260 kDa) on the *in vitro* contractile activity of adult male rats aortic rings (14). Their findings do not support the hypothesis that an increase of Hb molecule size prevents Hb extravasation, and the consequent vasoconstriction due to NO scavenging by Hb in the cellular space between endothelium and smooth muscle cells.

iNOS was originally discovered in macrophages (94) but is also expressed in EC. It is induced by proinflammatory cytokines (29, 83) and shear stress (65). It generates significantly greater and more sustained amounts of NO compared to eNOS. The micromolar concentrations generated by high-output iNOS are microbicidal as well as pro-inflammatory, damaging to the surrounding cells and tissues. iNOS is thought to contribute to the S-nitrosylation of Hb (63).

A fight for survival

Hb is a heme protein exhibiting catalase and peroxidase activities (30, 69). Cytotoxic activity is displayed by all peroxidases tested so far, as well as by various degradation products of heme proteins, including microperoxidase and hemin (7). The enzymatic system responsible for cell death consists of the cytotoxic triad: myeloperoxidase, H_2O_2 generated by the NADH oxidase, and endogenous chloride (halide ion) (25). It is now generally accepted that this mechanism involves an oxidation of the halide to the corresponding hypohalous acid by the peroxidase (57). The hypohalous acid (HOCl, HOI) then attacks cells in a series of nonenzymatic reactions, leading to its destruction.

The peroxidase activity of hemoproteins involving the ferryl heme intermediate is well recognized (Hb cycles between Fe^{3+} and Fe^{4+} as it consumes H_2O_2); this activity has been detected in human and animal whole blood by electron paramagnetic resonance microscopy (79).

Oxidized Hb cytotoxicity varies from cells injury to cell death. EC incubated with oxidized Hb become round, showing a detachment of the cells from the culture surface and cell death (19). In a model of hypoxia reoxygenation with α–DBBF Hb, McLeod *et al*. showed that cell survival depends on the ischemia period and on the Hb concentration used during reoxygenation (56). α–DBBF Hb at 60 and 100 μM did not affect cell survival, whereas 200 μM increased toxicity on both control and cells subjected to varying periods of hypoxia–reoxygenation.

Further molecular mechanisms concern DNA fragmentation, cell cycle arrest, and alteration of DNA content. Goldman and collaborators demonstrated that DNA fragmentation occurring in EC after a contact with H_2O_2 can be decreased by addition of free hemoglobin (HbA_0) (33). D'Agnillo and co-workers showed that HbA_0 and DBBF-Hb reduce the number of early apoptotic cells treated with H_2O_2 (17). The effect of DBBF-Hb is lower than HbA_0 one. This indicates that there are two levels of Hb implication: (a) Hb catalytically lower tissue H_2O_2 and alter the course of death, (b) Hb can be directly toxic to cells, oxidizing into more reactive oxidation states (ferrylHb). Furthermore, they concluded that the apparent difference in the pro-apoptotic effects between the two Hb may reflect their different rates of H_2O_2 consumption. D'Agnillo and collaborators investigated the cytotoxicity of DBBF-Hb and glucose oxidase-generated H_2O_2 (19). They showed that the redox cycling of DBBF-Hb by low levels of enzymatically generated H_2O_2 induces G2/M cell cycle arrest, which was followed by apoptosis of growth-arrested cells.

Impairment of cells integrity/metabolism

Glutathione (GSH) concentration remains a great indicator of oxidative stress. Unmodified Hb seems to decrease intracellular content of GSH (78). This suggested that it creates an oxidative stress and free radical production, which oxidized GSH into GSSG. Moreover, the combination of H_2O_2 with HbA_0 or DBBF-Hb produces a significant decrease in GSH contents compared to H_2O_2 alone (17). D'Agnillo and co-workers concluded that the formation of ferryl intermediate was closely linked to a greater loss of GSH (17). The enhanced loss of GSH may be explained by the aggravated peroxidative stress induced by heme-mediated lipid peroxidation processes, or possibly the efflux of GSH from stressed cells. Furthermore, McLeod and co-workers proved that reoxygenation during 3 h with free Hb caused depletion of intracellular GSH in a concentration-dependent manner (56).

