



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 : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.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>

1360194303

93INPL040N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
NANCY

[1] 1999 CARON, A -

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L' INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Discipline : Génie Biologique

présentée et soutenue publiquement

par

Alexis Caron

le 18 mai 1999

**MISE EN EVIDENCE PAR ULTRASONOGRAPHIE DOPPLER PULSE ET
ANALYSE DE L'EFFET VASOCONSTRICTEUR DE TROIS SOLUTIONS
D'HEMOGLOBINE HUMAINE MODIFIEE CHIMIQUEMENT**

Directeur de thèse : Pr. P. LABRUDE

JURY

M. le Professeur Michel DAUZAT, Université de Montpellier I, Rapporteur

M. le Professeur Konrad MESSMER, Université de München, Rapporteur

M. le Professeur Pierre LABRUDE, Université Henri Poincaré-Nancy 1, Directeur de thèse

M. le Docteur Patrick MENU, Université Henri Poincaré-Nancy 1, Juge

Mme le Docteur Céline MOORE, Hemosol Inc., Canada, Juge

M. le Professeur Claude VIGNERON, Université Henri Poincaré-Nancy 1, Juge

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

REMERCIEMENTS

A mes juges,

Mes plus vifs remerciements à M. le Professeur K. Messmer de l'Université Ludwig-Maximilians de München pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être rapporteur de ce travail malgré la distance et la barrière de la langue.

Mes remerciements à M. le Professeur M. Dauzat de l'Université de Montpellier I pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être rapporteur de ce travail, mais également pour sa disponibilité, ses précieux conseils et pour l'accueil chaleureux qui m'a été réservé dans son laboratoire de la Faculté de Médecine de Nîmes.

Ce mémoire est l'occasion pour moi de remercier M. le Professeur P. Labrude, directeur de thèse attentif et rigoureux, qui a su m'encourager dans mon travail durant les quatre années passées au laboratoire d'Hématologie et de Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy. A titre personnel, je lui exprime également mes plus vifs remerciements pour son soutien.

Je remercie vivement M. le Docteur P. Menu, co-directeur de thèse, pour ses précieux conseils et pour son aide dans les orientations qu'il a fallu prendre pour mener à terme ce travail. Je n'oublierai pas de saluer son optimisme et sa persévérance.

J'adresse mes remerciements à Mme le Docteur C. Moore, responsable de l'évaluation préclinique chez Hemosol Inc., Canada, pour avoir accepté de juger ce travail malgré la distance qui nous sépare.

Je tiens à exprimer tout mon respect et mes remerciements à M. le Professeur C. Vigneron, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire d'Hématologie et de Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy et m'avoir permis de mener à bien les différents projets présentés dans ce travail.

J'adresse mes remerciements à l'*Association Recherche et Transfusion* (Paris) pour son soutien qui a permis de financer en grande partie l'équipement nécessaire à la conduite de ce travail.

Je tiens à remercier la *Fondation pour la Recherche Médicale* (Paris) qui par l'intermédiaire du Prix Banque Nationale de Paris / Fondation pour la Recherche Médicale m'a permis de mener à terme le travail présenté dans la dernière partie du manuscrit.

Je remercie M. le Docteur A. Alayash du *Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration* (Bethesda, U.S.A.) pour sa collaboration scientifique et pour m'avoir fourni les lots de la solution d' $\alpha\alpha$ -hémoglobine.

Je remercie par l'intermédiaire de M. le Professeur G. Biro, la société *Hemosol Inc.* (Toronto, Canada) pour m'avoir fourni gracieusement plusieurs lots de la solution Hemolink™.

J'adresse mes remerciements à M. le Professeur P-Y. Marie, à M. le Docteur J-C. Mayer et à l'ensemble du service de Médecine Nucléaire du C.H.R.U. de Nancy-Brabois pour leur collaboration active dans la partie du travail consacrée à la détermination de la volémie.

J'exprime mes remerciements à M. le Professeur C. Doutremepuich pour m'avoir accueilli chaleureusement au laboratoire d'Hématologie de la Faculté de Pharmacie, Université Victor Segalen-Bordeaux 2 et avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire à l'étude morphodynamique.

Que Mme le Docteur E. Belougne-Malfatti et M. le Docteur O. Aguejof soient assurés de mon amitié et de ma reconnaissance pour le travail accompli en commun à Bordeaux.

Je remercie Mme le Professeur E. Dellacherie qui m'a permis de réaliser, avec la précieuse aide de Mlle le Docteur M-F. Zambaux, les analyses chromatographiques dans son laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (Nancy).

Je tiens à remercier M. M. Dubuit du *Centre Interuniversitaire de Ressources Informatiques de Lorraine* (Vandœuvre-lès-Nancy) pour son aide à la conception du logiciel de calcul de paramètres hémodynamiques utilisé dans ce travail.

Je remercie Mmes F. Paulus et M-A. Mignot pour leur gentillesse et leur aide à l'impression de ce mémoire.

Enfin, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes du laboratoire d'Hématologie et de Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy que j'ai côtoyées durant quatre années :

- mes remerciements pour sa disponibilité, ses conseils et sa collaboration à Mme le Docteur B. Faivre-Fiorina.

- en espérant n'oublier personne, il me reste un grand merci à partager entre les (ex-)anglophiles et (néo-)footeuses Marie-France, Marie et Isabelle, entre les secrétaires devenues maman ou chef d'entreprise, Géraldine et Claudine, entre Edwige, Frédérique, Isabelle, Valérie, Jean-François et Paulo, pour les bons moments passés.

*À Valentin,
même si ça manque de dinos...*



*À Fany et à mes parents,
pour leur amour et leur soutien*

Table des matières

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	3
<u>I - DE L' ERYTHROCYTE AUX TRANSPORTEURS D'OXYGENE A BASE D'HEMOGLOBINE</u>	3
1 - Origine et évolution du concept de "substitut sanguin"	3
2 - Structure et fonctions de l'hémoglobine humaine.....	5
3 - L'hémoglobine extra-érythrocytaire et les limitations à son utilisation	10
4 - Les principaux types de transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine	12
4.1 - Les modifications chimiques	13
4.2 - Les modifications génétiques.....	17
4.3 - L'hémoglobine encapsulée	18
5 - Etat d'avancement des essais cliniques et effets secondaires.....	20
<u>II - SYSTEMES DE REGULATION HEMODYNAMIQUE</u>	24
1 - Descriptions anatomique et histologique simplifiées du système cardiovasculaire	24
1.1 - Le cœur	24
1.2 - Le système artériel	24
1.3 - Les capillaires	27
1.4 - Le système veineux.....	28
2 - Pression, débit et résistance	29
2.1 - Pression sanguine.....	29
2.2 - Débit sanguin	30
2.3 - Résistance.....	30
2.4 - Relation entre pression, débit et résistance	31
3 - Régulation nerveuse	32
3.1 - L'arc baroréflexe.....	32
3.2 - Les chémorécepteurs	33
3.3 - Le réflexe ischémique central	34

4 - Système de contrôle pressioennel rénal : le système rénine-angiotensine-aldostérone	34
5 - Régulation locale par l'endothélium vasculaire	35
5.1 - Tonus vasodilatateur	35
5.1.1 - <i>Le monoxyde d'azote (NO)</i>	35
5.1.2 - <i>La prostacycline</i>	39
5.1.3 - <i>Le(s) facteur(s) hyperpolarisant dérivé(s) de l'endothélium (EDHF)</i>	39
5.2- Tonus vasoconstricteur	39
5.2.1 - <i>L'endothéline-1 (ET-1)</i>	39
5.2.2 - <i>Le système rénine-angiotensine local</i>	41
5.2.3 - <i>Les dérivés de l'acide arachidonique</i>	42
5.2.4 - <i>L'anion superoxyde</i>	42
III - <u>INTERACTIONS DE L'HEMOGLOBINE ACELLULAIRE AVEC CERTAINS ACTEURS DE LA REGULATION DU TONUS VASOMOTEUR</u>	43
1 - Interaction hémoglobine - facteurs endothéliaux	44
1.1 - Interaction de l'hémoglobine avec le monoxyde d'azote	44
1.1.1 - <i>Affinité de l'hémoglobine pour le monoxyde d'azote : bases moléculaires</i>	44
1.1.2 - <i>Affinité de l'hémoglobine pour le monoxyde d'azote : conséquences physiologiques</i>	45
1.2 - Interaction de l'hémoglobine avec le système de régulation par l'endothéline-1	47
2 - Potentialisation de la réponse α -adrénergique vasculaire par l'hémoglobine acellulaire	48
3 - Solutions d'hémoglobine et tonus microcirculatoire.....	49
4 - Conclusion.....	50
IV - <u>PRINCIPAUX MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DE L'ACTION DE L'HEMOGLOBINE DANS LE COMPARTIMENT VASCULAIRE</u>	51
1 - Techniques <i>in vitro</i>	51
1.1 - Vaisseaux isolés immergés	51

1.2 - Vaisseaux isolés perfusés.....	52
2 - Mesure de la pression artérielle.....	53
3 - Mesure du débit sanguin	54
3.1 - Technique des microsphères	54
3.2 - Ultrasonographie Doppler pulsé	55
3.3 - Débit sanguin microcirculatoire mesuré par laser-Doppler	58
3.4 - Débit sanguin microcirculatoire mesuré par analyse en microscopie intravitale.....	58
4 - Conclusion.....	59

PARTIE EXPERIMENTALE	60
-----------------------------------	----

<u>I - INTRODUCTION A LA PARTIE EXPERIMENTALE</u>	60
---	----

1 - La situation du sujet au laboratoire	60
2 - Etude préliminaire des effets hémodynamiques induits par des solutions d'hémoglobine acellulaire par ultrasonographie Doppler pulsé chez le cobaye anesthésié.....	61
3 - Améliorations à apporter au modèle.....	62
3.1 - Choix de la solution témoin	62
3.2 - Choix du modèle d'hémodilution	63
3.3 - Choix des vaisseaux et des paramètres étudiés	64
3.4 - Choix de l'anesthésique	66
4 - Annexe 1.....	66

<u>II - DESCRIPTION DU MODELE EXPERIMENTAL DE BASE</u>	82
--	----

1 - Animaux	82
2 - Anesthésie et préparation des animaux	82
3 - Procédure opératoire et appareillage des animaux	82
4 - Mesure des paramètres et acquisition des données	84
4.1 - Pression artérielle.....	84
4.2 - Vitesse sanguine aortique.....	84
4.3 - Diamètre aortique et coefficient de distensibilité.....	85

4.4 - Acquisition des données.....	86
5 - Caractérisation du modèle expérimental	87
6 - Application du modèle à l'étude des effets d'un agent vasoconstricteur, le L-NAME.....	89
7 - Annexe 2.....	90

III - ADAPTATION DU MODELE A L'ETUDE DES EFFETS CARDIOVASCULAIRES INDUITS PAR DES SOLUTIONS

D'HEMOGLOBINE EN SITUATION D'HEMODILUTION 100

1 - Mise au point des techniques de mesure de vitesse sanguine et de diamètre vasculaire au niveau périphérique.....	100
1.1 - L'artère mésentérique supérieure.....	100
1.2 - L'artère fémorale.....	103
1.3 - L'artère rénale.....	103
2 - Principe de l'hémodilution isovolémique par échange transfusionnel partiel	104
3 - Acquisition en temps réel et analyse <i>a posteriori</i> des paramètres biochimiques et hémodynamiques.....	105
3.1 - Paramètres biochimiques	105
3.1.1 - <i>Mesure des gaz du sang artériel</i>	105
3.1.2 - <i>Mesure des concentrations des différentes formes d'hémoglobine sanguine et plasmatique</i>	105
3.1.3 - <i>Mesure de l'hématocrite artériel</i>	106
3.2 - Paramètres hémodynamiques.....	106
3.3 - Découpage du protocole expérimental.....	108
4 - Application du modèle à l'étude des effets induits par une solution d'hémoglobine	108
4.1 - Evolution des paramètres biochimiques	109
4.2 - Evolution des paramètres hémodynamiques.....	110

IV - ETUDE COMPARATIVE DES EFFETS CARDIOVASCULAIRES INDUITS PAR TROIS SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE HUMAINE

MODIFIEE CHIMIQUEMENT 113

1 - Caractéristiques physico-chimiques des solutions d'hémoglobine perfusées	113
--	-----

1.1 - L'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracarboxylate ou Hb-Dex-BTC.....	113
1.2 - L'hémoglobine $\alpha\alpha$ -pontée ou $\alpha\alpha$ -Hb.....	114
1.3 - L'hémoglobine pontée polymérisée ou HemoLink™.....	115
2 - Analyse chromatographique des solutions d'hémoglobine perfusées.....	119
3 - Caractéristiques physico-chimiques des solutions de référence.....	120
3.1 - La solution d'albumine sérique humaine.....	121
3.2 - La solution d'hydroxyéthylamidon Elohès® 6%.....	121
4 - Conditions expérimentales.....	122
4.1 -Répartition des individus au sein des groupes expérimentaux.....	122
4.2 - Traitement statistique.....	123
5 - Données biochimiques sanguines et plasmatiques.....	123
5.1 - Les paramètres sanguins.....	123
5.1.1 - <i>L'hématocrite artériel</i>	123
5.1.2 - <i>Les gaz du sang</i>	125
5.1.3 - <i>L'hémoglobine totale circulante</i>	127
5.2 - Les paramètres plasmatiques.....	129
5.2.1 - <i>Analyse quantitative de l'élimination de l'hémoglobine par co-</i> <i>oxymétrie</i>	129
5.2.2. <i>Analyse qualitative par HPLC de l'élimination de l'hémoglobine</i> ...	132
6 - Données hémodynamiques.....	134
6.1 - La pression artérielle.....	134
6.2 - La fréquence cardiaque.....	135
6.3 - La vitesse sanguine aortique.....	136
6.4 - La résistance périphérique.....	137
6.5 - La vitesse sanguine rénale.....	138
6.6 - La vitesse artérielle fémorale.....	139
7 - Paramètres du tonus vasculaire.....	140
7.1 - Le coefficient de distensibilité aortique.....	140
7.2 - L'indice de pulsatilité.....	143
8 - Conclusion.....	144
9 - Annexe 3.....	145

V - APPROCHES EXPERIMENTALES DES MECANISMES RESPONSABLES
DE LA VASOACTIVITE INDUITE PAR LES SOLUTIONS

<u>D'HEMOGLOBINE</u>	161
1 - Influence de deux solutions d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC et $\alpha\alpha$ -Hb) sur la volémie en situation d'hémodilution chez le lapin	162
1.1 - Théorie	163
1.2 - Matériels et méthodes	164
1.2.1 - Solution de sérumalbumine marquée à l'iode et matériel de mesure de la radioactivité.....	164
1.2.2 - Préparation des animaux	164
1.2.3 - Adaptation et validation de la méthode.....	165
1.3 - Application de la méthode à la mesure de la volémie faisant suite à une hémodilution avec Hb-Dex-BTC.....	168
1.4 - Evolution de la volémie dans le temps à la suite d'une hémodilution avec Hb-Dex-BTC ou avec $\alpha\alpha$ -Hb.....	169
1.5 - Conclusions.....	171
1.5.1 - Sur la méthode.....	171
1.5.2 - Sur les données.....	172
2 - Comportement rhéologique de trois solutions d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC, $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™) en situation d'hémodilution chez le lapin	173
2.1 - Rappels d'hémorhéologie	173
2.2 - Matériels et méthodes	175
2.2.1 - Appareils de mesure de la viscosité	175
2.2.2 - Appareil de mesure de l'agrégabilité des globules rouges	176
2.2.3 - Appareil de mesure de la déformabilité des globules rouges	177
2.2.4 - Protocole expérimental	177
2.3 - Résultats.....	178
2.3.1 - Agrégabilité érythrocytaire.....	178
2.3.2 - Déformabilité érythrocytaire.....	179
2.3.3 - Viscosité cinématique.....	180
2.3.4 - Viscosité dynamique.....	181
2.4 - Conclusions	182

3. - Interaction d'une solution d'hémoglobine modifiée (Hb-Dex-BTC) avec l'endothélium vasculaire, mise en évidence par une méthode immunohistochimique chez le cobaye.....	184
3.1 - Matériels et méthodes	184
3.2 - Résultats.....	185
3.3 - Conclusions.....	185
4. - Influence de trois solutions d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC, $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™), mise en évidence par une étude morphodynamique sur des artérioles mésentériques de rat	186
4.1 - Description du modèle expérimental	186
4.2 - Résultats.....	189
4.3 - Conclusions.....	190
5 - Annexe 4 : article.....	191

DISCUSSION GENERALE	197
Annexe 5 : article.....	209

CONCLUSION	212
-------------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	213
--	-----

Liste des articles du candidat cités en référence

CARON A, MENU P, FAIVRE B, LABRUDE P, VIGNERON C. Mesure par ultrasonographie Doppler pulsé des effets vasoactifs de l'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracboxylate, substitut érythrocytaire potentiel. *Transfus.Clin. Biol.* 1995;2(6):453-462.

CARON A, MENU P, LABRUDE P, VIGNERON C. Proposition of a technique to assess the vasoactive effects of hemoglobin-based oxygen carrying solutions in vivo : preliminary results in the rabbit aorta. *Artif.Cells Blood Subst.Immob.Biotechnol.* 1998;26(3):293-308.

FAIVRE-FIORINA B, CARON A, LABRUDE P, VIGNERON C. Les hémoglobines érythrocytaires, plasmatiques et substitutives face aux agents oxydants et réducteurs physiologiques. *Ann.Biol.Clin.* 1998;56(4):545-556.

CARON A, MENU P, FAIVRE-FIORINA B, LABRUDE P, VIGNERON C. The effects of stroma-free and dextran-conjugated hemoglobin on hemodynamics and carotid blood flow in hemorrhaged guinea pigs. *Artif.Cells Blood Subst.Immob.Biotechnol.* 1999;27(1):49-64.

CARON A, MENU P, FAIVRE-FIORINA B, LABRUDE P, ALAYASH AI, VIGNERON C. Cardiovascular and hemorheological effects of three chemically-modified human hemoglobin in hemodiluted rabbits. *J.Appl.Physiol.* 1999;86(2):541-548.

FAIVRE-FIORINA B, CARON A, FASSOT C, FRIES I, LABRUDE P, VIGNERON C. Exchange transfusion with a hemoglobin solution in guinea pig : evidence for the presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 1999;276(45):H766-H770.

MENU P, CARON A, FAIVRE-FIORINA B, STOLTZ J-F. Possible effects of hemoglobin solutions on blood components. *Transfusion* 1999;39(2): 226.

Introduction

INTRODUCTION

Au cinquième siècle avant notre ère, le philosophe grec Empédocle d'Agrigente écrivait : "le principe de la vie est le sang". Les connaissances actuelles sur la complexité structurale et fonctionnelle de ce tissu essentiel à l'homéostasie confirment le bien fondé de cette théorie millénaire. Les globules rouges en suspension dans le plasma œuvrent à l'une des missions vitales du sang, l'apport d'oxygène aux tissus. La transfusion de sang est aujourd'hui encore le seul moyen de pallier efficacement à une altération de l'oxygénation qui caractérise des états pathologiques tels que le choc hypovolémique ou l'anémie. Toutefois ce traitement s'accompagne inévitablement de risques de contamination, en particulier virale, et d'incompatibilité immunologique entre donneur et receveur. De plus, du fait de la durée de vie limitée des globules rouges à l'issue de leur prélèvement, l'approvisionnement en sang ne suffit que difficilement à l'heure actuelle à subvenir aux besoins transfusionnels.

Pour résoudre ces limites, des alternatives à la transfusion sanguine ont fait l'objet de recherches intensives depuis la fin du siècle dernier et elles se poursuivent encore aujourd'hui. L'une des voies les plus abouties est celle de solutions injectables préparées à partir d'hémoglobine issue de globules rouges arrivés à péremption. En 1998, l'un de ces produits, appelés transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine ou HBOCs (hemoglobin-based oxygen carriers), a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis, pour le traitement de l'anémie chez le chien. Les HBOCs faisant l'objet d'essais cliniques sont aujourd'hui au nombre de sept et, pour chacun d'entre eux, la survenue d'effets secondaires plus ou moins marqués et transitoires reste un écueil à surmonter. La compréhension de ces effets et la possibilité de les corriger conditionnent l'utilisation à grande échelle des HBOCs et les retombées économiques qu'ils pourraient générer. Parmi ces effets secondaires, nous nous sommes particulièrement intéressés à ceux qui affectent le système cardiovasculaire en perturbant l'équilibre hémodynamique et notamment en augmentant la pression artérielle.

Dans ce travail, nous avons évalué, au moyen de l'ultrasonographie Doppler pulsé, les effets hémodynamiques induits par trois solutions d'hémoglobine humaine modifiée chimiquement, deux étant en essais cliniques (une hémoglobine pontée, ou $\alpha\alpha$ -Hb, et une hémoglobine pontée et polymérisée, ou Hemolink™) et l'une en évaluation préclinique

(hémoglobine conjuguée au dextran-benzène-tétracarboxylate, ou Hb-Dex-BTC). Cette étude a été réalisée chez le lapin anesthésié, dans un modèle d'hémodilution isovolémique qui constitue une application potentielle des HBOCs. Après avoir mis en évidence l'effet presseur de ces trois produits, nous avons cherché à comprendre par quels mécanismes ils exercent leur action. Dans ce but, nous avons eu recours à divers modèles d'investigation permettant notamment de mettre en évidence les interactions de l'hémoglobine avec la cellule endothéliale *in vivo* et d'apprécier les effets des solutions sur la volémie, sur les propriétés rhéologiques du sang et sur le tonus vasomoteur dans la microcirculation.

Après un rappel bibliographique concernant les HBOCs et les différents moyens techniques permettant de montrer et d'analyser leurs effets dans le compartiment cardiovasculaire, nous exposerons nos résultats expérimentaux. Dans un premier temps, nous décrirons les résultats montrant l'effet vasoconstricteur des trois solutions d'hémoglobine testées. Dans un deuxième temps, nous présenterons les moyens expérimentaux utilisés pour tenter de comprendre les mécanismes par lesquels les HBOCs modifient l'hémodynamique. La dernière partie de ce manuscrit sera consacrée à la discussion et à la confrontation de nos résultats aux connaissances actuelles des divers facteurs susceptibles d'expliquer les effets induits par les HBOCs dans le système cardiovasculaire.

Partie bibliographique

I - DE L'ERYTHROCYTE AUX TRANSPORTEURS D'OXYGENE A BASE D'HEMOGLOBINE

1 - Origine et évolution du concept de "substitut sanguin"

L'idée de l'élaboration d'un "substitut sanguin" à visée transfusionnelle remonte à plusieurs décennies. Dans la perspective de permettre un remplacement temporaire de la fonction oxyphorique des hématies en cas d'hémorragie importante et quand la transfusion de sang total n'est pas possible techniquement, les recherches se sont orientées vers la séparation du plasma et des cellules sanguines. L'administration de plasma, conservé sous forme sèche et reconstitué extemporanément dans l'eau distillée, fut le palliatif proposé durant la Seconde Guerre mondiale par l'armée américaine. Après la guerre, la recherche dans le domaine s'est développée, en particulier à l'initiative des services de santé des armées de différentes nations. Plus tard, la prise de conscience des risques de contamination liés à la transfusion sanguine vint ajouter aux attentes militaires en matière de "substitut sanguin" (Sloand AM., 1997). Toutefois, au regard de la multiplicité des fonctions du sang, le terme ambitieux de "substitut sanguin" fut progressivement abandonné au profit de celui, plus modeste, de "transporteur d'oxygène".

Aujourd'hui, l'intérêt médical et commercial d'un tel produit est devenu considérable du fait :

- d'une part, de l'augmentation des besoins en sang, liée au vieillissement de la population et donc au nombre croissant d'interventions chirurgicales pratiquées. En 1990, environ 12 millions d'unités de sang ont été transfusées aux Etats-Unis, dont la moitié à des personnes âgées de plus de 65 ans. En 2030, on estime la demande en sang à plus de 19 millions d'unités par an, avec environ 12 millions d'unités transfusées aux personnes de plus de 65 ans (figure 1 ; Dietz NM. *et al.*, 1996). En France, une transfusion est pratiquée toutes les dix secondes environ, et 3,15 millions d'unités de sang sont consommées annuellement ; aussi les besoins en sang sont estimés aujourd'hui à 8000 dons quotidiens (chiffres émanant de l'Agence Française du Sang).
- et, d'autre part, de la diminution du nombre des dons du sang. En se basant sur la fréquence de transfusion de sang aux Etats-Unis, estimée à 1 unité pour 20 personnes par an, et sur le nombre d'unités collectées par an dans le monde, estimée à 90 millions, le manque global annuel minimal serait de 135 millions d'unités (R. Winslow, XII^{ème} Congrès ISABI, Beijing, Chine, Septembre 1997).