EC produce H_2O_2 under normal conditions and to a greater extent after anoxia or ischemia followed by reperfusion (100). Oxidation of Hb by H_2O_2 has been correlated with oxidative stress and cell injury (58). H_2O_2 converts carboxylic acids into peroxy acids, which are used as oxidizing agents (44). This phenomenon is part of lipid peroxidation.

Unmodified Hb increases the production of lipid hydroperoxides (LOOH) in human coronary artery endothelial cells (HCAEC), but Hb crosslinked intra and intermolecularly with o-adenosine is nontoxic (78). McLeod and collaborators demonstrated the correlation between the ischemic period on BAEC and the quantity of lipids peroxidized (56). They also showed that addition of α–DBBF Hb caused a significant increase in lipid peroxidation after 2 h of hypoxia, followed by 1 h of reoxygenation.

Lactate is an indicator of cells suffering during hypoxia/reoxygenation. McLeod and collaborators (56) showed that lactate production was increased in BAEC during hypoxia, and dependent on the duration of hypoxia. Simoni and co-workers compared the cytotoxic effects of different Hb oxidation states (ferrous, ferric, ferryl) and molecular weights (400–1,020 kDa) on HUVEC (77). The lactate dehydrogenase level was highest following incubation with ferrylHb and lowest with low mo-

lecular weight polymerized Hb. So, the oxidation state of iron in Hb plays an important role in EC injury induction.

The intracellular signal that links systemic or local external stimuli to the synthesis and release of vasoactive compounds such as endothelins and EDRF, appears to be the level of Ca^{2+} which activates Ca^{2+}-dependent enzymes like eNOS. High levels of $[Ca^{2+}]i$ are toxic and may affect cell function and cause cell death.

Simoni and co-workers demonstrated that unmodified Hb significantly increases $[Ca^{2+}]i$ in HUVEC in comparison with purified Hb crosslinked intramolecularly with o-adenosine triphosphate and intermolecularly with o-adenosine. They concluded that an increase in $[Ca^{2+}]i$ may be triggered by Hb mediated generation of oxygen free radicals (77). Zhang *et al*. tested Hemolink as a purified Hb *versus* erythrocyte lysate on BPAEC (97). Hemolink produced a very weak elevation in $[Ca^{2+}]i$ compared to erythrocyte lysate. Erythrocyte lysate is known to be cytotoxic (16) so they suggested that this toxicity can be related to reactive oxygen radical generation from the lysate.

In conclusion, oxidative stress is one of the major consequences of Hb injection in human blood circulation. Indeed, Hb can be oxidized, even if modified, into met or ferryl Hb. These two compounds can provoke chain reactions such as heme oxygenase activation, or deleterious effects to EC such as morphological modification, lipid peroxidation, or cell death. Hb can also react with NO to form HbNO and become no longer physiologically available, H_2O_2 to form Hb higher oxidation states. Hb can cause an imbalance in the concentration of glutathione, lactate after hypoxia or calcium.

INFLAMMATION AS A BELL FOR RECRUITMENT

EC are a control center of the propagation of inflammatory reactions because their major role is to amplify the immune response (92). Inflammation induces the release of cytokines interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) from various immune cells activating EC to upregulate receptors (VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin). Receptor upregulation increases extravasation of neutrophils and monocytes to the infected site (diapedesis).

Inflammatory mediators

EC are activated by interleukins (IL-1, IL-4) and tumor necrosis factor-α (TNFα) liberated by macrophages and other white cells (11, 71). Following this activation, EC express inflammatory mediators like IL-6 and IL-8 (39, 51). Zhu and collaborators showed that IL-6 mRNA increases 30 min after the incubation of murine endothelioma cell line with encapsulated Hb (98) with a maximum at 4 h. More recently, Liu *et al*. detected an increase of IL-6 and IL-8 released by HUVEC after incubation with methemoglobin (51).