Dans ce contexte, l'apport des transporteurs d'oxygène pourrait s'avérer essentiel à condition que les critères de sécurité transfusionnelle, d'efficacité et de coût soient remplis.

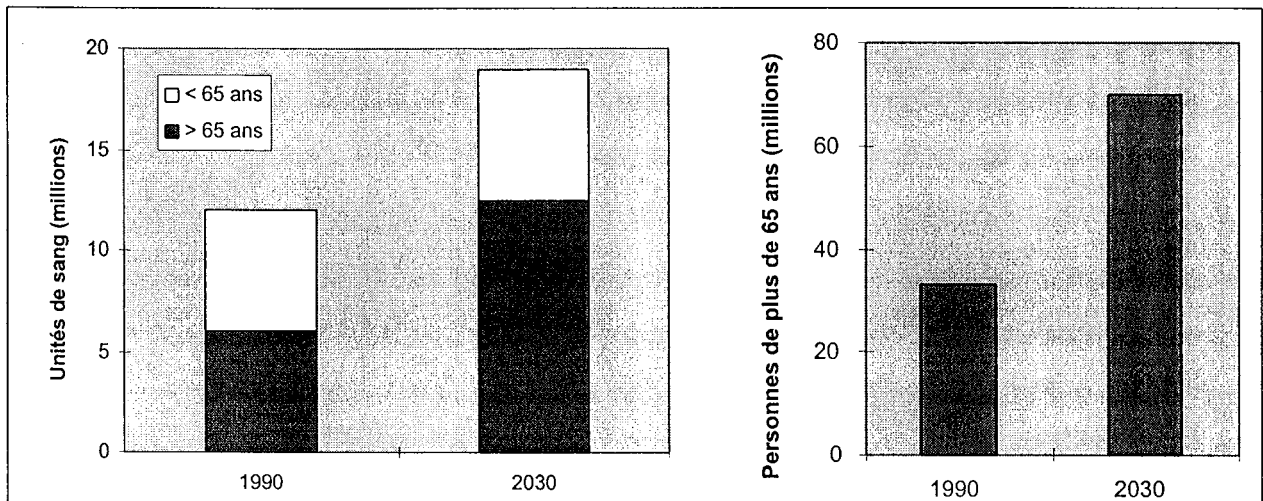


Figure 1. Estimation de l'effet du vieillissement de la population sur les besoins en transfusion aux États-Unis. D'après Dietz NM. *et al.*, 1996.

La mise au point d'un transporteur d'oxygène défini comme un substitut plasmatique à capacité oxyphorique est régie par un cahier des charges précisant les impératifs auxquels doivent répondre les candidats à cette fonction (Center for Biologics Evaluation and Research, 1994). Ces conditions peuvent être décrites comme suit :

- produit parfaitement purifié ;
- non toxique ;
- non antigénique ;
- iso-oncotique au plasma ;
- efficacité pour le transport et la cession de l'oxygène : affinité pour l'oxygène similaire à celle des globules rouges ;
- de durée de vie prolongée dans l'organisme ;
- conservation : produit stable (idéalement à température ambiante).

Deux types de produits pouvant répondre à ces impératifs sont en développement : les émulsions de perfluorocarbure, produits de synthèse, dans lesquelles l'oxygène est dissous, et les solutions à base d'hémoglobine dans lesquelles l'oxygène est lié de manière covalente.

Les perfluorocarbures sont obtenus par substitution complète des atomes d'hydrogène d'hydrocarbures par des atomes de fluor suivie d'une mise en émulsion en trois phases. Ces composés sont chimiquement inertes et possèdent une forte capacité de dissolution de certains

gaz dont l'oxygène et le dioxyde de carbone. Leur pouvoir oxyphorique n'est effectif que pour de fortes pressions partielles en oxygène ce qui réduit considérablement le champ de leur utilisation. De plus, des problèmes de conservation et de radio-opacité des produits persistent. Plusieurs solutions de perfluorocarbure, dont Oxygent™ (Alliance Pharmaceutical Corp., USA) et Oxyfluor™ (HemaGen/PFC, USA) font l'objet d'essais cliniques. Ce sujet ne sera pas développé dans ce travail, mais l'on pourra se référer à divers articles de synthèse (Dietz NM. *et al.*, 1996 ; Sakas DE. *et al.*, 1996 ; Riess JG., 1998).

Le second type de solutions présente l'intérêt d'utiliser un transporteur d'oxygène d'origine naturelle, l'hémoglobine contenue dans les globules rouges. L'idée de ce principe est déjà ancienne puisqu'en 1870, Paul Bert suggéra d'utiliser l'hémoglobine en solution à des fins transfusionnelles. C'est en 1934 que furent publiés des travaux relatant l'injection d'hémoglobine bovine en solution chez le mouton dans un modèle d'exsanguino-transfusion totale (Scott MG *et al.*, 1997). Depuis, de nombreux groupes de chercheurs militaires puis civils se sont attachés à mettre au point un transporteur d'oxygène à base d'hémoglobine injectable à l'homme. D'un point de vue logistique, l'utilisation de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges permet de valoriser les poches de sang périmé recueillies par les établissements de transfusion sanguine confrontés de nos jours à des problèmes d'approvisionnement de plus en plus sérieux. Toutefois, l'extraction de l'hémoglobine des globules rouges induit des changements de ses propriétés physico-chimiques nécessitant la mise en œuvre de modifications de la protéine afin de maintenir sa fonctionnalité. Avant de décrire ces modifications, nous allons envisager la structure et les fonctions de l'hémoglobine humaine.

2 - Structure et fonctions de l'hémoglobine humaine

L'hémoglobine (Hb) humaine est une protéine tétramérique de 64,5 kD constituée de quatre sous-unités identiques deux à deux, associées par des interactions ioniques. Les sous-unités α sont formées de 141 acides aminés et les sous-unités β de 146 acides aminés. Chaque sous-unité (ou globine) renferme un site actif de liaison de l'oxygène (O_2), l'hème, dans une poche hydrophobe (figure 2). L'hème est constitué de protoporphyrine IX et d'un atome de fer qui, à l'état réduit (Fe^{2+}) est capable de fixer l' O_2 au niveau pulmonaire et de le transporter jusqu'aux tissus (Rosa J. *et al.*, 1993). Chaque molécule d'hémoglobine peut fixer quatre molécules d' O_2 (une par atome de fer) pour former l'oxyhémoglobine.

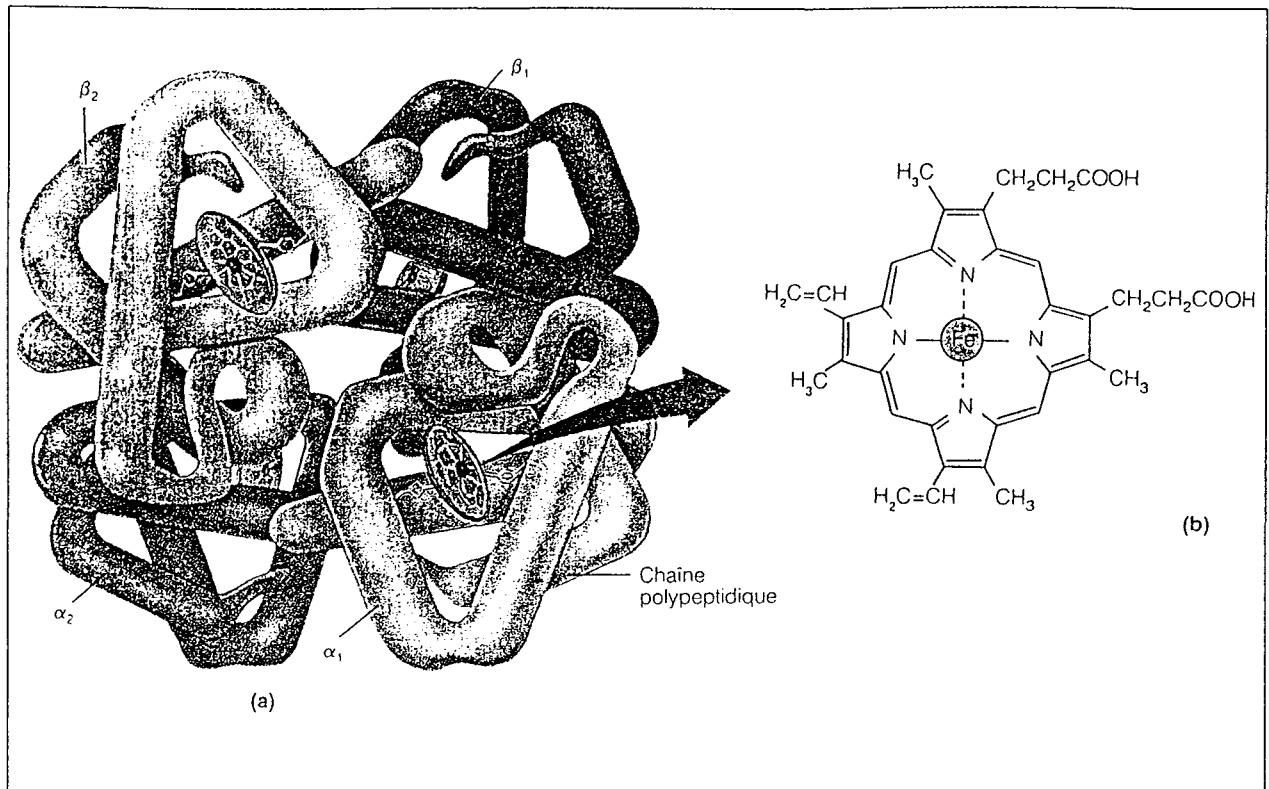


Figure 2. Structure de l'hémoglobine humaine.

(a) Molécule d'hémoglobine composée de quatre sous-unités formant la globine et d'hème.

(b) Structure du groupement hème. D'après Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines, 2^e édition, Ed. De Boeck Université, 1993, p 582.

Les propriétés oxyphoriques de l'hémoglobine sont liées à l'existence des deux types de chaînes (α et β) dans la même molécule. En effet, au cours de la fixation d' O_2 (état relâché ou R de l'hémoglobine) ou de la libération d' O_2 (état tendu ou T), les chaînes α font une rotation autour des chaînes β avec glissement les unes sur les autres. Lors du passage de la forme désoxy- à la forme oxyhémoglobine, les dimères $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$ subissent peu de modifications, mais ils se déplacent l'un par rapport à l'autre par rotation d'un angle θ de 12 à 15° (figure 3). Dans la structure oxygénée de l'hémoglobine, l'atome de fer offre 6 liaisons de coordinence : 4 interviennent dans la structure de l'hème, la cinquième amarre le fer à une histidine dite proximale et la sixième fixe la molécule d'oxygène. Sous cette forme oxygénée, l'atome de fer hexa-coordiné est ramené dans le plan de l'hème (figure 4).

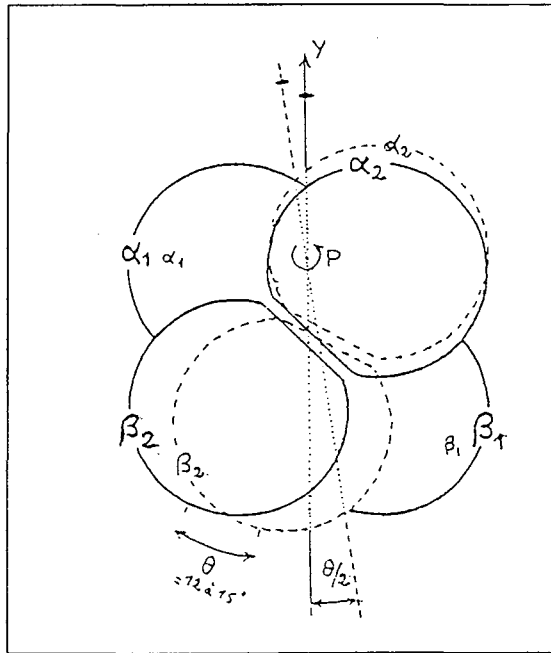


Figure 3. Changement de structure quaternaire de l'hémoglobine lors du passage de la forme désoxygénée à la forme oxygénée. D'après Heslot H. L'ingénierie des protéines et ses applications, Ed. Lavoisier Tec & Doc, 1997, p. 192.

La libération de l'O₂ est modulée par la pression partielle en oxygène (PO₂) et par l'affinité de l'hémoglobine pour la molécule. Cette affinité est régulée par un effecteur allostérique, le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG), contenu dans une poche située entre les sous-unités β₁ et β₂. Lorsque le 2,3-DPG en sort, l'O₂ peut se fixer sur le fer et y rester. Lorsque le 2,3-DPG pénètre, l'O₂ est libéré dans les tissus et l'hémoglobine se charge alors en dioxyde de carbone (CO₂) rejeté par ceux-ci pour l'acheminer aux poumons où il sera expiré. Ainsi, au niveau pulmonaire où la PO₂ avoisine les 100 mm Hg, la saturation de l'hémoglobine en oxygène est proche de 100% (sang oxygéné), tandis qu'au niveau tissulaire où la PO₂ est d'environ 40 mm Hg, l'hémoglobine est saturée à 75% environ (sang veineux). L'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est définie sur la courbe de Barcroft (figure 5) comme la valeur de PO₂ pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50% (P₅₀). Celle-ci est de 26 à 28 mm Hg pour l'hémoglobine intra-érythrocytaire.

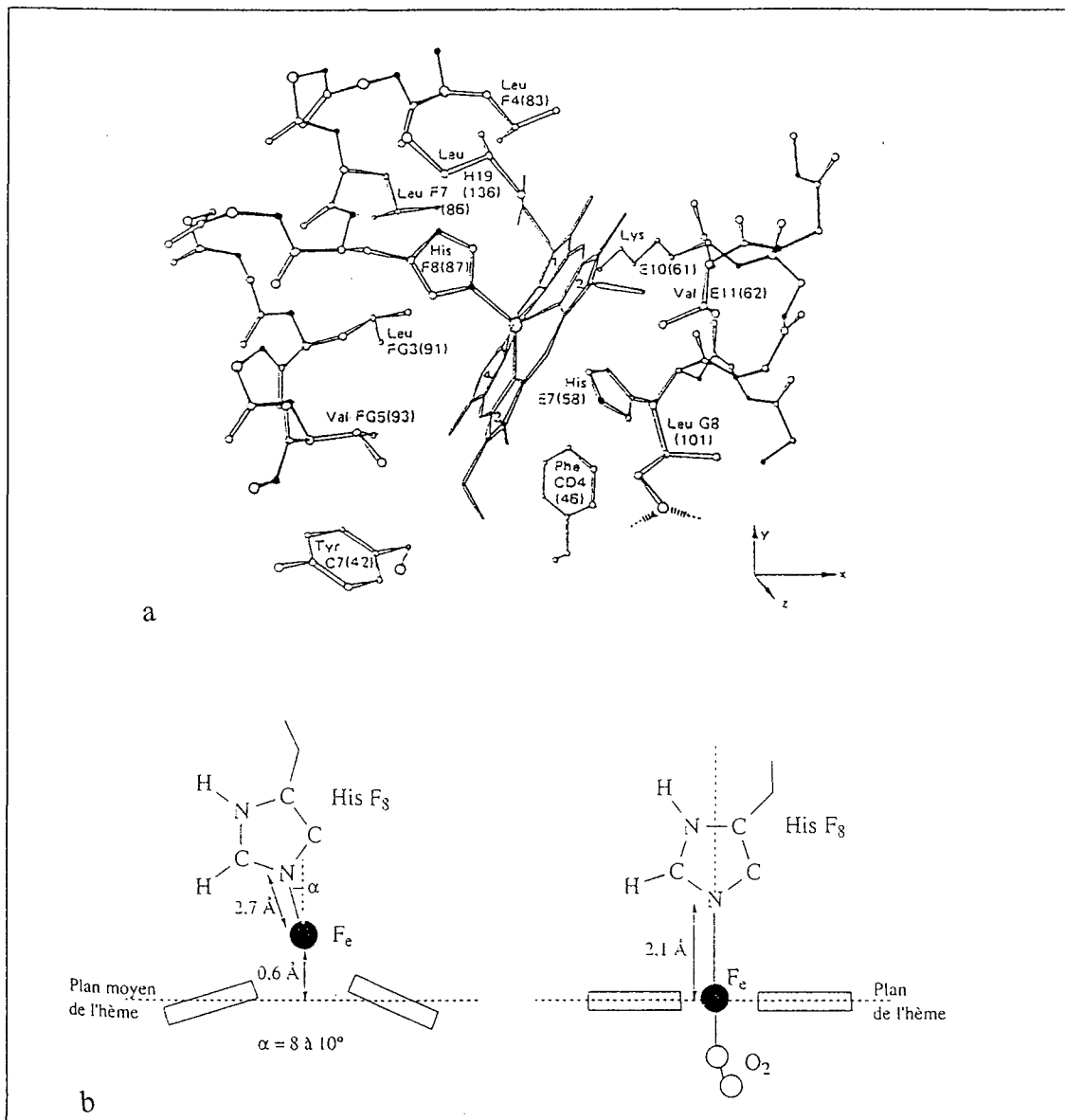


Figure 4. Fixation de l'oxygène sur l'hème.

a. Structure de l'hème dans une sous-unité α de l'hémoglobine.

b. Modification de la géométrie de l'hème lors de la fixation de la molécule d'oxygène.

D'après Heslot H. L'ingénierie des protéines et ses applications, Ed. Lavoisier Tec & Doc, 1997, p 193.

Outre cette fonction oxyphorique, l'hémoglobine assure en partie le transport du CO₂ et des protons (H⁺). Le CO₂ libéré par les cellules pénètre dans les hématies pour y être transformé en acide carbonique (H₂CO₃) qui se dissocie en H⁺ + HCO₃⁻. L'hémoglobine se lie aux ions H⁺ (effet Bohr) et les ions hydrogénocarbonates HCO₃⁻ regagnent le plasma où ils sont facilement dissous pour être transportés jusqu'aux poumons. La PO₂ élevée favorise la dissociation Hb-H⁺ pour former l'oxyhémoglobine (HbO₂). Les H⁺ libérés réagissent alors avec les ions hydrogénocarbonate dissous pour donner de l'eau et du CO₂ qui sera expiré. Ainsi, par capture des ions H⁺, l'hémoglobine permet aux ions HCO₃⁻ plasmatiques de

capturer d'autres H^+ provenant d'autres phénomènes. Elle empêche ainsi des trop fortes modifications de pH par son effet tampon.

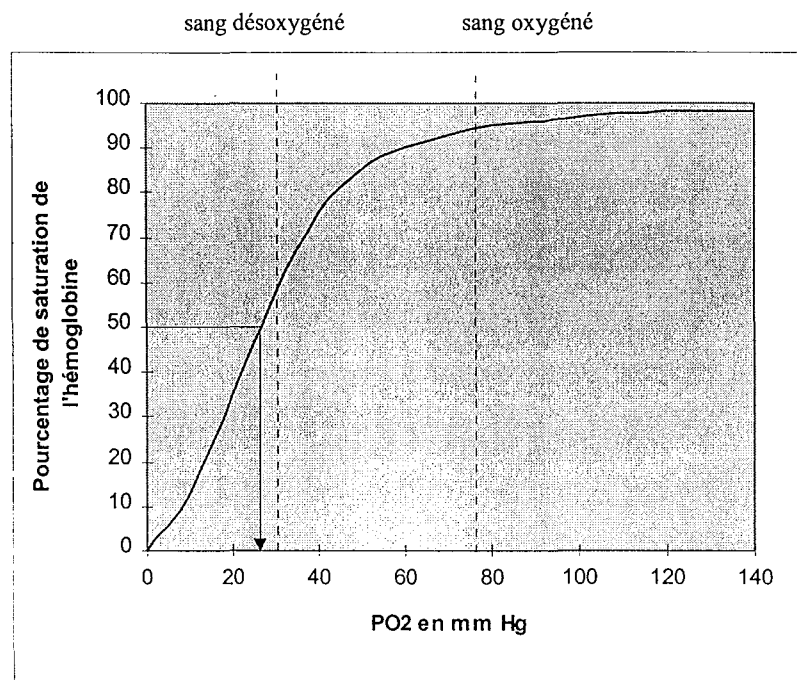


Figure 5. Courbe de Barcroft ou courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine, représentant le pourcentage d'hémoglobine ayant fixé l'oxygène en fonction de la pression partielle en oxygène (PO_2) exprimée en mmHg.

En plus de cette fonction de transport des gaz respiratoires, l'hémoglobine possède un rôle de transport et de relargage du monoxyde d'azote ou NO, molécule assurant la relaxation des cellules musculaires lisses dans le système cardio-vasculaire. Elle contribue par ce biais à la régulation du tonus vasculaire basal (voir paragraphe *Régulation locale par l'endothélium vasculaire*). La liaison de NO à l'hémoglobine s'effectue par l'intermédiaire des fonctions thiol des résidus cystéine en position β^{93} (β^{93} Cys), et est liée au fonctionnement allostérique de la protéine. En effet, lors du passage alvéolaire, le sang s'enrichit en oxygène et l'hémoglobine est alors en conformation relâchée (forme R) permettant aux résidus β^{93} Cys hautement réactifs de se charger en NO. Au niveau capillaire, la libération de l'oxygène modifie la conformation de l'hémoglobine qui passe alors sous forme tendue (forme T) et change donc l'environnement des résidus β^{93} Cys, permettant ainsi la libération de NO qui va exercer son effet vasodilatateur (figure 6). C'est à l'équipe de J. Stamler que l'on doit la récente théorie de l'adaptation des débits sanguins locaux aux besoins en oxygène par l'hémoglobine S-nitrosylée (Jia L. *et al.*, 1996 ; Poyart C. *et al.*, 1996 ; Stamler JS. *et al.*, 1997), théorie qui n'a toutefois pas été confirmée par d'autres équipes.