Adhesion molecules for leukocytes attraction

Membrane receptors are divided in two families: selectin and cell adhesion molecules (CAM) expressed on EC during the inflammation and implied in leukocyte diapedesis. E-selectin is the earliest mediator of leukocytes rolling on EC. CAM like ICAM-1 and VCAM-1 mediate firm adhesion between leukocytes and endothelium. The expression of adhesion molecules by EC during activation is the most studied phenomenon in the inflammation induced by HBOC.

It has been demonstrated that an oxidant can increase ICAM-1 expression. Indeed, HUVEC cultured *in vitro* with 0.1 m*M* H_2O_2 showed a two- to threefold increase in both ICAM-1 protein and mRNA between 0.5 and 2 h of stimulation (50).

Wagener *et al*. demonstrated that mesoporphyrin (a heme oxygenase inhibitor imitating Hb) increases ICAM-1 expression on HUVEC in a time and concentration dependant manner (89). The oxidation state of Hb is an important factor to predict the expression of inflammatory receptors on EC. Indeed, heme and methemoglobin are able to upregulate ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin (49, 88) whereas polyHb decrease the inflammatory effect of TNF-α on HMVEC (15). Moreover, modified Hb such as Dex-BTC-Hb or $\alpha\alpha$Hb did not affect ICAM-1 expression (81).

Leukocyte adhesion

To our knowledge, few publications on the *in vitro* impact of HBOC on EC/leukocytes interactions are available in the literature. McFaul *et al*. showed that incubation of leukocytes with HbA_0 stimulates the release of different cytokines (IL-8, IL-6, and TNF-α) (55). Furthermore, they demonstrated that plasma from blood incubated with HbA_0 exhibited chemotactic activity and stimulated HUVEC to become adherent to neutrophils.

Okayama and co-workers highlighted the antioxidant-anti-inflammatory effect of polynitroxylated $\alpha\alpha$-Hb (PNH) (64). They compared the effects of $\alpha\alpha$-Hb and PNH on xanthine oxidase and H_2O_2-induced neutrophil-endothelial adhesion *in vitro*. Peroxide and superoxide generated by xanthine oxidase enhance endothelial/neutrophil adhesion. $\alpha\alpha$-Hb increases the release of these two products whereas PNH inhibited it.

When Hb directly meets endothelial cells

Extravasation of Hb and change of vascular permeability have been associated with the use of HBOC. A precise quantitative assessment of these phenomena, due to oncotic pressure modifying the hydrostatic equilibrium between compartments, is fundamentally important toward understanding HBOC intravascular behaviour and oxygen delivery potential.

Dull and colleagues (24) demonstrated that polymerized Hb solutions (Hb-Polytaur and Hb-(Polytaur)n) induced endothelial barrier dysfunction like complete loss of restricted diffusion across monolayers of capillary EC.

Nakai and collaborators created a double chamber separated by an EC monolayer grown on a microporous filter to measure permeability characteristics of Hb derivatives and effects of their molecular mass (from free to liposome encapsulated Hb) (61). After 60 min of incubation, it was demonstrated that Hb derivatives with small molecular mass have increased permeabilities. Intramolecular crosslinking slightly reduced the permeability coefficient compared with free Hb. The biggest molecules (PegHb and liposome encapsulated Hb) are less able to

cross the EC monolayer. This result suggests that EC are a selective barrier able to decrease the diffusion of high molecular weight HBOC, defending a better intravascular half-life of high molecular weight Hb.

Furthermore, it has been proposed that the formation of HbNO could potentiate the uptake of Hb by EC (60). However, the presence of free Hb was detected inside guinea pig aortic EC after injection of Dex-BTC-Hb (26) in an animal treated with N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a NO synthase inhibitor (74). Faivre–Fiorina and collaborators concluded that the formation of HbNO does not enhance the uptake of Hb by EC and is not a prerequisite for Hb entry (26).

CULTURE SYSTEMS OR CONDITIONING ENDOTHELIAL CELL REACTIONS FACE TO HB

There are various techniques to cultivate EC to test blood substitutes. The classic technique consists in growing EC in a culture flask in an incubator with 5% CO_2. Several teams worked on the simulation of hypoxia/reoxygenation. They cultivated EC with 0 or 1% O_2 for different periods of time, reoxygenated with HBOC, and measured different parameters such as H_2O_2, lactate production, glutathione and lipid peroxidation (18, 56, 95).