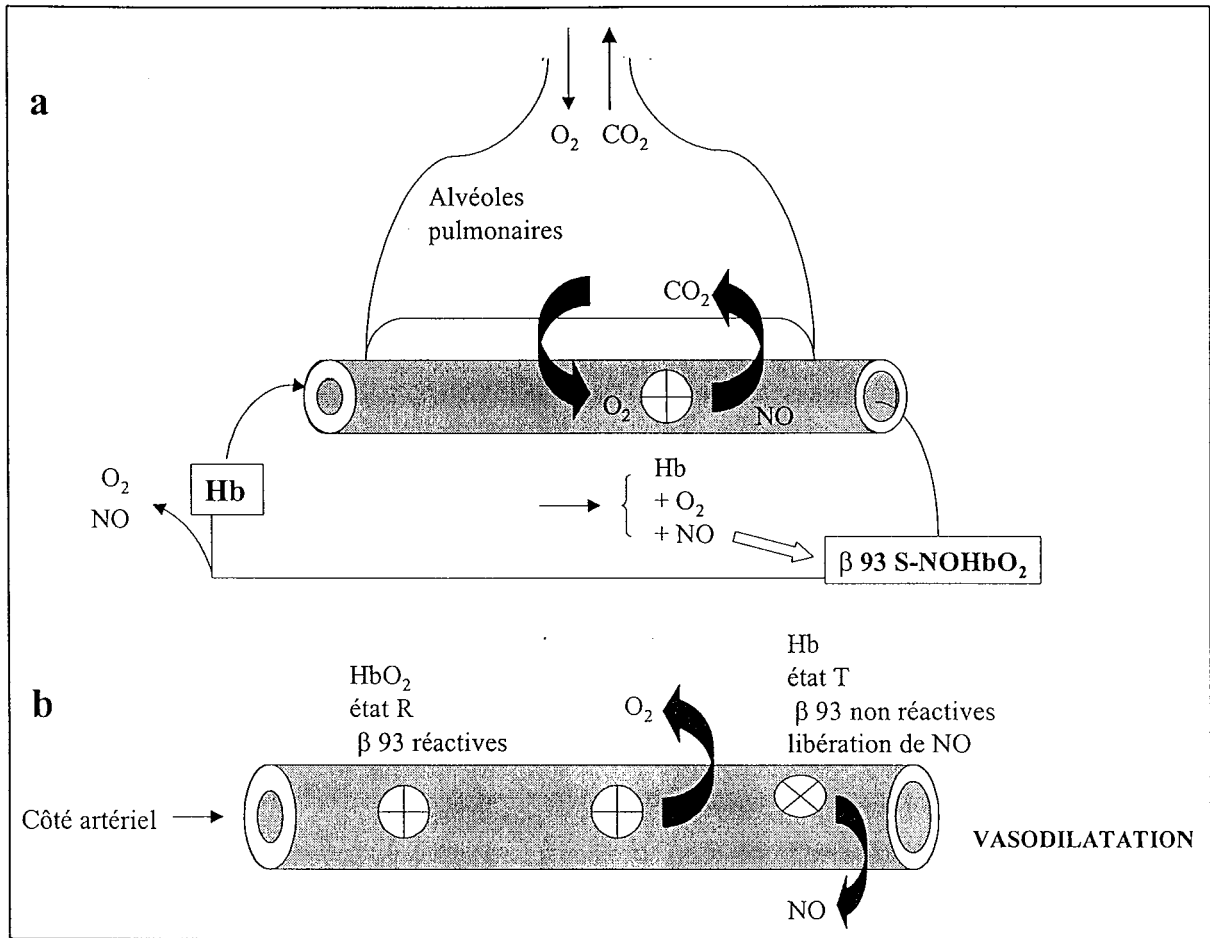


Figure 6. Représentation schématique du transport du monoxyde d'azote par l'hémoglobine le long du gradient d'oxygène. **a** : fixation au niveau alvéolaire, **b** : libération au niveau capillaire. D'après Poyart C. et Bursaux E., 1996.

Hb : hémoglobine; *NO* : monoxyde d'azote; *O₂* : oxygène moléculaire; *CO₂* : dioxyde de carbone; *β93 S-NOHb* : S-nitrosohémoglobine.

L'extraction de l'hémoglobine du globule rouge en vue de son utilisation en solution conduit à des modifications de ses propriétés physiologiques que nous allons décrire.

3 - L'hémoglobine extra-érythrocytaire et les limitations à son utilisation

L'extraction de l'hémoglobine du globule rouge modifie les propriétés physiologiques de la protéine d'où découlent au moins cinq problèmes majeurs (Everse J. *et al.*, 1997) :

- L'hémoglobine extra-érythrocytaire se fragmente en dimères et monomères qui sont rapidement filtrés et éliminés par les glomérules rénaux. De plus, du fait de leur petite taille, ces dimères et monomères peuvent facilement traverser l'endothélium capillaire par extravasation. Ces mécanismes réduisent la persistance intra-vasculaire de l'hémoglobine acellulaire et font que sa demi-vie (2 à 4 heures chez les animaux) ne correspond pas aux critères requis pour que la solution soit injectable.

- A l'intérieur du globule rouge, le 2,3-DPG est présent en forte concentration et régule l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Lors de la dimérisation de la protéine et en l'absence de la membrane érythrocytaire, le 2,3-DPG, composé de petite taille, est éliminé. L'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est alors considérablement accrue et se traduit par un relargage de l'oxygène peu efficace au niveau tissulaire. La P_{50} pour l'hémoglobine extra-érythrocytaire passe ainsi de 26 à 15 mm Hg environ (Dietz NM. *et al.*, 1996).

- La concentration d'hémoglobine acellulaire en solution ne peut excéder 70 g/L afin de respecter une pression oncotique physiologique. Toutefois, cette concentration est trop faible par rapport à la valeur normale d'hémoglobine qui varie chez l'homme de 130 à 180 g/L (Everse J. *et al.*, 1997).

- L'hémoglobine extraite du globule rouge subit une oxydation de ses atomes de fer qui passent alors à l'état ferrique (Fe^{3+}). Cette forme oxydée de l'hémoglobine est baptisée méthémoglobine (metHb) et est impropre au transport de l'oxygène. Dans le globule rouge, l'oxydation de l'hémoglobine est compensée par un mécanisme de réduction visant à rétablir la fonctionnalité de la protéine (figure 7). Ceci s'effectue par voie enzymatique grâce à la NADH-méthémoglobine réductase (EC 1.6.2.2). La perte de ce système enzymatique lors de l'extraction de l'hémoglobine du globule rouge entraîne une oxydation importante de la protéine en solution qui s'accompagne d'une production de radicaux libres oxygénés toxiques (voir publication jointe en annexe 3).

- L'hémoglobine possède naturellement une très forte affinité pour le monoxyde d'azote qui se lie aux atomes de fer (Fe^{2+}) de l'hème (Gibson QH. *et al.*, 1957). En présence d'oxygène, le composé formé, la nitrosohémoglobine, est transformé rapidement en metHb. Dans le globule rouge, le système de réduction décrit précédemment permet de régénérer en permanence de l'hémoglobine fonctionnelle (figure 7). Dans le cas des solutions d'hémoglobine extra-érythrocytaire, le piégeage de NO par l'hème conduit d'une part à une forte production de metHb, et d'autre part, à une inhibition de la fonction vasodilatatrice de NO (Iwamoto J. *et al.*, 1993 ; Alayash AI. *et al.*, 1993 ; Katsuyama SS. *et al.*, 1994).

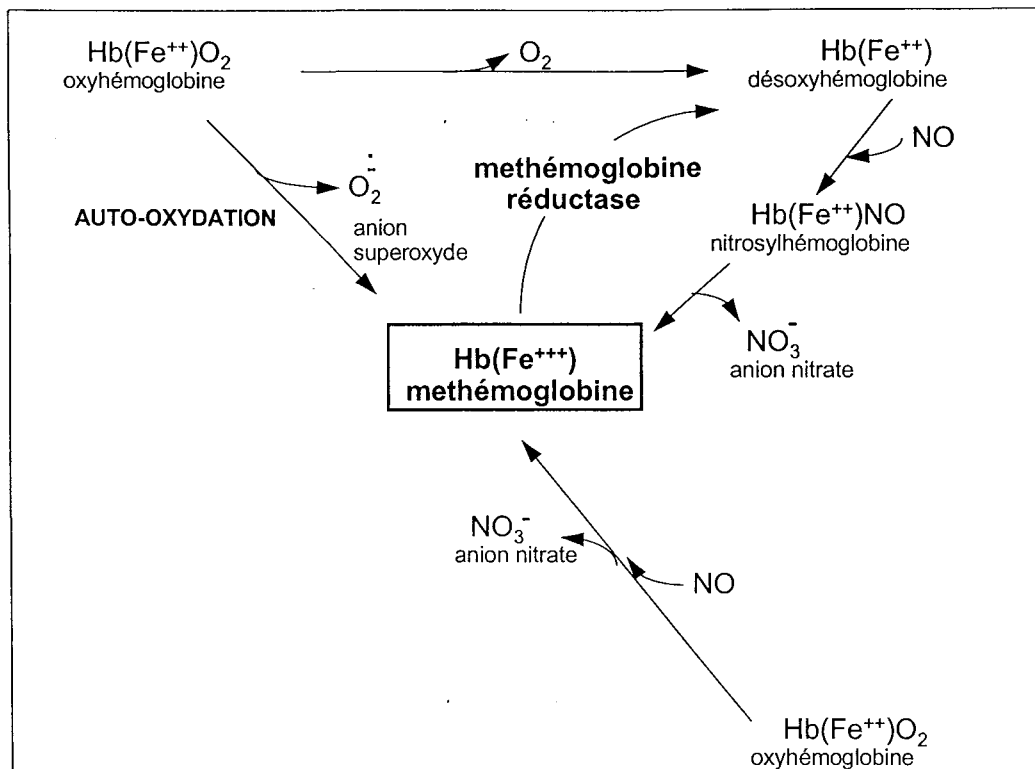


Figure 7. Réactions aboutissant à la formation de méthémoglobine dans le globule rouge. A gauche : mécanismes d'auto-oxydation et de réduction par la NADH-méthémoglobine réductase (EC 1.6.2.2.). A droite : réactions avec le monoxyde d'azote, NO.

Afin de s'affranchir de ces difficultés et de mettre au point une solution aux caractéristiques physico-chimiques requises pour une utilisation clinique, différentes approches ont été envisagées pour modifier chimiquement ou génétiquement la protéine. Nous allons envisager les modifications les plus couramment décrites dans le paragraphe suivant.

4 - Les principaux types de transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine

Les modifications appliquées à l'hémoglobine acellulaire visent à maintenir la protéine sous forme tétramérique pour augmenter sa demi-vie circulatoire et à diminuer son affinité pour l'oxygène afin d'assurer une bonne oxygénation des tissus. Les transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine ou HBOCs (pour Hemoglobin-Based Oxygen Carriers) se divisent en trois catégories selon que l'hémoglobine est modifiée chimiquement ou génétiquement ou qu'elle est encapsulée. La synthèse des HBOCs comprend toujours plusieurs étapes de purification afin d'éliminer tout composé cellulaire résiduel et notamment les constituants membranaires dont la néphrotoxicité a été largement mise en évidence. L'évaluation des produits comprend également des contrôles de pyrogénicité, des traitements d'inactivation virale et leur pureté est vérifiée par chromatographie (Highsmith FA. *et al.*, 1997).

4.1 - Les modifications chimiques

Trois grands types de modifications chimiques sont à l'origine de produits actuellement en cours d'évaluation préclinique ou clinique.

- Liaisons intra-moléculaires entre différentes sous-unités, de type α - α , β - β , ou α - β .

Ce type de liaison permet de maintenir la structure tétramérique de l'hémoglobine, sans modification de la masse moléculaire, et de réduire l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Le pontage entre les sous-unités s'effectue au moyen d'un agent bifonctionnel de faible masse moléculaire. Par exemple, l'agent utilisé dans la préparation de la DCLHb™ (diaspirin cross-linked hemoglobin) est le 3,5-dibromosalicyl bisfumarate (DBBF ou diaspirine) qui permet un pontage entre les résidus α^{99} Lys des deux sous-unités α d'hémoglobine humaine sous forme désoxygénée extraite de poches de sang périmé (figure 8). Cette hémoglobine modifiée a été élaborée par l'US Army et est actuellement développée sous le nom d'HemeAssist™ par Baxter Healthcare Corporation (Round Lake, IL., USA) (Winslow RM. *et al.*, 1994 ; Nelson D. *et al.*, 1992). La P_{50} de la solution est de l'ordre de 29 mm Hg et, chez l'homme, elle possède une demi-vie d'environ 2 heures pour une dose injectée de 50 mg/kg et de 4 heures pour une dose de 100 mg/kg (Przybelski RJ. *et al.*, 1996).

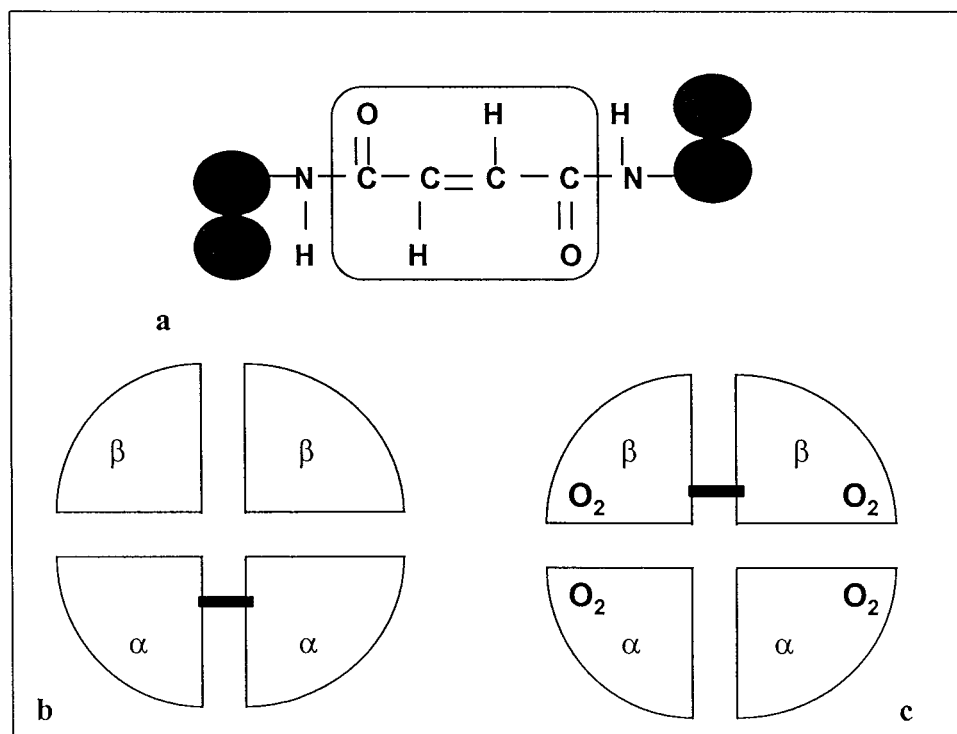


Figure 8. Pontage intramolécule de l'hémoglobine humaine par le bis 3,5-dibromosalicyl fumarate (a) entre les résidus α^{99} Lys (b) ou entre les résidus β^{82} Lys (c).

Le DBBF est également utilisé pour lier les deux sous-unités β par l'intermédiaire des résidus β^{82} Lys d'hémoglobine humaine sous forme oxygénée (figure 8 ; Ulatowski JA. *et al.*, 1996b).

- Polymérisation de l'hémoglobine par liaisons inter-moléculaires.

Ce type de pontage permet d'accroître la masse moléculaire et donc d'augmenter le temps de persistance vasculaire. Le glutaraldéhyde est utilisé comme agent de pontage intermoléculaire dans la préparation de PolyHeme[®], une solution d'hémoglobine humaine issue de la recherche de Northfield Laboratories (Evanston, IL., USA). La polymérisation de 4 molécules d'hémoglobine par le glutaraldéhyde (figure 9) permet d'obtenir un conjugué possédant une demi-vie de l'ordre de 24 heures chez l'homme pour une dose injectée d'environ 300 g. La baisse d'affinité pour l'oxygène est réalisée par addition de phosphate de pyridoxal et la solution finale possède une P_{50} de 26 mm Hg (Gould SA. *et al.*, 1998a).

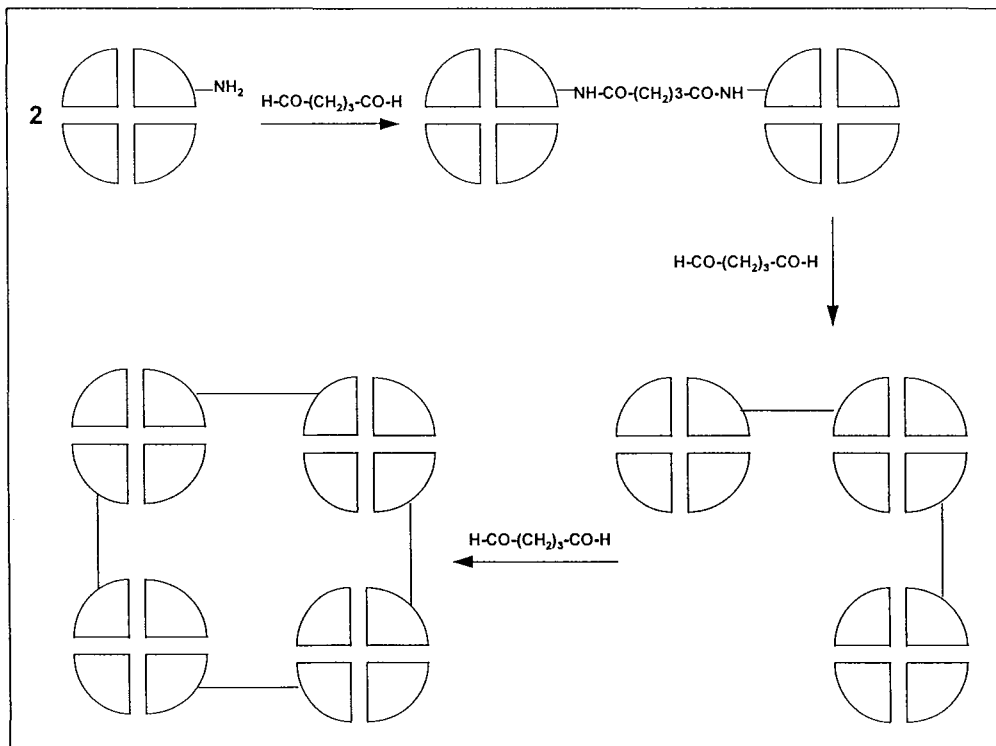


Figure 9. Etapes successives de la préparation de PolyHeme[®] faisant intervenir le glutaraldéhyde comme réactif de pontage intermoléculaire. D'après Gould SA. *et al.*, 1998a.

Hemopure[™], le produit développé par la société Biopure Corp. (Boston, MA, USA) est préparé à partir d'hémoglobine bovine, qui possède naturellement une affinité réduite pour l'oxygène par rapport à l'hémoglobine humaine. L'augmentation de la persistance vasculaire de l'hémoglobine est réalisée par polymérisation au glutaraldéhyde. La solution possède une

P_{50} de 34 mm Hg et, chez l'homme, une demi-vie proche de 20 heures pour une dose administrée de 45 g (Hughes GS. *et al.*, 1996).

- Conjugaison de l'hémoglobine à des macromolécules.

Cette modification chimique a pour but d'augmenter la masse moléculaire de l'hémoglobine afin d'accroître sa demi-vie plasmatique, en réduisant notamment les phénomènes d'extravasation et de fuite rénale. Les agents utilisés pour ce type de modification jouent de plus le rôle d'effecteur allostérique pour se substituer à la fonction du 2,3-DPG.

Un exemple de conjugué est l'hémoglobine-dextrane 10-benzène tétracarboxylate (Hb-Dex-BTC, figure 10), mise au point conjointement par les laboratoires d'Hématologie-Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, Pasteur-Mérieux sérums & vaccins (Marcy-L'Etoile, France) et l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC, Nancy, France) (Menu P. *et al.*, 1994 ; Prouchayret F. *et al.*, 1993). Le conjugué d'Hb-Dex-BTC présente une courbe de dissociation proche de celle de l'hémoglobine érythrocytaire avec une valeur de P_{50} de l'ordre de 23 mm Hg. Sa demi-vie plasmatique a été estimée chez le cobaye à 7 heures pour une dose injectée de 0,35 g et à 9,6 heures pour une dose de 0,85 g (Faivre B., 1993). Les caractéristiques physico-chimiques de cette solution seront développées dans la partie expérimentale de notre travail.

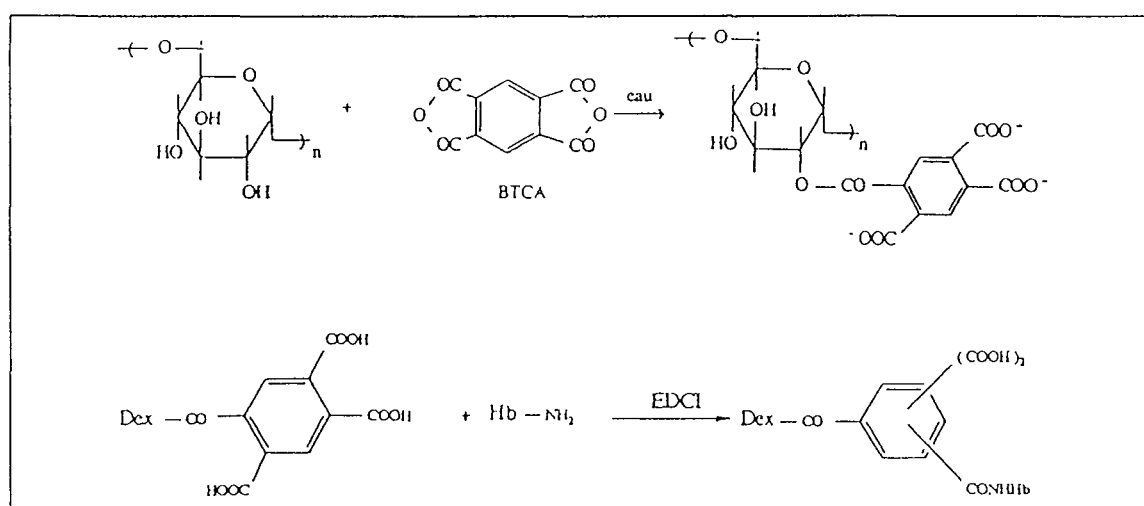


Figure 10. Préparation de l'hémoglobine-dextrane-benzène-tétracarboxylate ou Hb-Dex-BTC. D'après Prouchayret F. *et al.*, 1993.

BTCA : anhydride benzène-tétracarboxylique. **Dex** : dextrane. **EDCI** : 3 éthyl-1-(3 diméthylaminopropyl)-carbodiimide. **Hb-NH₂** : hémoglobine.

Le α -carboxyméthyl ω -carboxyméthoxy-polyoxyéthylène (POE) est employé dans l'élaboration d'un conjugué à base d'hémoglobine humaine, appelé PHP[®] (Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene) et développé par Apex Bioscience Inc. (Durham, NC, USA) (figure 11). Le déplacement de la courbe de saturation de l'hémoglobine vers la droite est obtenu par pyridoxylation et la solution possède une P₅₀ d'environ 20 mm Hg (Yabuki A. *et al.*, 1990). La PHP[®] possède une demi-vie estimée à 36 heures dans un modèle canin d'échange transfusionnel de 80% du volume sanguin (Yabuki A. *et al.*, 1990).

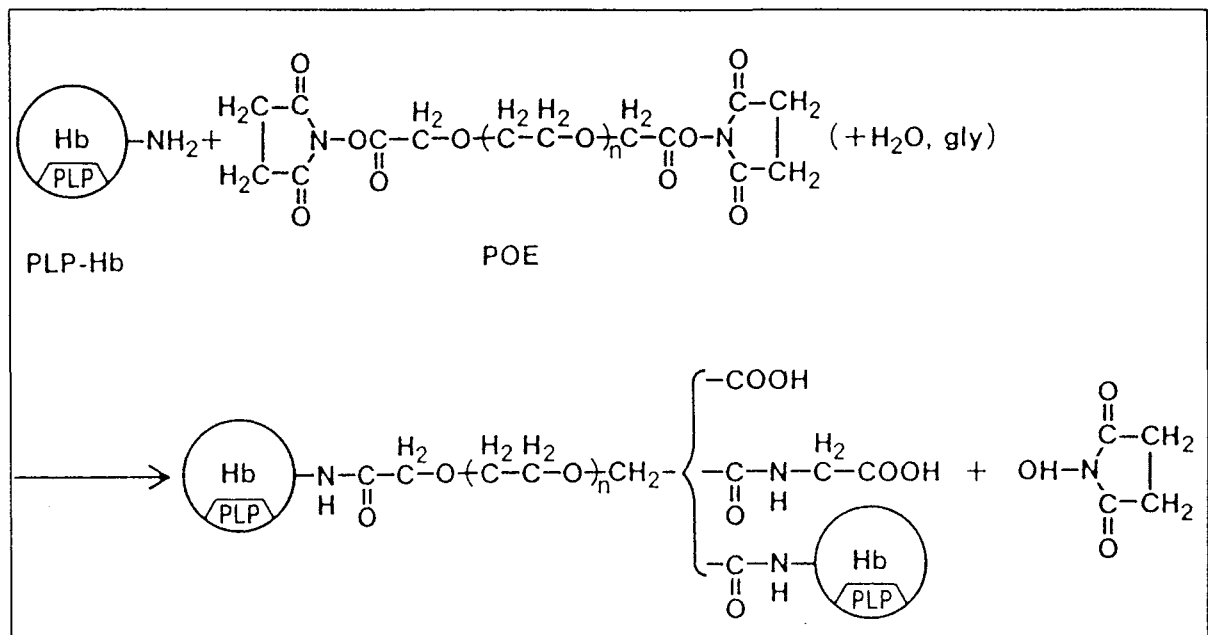


Figure 11. Schéma de la réaction de synthèse de la PHP[®] à partir de α -carboxyméthyl ω -carboxyméthoxy-polyoxyéthylène (POE) et d'hémoglobine humaine pyridoxylée (PLP-Hb). D'après Yabuki A. *et al.*, 1990.