More sophisticated systems have been developed to simulate shear stress applied on the vessel wall by bloodstream (12, 84, 99). Strangely, to our knowledge, no publication is available on the evaluation of HBOC impact on EC submitted to shear stress. Our team developed a laminar flow chamber to study mechanotransduction in EC (28, 59). We adapted this system to HBOC and are currently collecting data on the interaction between HBOC and sheared HUVEC.

THOUGHTS AND REMARKS

The most important goal for the future is to create a safe blood substitute for human transfusion without any or low secondary effects like vasoconstriction and oxidative stress. Vasoconstriction is a phenomenon thus far attributed to NO scavenging by Hb, but a new interesting explanation has been recently discovered. Indeed, vasoconstriction would be due to Hb extravasation from blood vessels and a too high P_{50} (82). This demonstrates that the fundamental mechanisms of vasoconstriction induced by free Hb are not totally understood and need to be reconsidered using fundamental models like cells and organs culture. Oxidative stress is the second main side effect of blood substitutes. Indeed, the iron present in the Hb can auto-oxidate, leading to great oxidative stress toward the endothelium.

Chemical and/or genetic modifications of Hb can suppress or enhance these reactions. For the moment, researchers are working on the expression of modified Hb into microorganisms. This is the aim of the EBS project. The project will span 3 years of intensive research into the development of a technological baseline for producing blood substitute components (novel heme proteins) using micro-organisms such as bacteria and fungi. The EBS Project will provide a technological baseline to use micro-organisms as cell factories for the production of a much needed, effective blood substitute that will help solve the problems associated with using donor blood for transfusions. Such technology has the capacity to produce a 'tailor-made' blood substitute with novel properties. For every new molecule designed, *in vitro* tests have to be performed on cells to measure potential interactions. Despite its necessity in terms of screening new molecule toxicity and impact, few publications on the measure of EC interaction with blood substitutes are available. One can wonder why such experiments are not a systematic scheme for Hb development. *In vitro* tests on EC or vessels rings and co-culture models should serve to understand fundamental mechanisms of Hb side effects (vasoconstriction, oxidative stress). We recently proposed a new system to reconcile *in vitro* and *in vivo* studies by applying Hb on EC under shear stress to mimic blood flow (28). This system enables researchers to investigate variation of blood viscosity, shear stress, and Hb concentration, and other parameters before starting investigations on more complexe models such as animals, a way for a more bioethical research.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the EuroBloodSubstitutes project for supporting this work.

ABBREVIATIONS

BAEC, bovine aortic endothelial cells; BPAEC, bovine pulmonary artery EC; $[Ca^{2+}]I$, intracellular calcium concentration; DBBF, bis(dibromosalicyl)fumarate; Dex-BTC-Hb,: dextran benzenetetracarboxylate haemoglobin; EC, endothelial cells; EDRF, endothelium-derived relaxing factor; GSH/GSSG, reduced/oxidized glutathione; H_2O_2, hydrogen peroxide; HAEC, human aortic endothelial cells; Hb/Hbs, hemoglobin/hemoglobins; HbA_0, hemoglobin A; $HbFe^{2+}/HbO_2$/OxyHb, ferrous hemoglobin/oxygenated haemoglobin; $HbFe^{3+}$/metHb, met haemoglobin; HBOC, hemoglobin based oxygen carriers; HCAEC, human coronary artery endothelial cells; HIV, human immunodeficiency virus; HMVEC, human lung microvascular endothelial cells; HO/HO-1, HO-2, HO-3, heme oxygenase/ heme oxygenase-1, -2, -3; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; ICAM-, intercellular adhesion molecule; IL-1, IL4, IL6, IL8, interleukin-1, -4, -6, -8; L-NAME, N-nitro-L-arginine methyl ester; LOOH, lipid hydroperoxides; MW, molecular weight; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; Na_2S, sodium sulfide; $NO/NO_2/NO^{2-}/NO^{3-}$, nitric oxide/nitrogen dioxide/nitrite/nitrate; NOS/eNOS, NOS III/iNOS, NOS II/nNOS, NOS I, NO synthase/ endothelial NOS/ inducible NOS/neuronal NOS; $O^{2\cdot-}$, superoxide; $ONOO^-$, peroxinitrite; PEG, polyethylene glycol; PFC, perfluorocarbon; PNH, polynitroxylated $\alpha\alpha$-Hb; RBC, red blood cells; TNF, TNF-α: tumor necrosis factor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule.

REFERENCES

1. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, and Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15: 831–845, 2001.
2. Aird WC. Endothelial cell dynamics and complexity theory. *Crit Care Med* 30: S180–185, 2002.
3. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 31: S221-S230, 2003.
4. Amberson W, Jennings J, and Martin Rhode C. Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *J Appl Physiol* 1: 469–489, 1949.
5. Applegate LA, Luscher P, and Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 51: 974–978, 1991.
6. Arifin DR and Palmer AF. Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome-encapsulated hemoglobin blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering. *Biotechnol Prog* 19: 1798–1811, 2003.
7. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, and Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb* 11: 1700–1711, 1991.
8. Balla G, Vercellotti GM, Muller–Eberhard U, Eaton J, and Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest* 64: 648–655, 1991.
9. Balla J, Jacob HS. Balla F, Nath K, Eaton JW, and Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad USA* 90: 9258–9289, 1993.
10. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Jacob HS, Eaton JW, and Balla G. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal* 9: 2119–2138, 2007.
11. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, and Gimbrone MA Jr. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 76: 2003–2011, 1985.
12. Blackman BR, Garcia–Cardena G, and Gimbrone MA Jr. A new in vitro model to evaluate differential responses of endothelial cells to simulated arterial shear stress waveforms. *J Biomech Eng* 124: 397–407, 2002.
13. Brookes PS. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion*. 3: 187–204, 2004.
14. Chavez–Negrete A, Oropeza MV, Rojas MM, Villanueva T, and Campos MG. Starch-hemoglobin induces contraction on isolated rat aortic rings. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 32: 549–561, 2004.
15. Cheng AM, Moore EE, Johnson JL, Walsh MD, Ao L, Moore PK, and Banerjee A. Polymerized hemoglobin induces heme oxygenase-1 protein expression and inhibits intercellular adhesion molecule-1 protein expression in human lung microvascular endothelial cells. *J Am Coll Surg* 201: 579–584, 2005.
16. Comair YG, Schipper HM, and Brem S. The prevention of oxyhemoglobin-induced endothelial and smooth muscle cytoskeletal injury by deferoxamine. *Neurosurgery* 32: 58–65, 1993.
17. D'Agnillo F and Alayash AI. Interactions of hemoglobin with hydrogen peroxide alters thiol levels and course of endothelial cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1880–1889, 2000.
18. D'Agnillo F, Wood F, Porras C, Macdonald VW, and Alayash AI. Effects of hypoxia and glutathione depletion on hemoglobin- and myoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium. *Biochim Biophys Acta* 1495: 150–159, 2000.
19. D'Agnillo F and Alayash AI. Redox cycling of diasparin cross-linked hemoglobin induces G2/M arrest and apoptosis in cultured endothelial cells. *Blood* 98: 3315–3323, 2001.
20. Dalziel K and O'Brien JR. Side reactions in the deoxygenation of dilute oxyhaemoglobin solutions by sodium dithionite. *Biochem J* 67: 119–124, 1957.
21. Dedkova EN, Ji X, Lipsius SL, and Blatter LA. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: 406–415, 2004.
22. Donnelly LE and Barnes PJ. Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 295–303, 2001.
23. Duc G and Engel K. Effect of 2,3-DPG concentration on hemoglobin-oxygen affinity of whole blood. *Scand J Clin Lab Invest* 24: 405–412, 1969.
24. Dull RO, DeWitt BJ, Dinavahi R, Schwartz L, Hubert C, Pace N, and Fronticelli C. Quantitative assessment of hemoglobin-induced endothelial barrier dysfunction. *J Appl Physiol* 97: 1930–1937, 2004.
25. Everse J and Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med* 22: 1075–1099, 1997.
26. Faivre–Fiorina B, Caron A, Fassot C, Fries I, Menu P, Labrude P, and Vigneron C. Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs. *Am J Physiol* 276: H766–H770, 1999.
27. Fitzpatrick CM, Savage SA, Kerby JD, Clouse WD, and Kashyap VS. Resuscitation with a blood substitute causes vasoconstriction without nitric oxide scavenging in a model of arterial hemorrhage. *J Am Coll Surg* 199: 693–701, 2004.
28. Gaucher C, Devaux C, Boura C, Lacolley P, Stoltz JF, and Menu P. *In vitro* impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile. *Clin Hemorheol Microcirc* 37: 99–107, 2007.
29. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, and Billiar TR. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 522–526, 1993.
30. Giardina B, Messana I, Scatena R, and Castagnola M. The multiple functions of hemoglobin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30: 165–196, 1995.
31. Giulivi C and Davies KJA. Hydrogen peroxide-mediated ferryl-hemoglobin generation in vitro and in red blood cells. *Methods Enzymol* 231: 490–496, 1994.
32. Giulivi C and Cadenas E. Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 24: 269–279, 1998.
33. Goldman DW, Breyer RJ 3rd, Yeh D, Brockner–Ryan BA, and Alayash AI. Acellular hemoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium: a role for ferryl iron. *Am J Physiol* 275: H1046–1053, 1998.
34. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, and Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 5: 211–224, 1979.
35. Guidance for industry, criteria for safety and efficacity evaluation of oxygen therapeutics as red blood cells substitutes. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biolgics Evaluation and Research. October 2004. http://www.fda.gov/cber/gdlns/oxytherbld.htm
36. Gutteridge JM and Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J* 256: 861–865, 1988.
37. Halliwell B and Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1–14, 1984.
38. Hess JR, MacDonald VW, and Brinkley WW. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol* 74: 1769–78, 1993.
39. Howells G, Pham P, Taylor D, Foxwell B, and Feldmann M. Interleukin 4 induces interleukin 6 production by endothelial cells: synergy with interferon-gamma. *Eur J Immunol* 21: 97–101, 1991.
40. Huang Y, Yonetani T, Tsuneshige A, Hoffman BM, and Ackers GK. Heterometallic hybrids of homometallic human hemoglobins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4425–4430, 1996.
41. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 9265–9269, 1987.