Le polyoxyéthylène glycol est également utilisé dans la préparation d'un conjugué d'hémoglobine d'origine bovine développé par la compagnie Enzon (Piscataway, NJ, USA). Le conjugué possède une demi-vie de 20 heures chez le rat et une P₅₀ de 26-28 mm Hg (Nho K. *et al.*, 1992).

- Combinaison de plusieurs modifications chimiques

La préparation de certains transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine peut s'effectuer par une combinaison de plusieurs modifications chimiques décrites ci-dessus. Ainsi, la société Hemosol Inc. (Etobicoke, Canada) a élaboré une solution d'hémoglobine humaine pontée et polymérisée, HemoLink[™], en utilisant un agent polyfonctionnel, le *o*-raffinose (Hsia JC., 1989 ; Adamson JG. *et al.*, 1998 ; figure 12). La solution finale est à la

concentration de 100 g/L et présente une P_{50} de l'ordre de 34 mm Hg. HemoLink™ possède une demi-vie plasmatique chez l'homme de 5 heures à la dose de 0,1 g/kg et de 14,6 heures à la dose de 0,5 g/kg (Carmichael FJL. IBC's 6th Annual Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Washington, DC, USA, 20-21 Novembre 1998).

Nous citerons également à titre d'exemple, une approche récente qui a consisté à synthétiser une solution hémoglobine polymérisée contenant de la catalase et de la superoxyde dismutase, enzymes permettant de réduire les effets toxiques dus à l'oxydation de la protéine et à la production de radicaux libres oxygénés qui en résulte (D'Agnillo F. *et al.*, 1998). Les auteurs ont pu mettre en évidence l'intérêt de ce produit dans un modèle d'ischémie-reperfusion intestinale chez le rat, situation pathologique générant de nombreuses espèces radicalaires hautement toxiques.

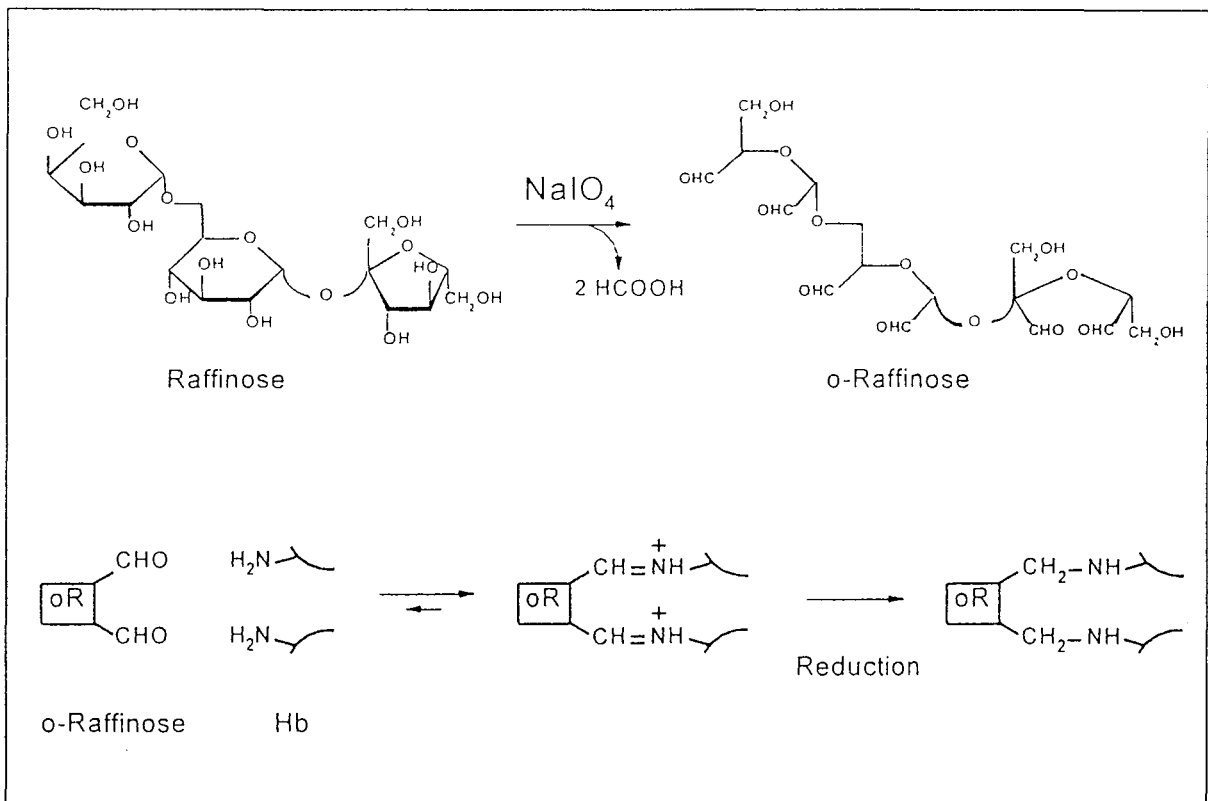


Figure 12. Réactions chimiques aboutissant à la synthèse d'o-raffinose polyhémoglobine (Hemolink™). D'après Magnin AA., IBC's 5th Annual Conference on Blood Substitutes, Boston, MA, USA - 20-21 Novembre 1997.

4.2 - Les modifications génétiques

La production d'hémoglobine recombinante par génie génétique est une approche plus récente motivée par la raréfaction de la matière première dans les établissements de transfusion sanguine. Par ailleurs, des modifications appliquées au niveau génique permettent

d'aboutir à la synthèse d'hémoglobine acellulaire présentant des propriétés fonctionnelles proches de celles de l'hémoglobine érythrocytaire. Ce type d'hémoglobine peut être synthétisé chez différents hôtes tels que les bactéries et les levures, systèmes permettant d'éliminer virtuellement tout risque de transmission virale. La société Somatogen Inc. (Boulder, CO., USA) a développé une hémoglobine humaine recombinante exprimée chez *Escherichia coli*. Les deux chaînes α sont assemblées par liaison peptidique, pour empêcher la dissociation du tétramère, et l'hémoglobine présente une mutation naturelle des chaînes β ($\beta^{108} \text{Asn} \rightarrow \text{Lys}$, Hb^{Presbyterian}), qui permet de réduire l'affinité de la protéine pour l'oxygène (Looker D. *et al.*, 1992). Le produit généré, rHb1.1 ou Optro™, possède une P₅₀ de 30-33 mm Hg et a fait l'objet d'essais cliniques initiés en 1991 (Looker D. *et al.*, 1992 ; Murray JA. *et al.*, 1995 ; Shoemaker SA. *et al.*, 1994). La société Baxter Healthcare Corporation (Round Lake, IL., USA) a pris en charge le développement de rHb1.1 depuis 1998.

La production d'hémoglobine humaine recombinante chez des porcs transgéniques fut une voie envisagée par la société américaine DNX Inc. (Princetown, NJ, USA) (Rao MJ. *et al.*, 1994), mais elle souleva le problème de transmissions virales de l'animal à l'homme, ainsi que des difficultés d'ordre bioéthique et religieux, si bien que le développement du produit dut être interrompu.

Des travaux menés par la société Biocem (Groupe Limagrain, Aubière, France) ont abouti à la production d'hémoglobine humaine dans les racines et les graines de plants de tabac transgénique (*Nicotiana tabacum* variété Xanthi transformé par *Agrobacterium tumefaciens*) (Dieryck W. *et al.*, 1997). L'hémoglobine obtenue est ensuite purifiée et chromatographiée. Toutefois, la quantité d'hémoglobine synthétisée demeure actuellement trop réduite pour un transfert à l'échelle industrielle.

4.3 - L'hémoglobine encapsulée

Une troisième approche consistant à encapsuler l'hémoglobine extraite des globules rouges dans une membrane artificielle fine, de type nanocapsule ou liposome, permet de réduire l'élimination rénale et l'extravasation et donc d'accroître la persistance vasculaire de la protéine (Chang TMS. *et al.*, 1998 ; Rudolph AS. *et al.*, 1994). Ces préparations peuvent être lyophilisées afin d'augmenter leur durée de conservation. L'encapsulation d'hémoglobine chimiquement modifiée, telle que la DCLHb™, permet d'obtenir des solutions aux propriétés oxyphoriques proches de celles de l'hémoglobine érythrocytaire. Par ailleurs, certains auteurs se sont proposés d'encapsuler conjointement certains systèmes enzymatiques ou certaines

molécules permettant de limiter les effets indésirables engendrés par l'hémoglobine libre. Ainsi, le groupe Terumo Corp. (Kanagawa, Japon) a reconstitué dans des liposomes le système de la méthémoglobine réductase dans le but de prévenir l'oxydation de l'hémoglobine (Ohki *et al.*, 1998).

Le développement de ces produits est actuellement au stade préclinique et certains problèmes restent à résoudre, tels que la viscosité élevée des solutions, la faible quantité d'hémoglobine encapsulée, ou l'activation du complément (Szebeni J. *et al.*, 1997).

En dépit de la variété de procédés développés pour l'élaboration d'une solution d'hémoglobine adaptée aux besoins transfusionnels (figure 13), les produits testés à ce jour en essais cliniques sont peu nombreux. Parmi ceux-ci, la majorité résulte de modifications chimiques de l'hémoglobine. Le tableau I regroupe l'ensemble des produits faisant l'objet des essais cliniques les plus avancés.

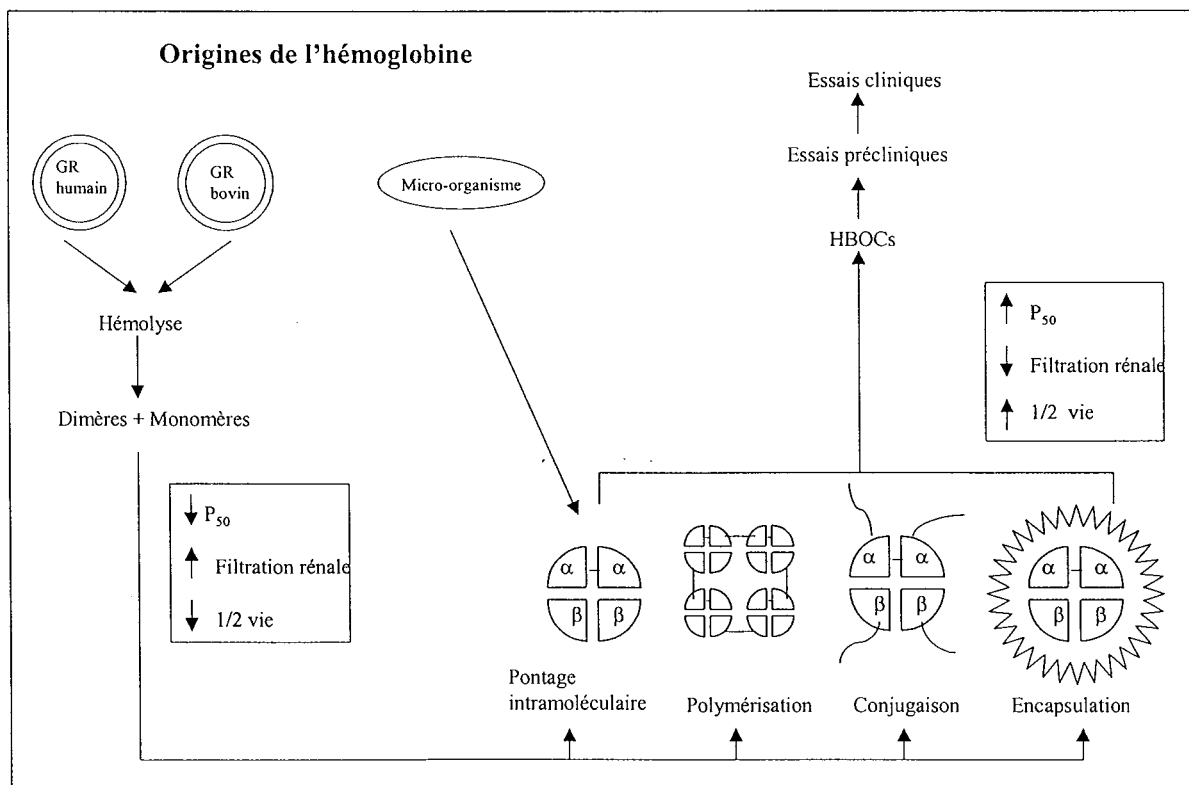


Figure 13. Représentation schématique des différents types de transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine actuellement en développement. D'après Dietz NM. *et al.*, 1996.