42. Keilin D and Hartree EF. Reaction of methaemoglobin with hydrogen peroxide. *Nature* 166: 513–514, 1950.
43. Kellett GL and Schachman HK. Dissociation of hemoglobin into subunits. Monomer formation and the influence of ligands. *J Mol Biol* 59: 387–399, 1971.
44. Kellogg EW 3rd and Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 250: 8812–8817, 1975.
45. Keyse SM, Applegate LA, Tromvoukis Y, and Tyrrell RM. Oxidant stress leads to transcriptional activation of the human heme oxygenase gene in cultured skin fibroblasts. *Mol Cell Biol* 10: 4967–4969, 1990.
46. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rosen P, and Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107: 2943–2951, 2006.
47. Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, and Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 375–381, 1995.
48. Kumar S and Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157: 175–188, 2005.
49. Liu X and Spolarics Z. Methemoglobin is a potent activator of endothelial cells by stimulating IL-6 and IL-8 production and E-selectin membrane expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1036–1046, 2003.
50. Lo SK, Janakidevi K, Lai L, and Malik AB. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol* 264: L406–412, 1993.
51. Loppnow H and Libby P. Adult human vascular endothelial cells express the IL6 gene differentially in response to LPS or IL1. *Cell Immunol* 122: 493–503, 1989.
52. Marden MC, Kiger L, Poyart C, Rashid AK, Kister J, Stetzkowski–Marden F, Caron G, Haque M, and Moens L. Modulation of the oxygen affinity of cobalt-porphyrin by globin. *FEBS Lett* 472: 221–224, 2000.
53. Marini MA, Moore GL, Christensen SM, Fishman RM, Jessee RG, Medina F, Snell SM, and Zegna AI. Reexamination of the polymerization of pyridoxylated hemoglobin with glutaraldehyde. *Biopolymers* 29: 871–882, 1990.
54. McCoubrey WK Jr, TJ Huang, and MD Maines. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725–732, 1997.
55. McFaul SJ, Bowman PD, and Villa VM. Hemoglobin stimulates the release of proinflammatory cytokines from leukocytes in whole blood. *J Lab Clin Med* 135: 263–9, 2000.
56. McLeod LL and Alayash AI. Detection of a ferrylhemoglobin intermediate in an endothelial cell model after hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 277: H92–99, 1999.
57. Morrison M and Schonbaum GR. Peroxidase-catalyzed halogenation. *Annu Rev Biochem* 45: 861–888, 1976.
58. Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, and Winslow RM. Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 269: H648–655, 1995.
59. Muller S, Legrand S, Wang X, Waché P, and Stoltz J–F. Actin filaments and shear stress in vascular endothelial cells. *Prob Fluid Mech Hydrol* 1: 299–306, 1999.
60. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, and Sadayoshi S. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 115–123, 1996.
61. Nakai K, Sakuma I, Ohta T, Ando J, Kitabatake A, Nakazato Y, and Takahashi T. A. Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *J Lab Clin Med* 132: 313–319, 1998.
62. Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, and Alam J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity *in vivo*. *Am J Pathol* 156: 1527–1535, 2000.
63. Nathan C. Perspectives Series: Nitric oxide and nitric oxide synthases inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100: 2417–2423, 1997.
64. Okayama N, Park JH, Coe L, Granger DN, Ma L, Hisa CJ, and Alexander JS. Polynitroxyl alpha alpha-hemoglobin (PNH) inhibits peroxide and superoxide-mediated neutrophil adherence to human endothelial cells. *Free Radic Res* 31: 53–58, 1999.
65. Ozawa N, Shichiri M, Iwashina M, Fukai N, Yoshimoto T, and Hirata Y. Laminar shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium. *Hypertens Res* 27: 93–99, 2004.
66. Paller MS and Jacob HS. Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging hydroxyl radical formation during reoxygenation of the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7002–7006, 1994.
67. Palmer RM, Ferrige AG, and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524–526, 1987.
68. Pannen BH, Kohler N, Hole B, Bauer M, Clemens MG,and Geiger KK. Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* 102: 1220–1228, 1998.
69. Patel RP, Svistunenko DA, Darley–Usmar VM, Symons MC, and Wilson MT. Redox cycling of human methaemoglobin by H2O2 yields persistent ferryl iron and protein based radicals. *Free Radic Res* 25: 117–123, 1996.
70. Patel RP. Biochemical aspects of the reaction of hemoglobin and NO: implications for Hb-based blood substitutes. *Free Radic Biol Med* 28: 1518–1525, 2000.
71. Pober JS. Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found Symp* 131: 170–184, 1987.
72. Pollock JS, Nakane M, Buttery LD, Martinez A, Springall D, Polak JM, Forstermann U, and Murad F. Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol* 265: C1379–1387, 1993.
73. Ponka P. Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 318: 241–256, 1999.
74. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, and Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 101: 746–752, 1990.
75. Savitsky JP, Doczi J, Black J, and Arnold JD. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther* 23: 73–80, 1978.
76. Shibahara S, Yoshizawa M, Suzuki H, Takeda K, Meguro K, and Endo K. Functional analysis of cDNAs for two types of human heme oxygenase and evidence for their separate regulation. *J Biochem* 13: 214–218, 1993.
77. Simoni J, Simoni G, Lox CD, and Feola M. Reaction of human endothelial cells to bovine hemoglobin solutions and tumor necrosis factor. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22: 777–787, 1994.
78. Simoni J, Simoni G, Martinez–Zaguilan R, Wesson DE, Lox CD, Prien SD, and Kumar RV. Improved blood substitute: evaluation of its effects on human endothelial cells. *ASAIO J* 44: M356–367, 1998.
79. Svistunenko DA, Patel RP, Voloshchenko SV, and Wilson MT. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *J Biol Chem* 272: 7114–7121, 1997.
80. Tenhunen, R., Marver, H. S., and Schmid, R. (1969). Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 244: 6388-6394, 1969.
81. Toussaint–Hacquard M, Devaux Y, Longrois D, Faivre–Fiorina B, Muller S, Stoltz J.F, Vigneron C, and Menu P. Biological response of human aortic endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions developed as potential blood substitutes. *Life Sci* 72: 1143–1157, 2003.
82. Tsai AG, Cabrales P, Manjula BN, Acharya SA, Winslow RM, and Intaglietta M. Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. *Blood* 108: 3603–3610, 2006.
83. Ungureanu–Longrois D, Balligand JL, Okada I, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Kunkel SL, Michel T, Kelly RA, and Smith TW. Contractile responsiveness of ventricular myocytes to

isoproterenol is regulated by induction of nitric oxide synthase activity in cardiac microvascular endothelial cells in heterotypic primary culture. *Circ Res* 77: 486–493, 1995.
84. van Kooten TG, Schakenraad JM, Van der Mei HC, and Busscher HJ. Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces. *J Biomed Mater Res* 26: 725–38, 1992.
85. Venkateshrao S, Venkatesh B, and Manoharan PT. Studies on nitrosyl hemes in Ni(II)-Fe(II) hybrid hemoglobins. *Nitric Oxide* 13: 226–231, 2005.
86. Vo PA, Reid JJ, and Rand MJ. Attenuation of vasoconstriction by endogenous nitric oxide in rat caudal artery. *Br J Pharmacol* 107: 1121–1128, 1992.
87. Vogel WM, Dennis RC, Cassidy G, Apstein CS, and Valeri CR. Coronary constrictor effect of stroma-free hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 251: H413–420, 1986.
88. Wagener, Feldman E, de Witte T, and Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 456–463, 1997.
89. Wagener FA, da Silva JL, Farley T, de Witte T, Kappas A, and Abraham NG. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 416–423, 1999.
90. Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, Kyokane T, Goda N, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Suematsu M, and Ishimura Y. Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 277: G1088–1096, 1999.
91. Wallis JP. Nitric oxide and blood: a review. *Transfus Med* 15: 1–11, 2005.
92. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365–376, 1989.
93. Winslow RM. Current status of oxygen carriers ('blood substitutes') *Vox Sang*. 91: 102–110, 2006.
94. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, and Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256: 225–228, 1992.
95. Yeh LH and Alayash AI. Effects of cell-free hemoglobin on hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) and heme oxygenase (HO-1) expressions in endothelial cells subjected to hypoxia. *Antioxid Redox Signal* 6: 944–953, 2004.
96. Yoshida T, Biro P, Cohen T, Muller RM, and Shibahara S. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *Eur J Biochem* 171: 457–461, 1998.
97. Zhang H, Weir BK, Macdonald RL, Marton LS, Solenski NJ, Kwan AL, and Lee KS. Mechanisms of $[Ca^{++}]i$ elevation induced by erythrocyte components in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 1501–1509, 1996.
98. Zhu X–L, Gafney WCM, Pacheco ND, and Rollwagen FM. Kinetics of cytokine gene expression in macrophage and endothelial cell lines following liposome encapsulated haemoglobin (LEH) treatment *in vitro*. *Cytokine* 8: 541–547, 1996.
99. Ziegler T, Bouzourene K, Harrison VJ, Brunner HR, and Hayoz D. Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 686–692, 1998.
100. Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, and Hassoun PM. Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 272: L897–902, 1997.

Address reprint requests to:
Dr. Patrick Menu
Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire
LEMTA-UMR 7563 IFR 111
Faculté de Médecine
Vandoeuvre-lès-Nancy, France

E-mail: patrick.menu@pharma.uhp-nancy.fr

Date of first submission to ARS Central, November 22, 2007; date of final revised submission, December 21, 2007; date of acceptance, December 25, 2007.