Tableau I : Description des principaux transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine faisant l'objet d'essais cliniques.

Société	Nom du produit	Origine de l'Hb	Modification(s)
Apex Bioscience, Inc. (USA)	PHP [®]	bovine	Hb conjuguée au polyoxyéthylène + PLP
Baxter Healthcare Corp. (USA)	HemeAssist [™]	humaine	pontage des sous-unités α par le DBBF
Biopure Corp. (USA)	Hemopure [™] (HBOC-201)	bovine	Hb polymérisée par le glutaraldéhyde + PLP
Enzon Inc. (USA)	PEG-Hb	bovine	conjugaison au polyéthylène glycol
Hemosol Inc. (Canada)	HemoLink [™]	humaine	pontage et polymérisation par le o-raffinose
Northfield Lab. Inc. (USA)	PolyHeme [™]	humaine	polymérisation par le glutaraldéhyde
Somatogen Inc. (repris par Baxter Healthcare) (USA)	Optro [™] (rHb1.1)	humaine recombinante (<i>E. coli</i>)	liaison des 2 chaînes α et mutation $\beta^{108} \text{Asn} \rightarrow \text{Lys}$

5 - Etat d'avancement des essais cliniques et effets secondaires

Les applications potentielles des transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine sont nombreuses puisque ces produits sont destinés à réduire significativement les besoins en sang durant certains actes médicaux nécessitant un recours à la transfusion de globules rouges. Actuellement, l'utilisation clinique de ces produits est envisagée dans cinq voies majeures :

- chirurgie électorive :
 - routine périopératoire
 - hémodilution périopératoire
- chirurgie cardiovasculaire :
 - remplacement volumique
 - circulation extra-corporelle
- réanimation-urgences :
 - remplacement volumique

- choc septique
- perfusion des tissus ischémisés :
 - thérapeutique thrombolytique
 - maladies vasculaires périphériques
 - accidents vasculaires cérébraux
 - vaso-occlusion (drépanocytose)
- oxygénation de tumeurs radiosensibles.

Les essais cliniques débutèrent en 1991, et les études les plus avancées sont aujourd'hui en phases II et III pour les produits développés par Baxter Healthcare Corp. et Northfield Lab. Inc. Lors des premiers essais cliniques, certains effets secondaires sont apparus et la poursuite des investigations a nécessité des études complémentaires chez l'animal. Si des effets indésirables tels que fièvre, dysphagie, maux de tête peuvent être contrôlés, les problèmes de vasoconstriction systémique, d'hypertension ou de bradycardie rencontrés avec la plupart des HBOCs demeurent rédhibitoires. Un récapitulatif non exhaustif des observations tirées de diverses études effectuées avec les principaux produits en cours d'évaluation clinique est proposée dans le tableau II.

Aujourd'hui, la transfusion de solutions à base d'hémoglobine d'origine bovine est implicitement remise en question en raison des risques potentiels de transmission inter-espèce d'agents pathogènes dont la présence n'a pu être formellement écartée (cas de l'encéphalite bovine spongiforme). Aussi, les industriels américains tels que Enzon Inc. et Biopure Corp. se sont tournés vers de nouvelles applications et en particulier vers la transfusion vétérinaire, discipline pour laquelle les besoins et les perspectives financières sont importants. Biopure Corp. (Veterinary Division) a obtenu fin 1998 une autorisation de mise sur le marché américain pour Oxyglobin[®], ou hemoglobin glutamer-200 (bovine), en vue du traitement de l'anémie canine (Rentko VT. IBC's 6th Annual Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Washington, DC, USA, 20-21 Novembre 1998).

Dans la majorité des cas, les HBOCs exercent des effets secondaires sur le système cardiovasculaire, aussi bien chez l'animal que chez l'homme. Les mécanismes à l'origine des modifications hémodynamiques qu'ils induisent sont pour certains plus ou moins clairement élucidés et nécessitent de comprendre à quels niveaux l'hémoglobine acellulaire peut intervenir.

Tableau II : Synthèse des études précliniques et cliniques impliquant les principaux transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine.

Société - Produit	Phase d'étude	Lieu d'étude	Applications [doses] - Observations principales
Apex Biosciences - PHP®	Etudes précliniques (mouton, porc) et cliniques de phase I/II	USA, Allemagne	<p><u>Choc septique</u> [100 mg/kg] (Aranow JS. <i>et al.</i>, 1996 ; Fischer SR. <i>et al.</i>, 1997 ; Fischer SR. <i>et al.</i>, 1998) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Correction de l'hypotension due au choc sans effet bénéfique sur la vasoconstriction et l'hypoxie pulmonaires. - Peu d'effet sur les principaux organes. - Augmentation des taux d'endothéline-1 plasmatique et tissulaire. <p><u>Sujets sains</u> [25-100 mg/kg] (Kilbourn RG. <i>et al.</i>, 1997) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Crampes abdominales, maux de tête, légère hypertension.
Baxter Healthcare - HemeAssist™	12 études de phase I complètes, 1 de phase II et 3 de phase III en cours	USA, Europe	<p><u>Hémodialyse</u> [25-100 mg/kg] (Swan S. <i>et al.</i>, 1995) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hypertension, douleurs gastrointestinales, dysphagie. <p><u>Sujets sains</u> [25-100 mg/kg] (Przybelski RJ. <i>et al.</i>, 1996) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Douleurs abdominales, hausse du taux de créatine kinase sérique. <p><u>Chirurgie cardiaque, orthopédique</u> [250-750 mg/kg] (Nelson DJ. <i>et al.</i>, 1998 ; Sloan EP. IBC's 6th Annual Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Washington, DC, USA, 20-21 Novembre 1998) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Réduction des besoins post-opératoires en transfusion de sang. - Hémoglobinurie, hypertension, cas de jaunisse. <p><u>Choc hypovolémique hémorragique</u> [dose maxi : 1000 mg/kg] (Sloan EP., 1998) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pas d'apport en comparaison à une solution saline. - Essais cliniques suspendus, redéfinition des protocoles.
Biopure - Hemopure™ (HBOC-201)	Etudes de phase I/II	USA, Allemagne	<p><u>Drépanocytose (hors vaso-occlusion)</u> [200-600 mg/kg] (Gonzalez P. <i>et al.</i>, 1997) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pas d'effet secondaire rédhibitoire, pression artérielle stable, légère diminution du débit cardiaque. <p><u>Reconstruction aortique (hémodilution pré-opératoire)</u> [400-1200 mg/kg] (Kasper S-M. <i>et al.</i>, 1996 ; Kasper S-M. <i>et al.</i>, 1998) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Capacité d'oxygénation insuffisante due à des effets sur le débit cardiaque. - Pas d'apport bénéfique en termes d'hémodynamique et de transport d'oxygène en comparaison à de l'hydroxyéthylamidon. <p><u>Hémodilution en chirurgie hépatique</u> [400 mg/kg] (Standl T. <i>et al.</i>, 1998):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bonne tolérance après administration d'une dose unique.

Tableau II (suite) : Synthèse des études précliniques et cliniques impliquant les principaux transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine

Société - Produit	Phase d'étude	Lieu d'étude	Applications [doses] - Observations principales
Enzon - PEG-Hb	Etudes précliniques (rat), 1 étude clinique de phase Ib	USA	<u>Adjuvant dans certains traitements anticancéreux</u> [360-900 mg/kg] (Shorr R. IBC's 5 th Annual Conference on Blood Substitutes, Boston, MA, USA, 20-21 Novembre 1997): - Amélioration de l'oxygénation des tumeurs et donc potentialisation de l'action d'agents anticancéreux. - Pas de toxicité observée.
Hemosol - HemoLink™	Etudes de phase I et de phase II complètes. 6 essais de phase III en 1999.	Canada, Grande-Bretagne, USA	<u>Sujets sains</u> [25-600 mg/kg] (Adamson <i>et al.</i> , 1998) : - Hypertension dose-indépendante, bradycardie légère. - Fonction rénale et paramètres hématologiques inchangés. - Douleurs gastrointestinales, dysphagie. <u>Chirurgie orthopédique</u> [150-600 mg/kg] (Carmichael FJL. IBC's 6 th Annual Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Washington, DC, USA, 20-21 Novembre 1998) : - Pas de toxicité observée. - Hémodynamique stable, fonctions rénale, hépatique et pancréatique normales. - Poursuite des essais à plus haute dose (phase IIb). <u>Circulation extracorporelle</u> [330-1000 mg/kg] (Carmichael FJL., 1998) : - Réduction des besoins en sang autologue.
Northfield - PolyHeme™	Etudes de phase I complètes, études de phases II et III en cours	USA	<u>Sujets sains</u> [dose maxi : 700 mg/kg] (Gould S. <i>et al.</i> , 1993 ; Gould SA. <i>et al.</i> , 1996) : Absence de vasoconstriction, de dysfonction rénale et de douleurs gastrointestinales. <u>Choc hémorragique et chirurgie en situation d'urgence</u> [700-4000 mg/kg] (Gould SA. <i>et al.</i> , 1997 ; Gould SA. <i>et al.</i> , 1998b) : - Diminution des besoins en transfusion allogénique. - Pas de modification de fréquence cardiaque, pression artérielle, température, fonctions enzymatiques rénales et hépatiques.
Somatogen - Optro™	Etudes cliniques de phase I et II en cours	USA	<u>Sujets sains</u> [15-150 mg/kg] (Shoemaker SA. <i>et al.</i> , 1994 ; Murray JA. <i>et al.</i> , 1995) : - Fièvre, frissons, maux de tête, myalgie, spasmes oesophagiens. - Vasoconstriction hétérogène.

II - SYSTEMES DE REGULATION HEMODYNAMIQUE

1 - Descriptions anatomique et histologique simplifiées du système cardiovasculaire

Nous allons décrire le système cardiovasculaire selon ses différentes composantes, du cœur vers les vaisseaux, artères, capillaires et veines.

1.1 - Le cœur

Le cœur a pour fonction de propulser le sang vers les cellules de l'organisme. Sa paroi est formée de trois feuillets, un feuillet externe ou épicarde, un feuillet intermédiaire ou myocarde et un feuillet interne ou endocarde. Le myocarde, constitué de cellules musculaires cardiaques, représente l'essentiel de la masse de l'organe et est le feuillet donnant sa contractibilité au cœur. Le cœur est composé de quatre cavités, deux oreillettes dans sa partie supérieure et deux ventricules dans sa partie inférieure. On distingue le cœur gauche, qui est la pompe de la circulation systémique et le cœur droit qui est la pompe de la circulation pulmonaire. Les deux parties sont séparées par une cloison longitudinale. Les ventricules ont pour rôle de propulser le sang dans la circulation et les oreillettes sont le point d'arrivée du sang amené par la circulation. Le ventricule gauche éjecte le sang oxygéné dans l'aorte, la plus grosse des artères, dont les ramifications constituent le système artériel.

1.2 - Le système artériel

La principale fonction du système artériel est la distribution du flux sanguin vers les différents capillaires de l'organisme pour permettre l'apport de nutriments et l'oxygénation des tissus. Le système artériel est formé par la division de l'aorte en un grand nombre d'artères de distribution et d'irrigation aux diamètres décroissants, possédant une structure pariétale uniforme composée d'une couche interne, l'intima, d'une couche moyenne, la média et d'une couche externe, l'adventice (Tedgui A. *et al.*, 1994).

L'intima est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (l'endothélium) et d'une membrane basale extracellulaire (figures 14 et 15). La cellule endothéliale possède un noyau ovoïde et un cytoplasme aplati pauvre en organites contenant des filaments d'actine. L'endothélium joue le rôle d'interface entre le sang circulant et la paroi artérielle et participe directement à la régulation de la vasomotricité, de l'hémostase et de la vasotrophicité. L'étanchéité de la barrière endothéliale dépend de l'intégrité de la monocouche cellulaire, du

degré de fermeture ou d'ouverture des jonctions intercellulaires, de la fonction de pinocytose et de la structure de la lame basale (Laurent S. *et al.*, 1996 ; Haller *et al.*, 1997).

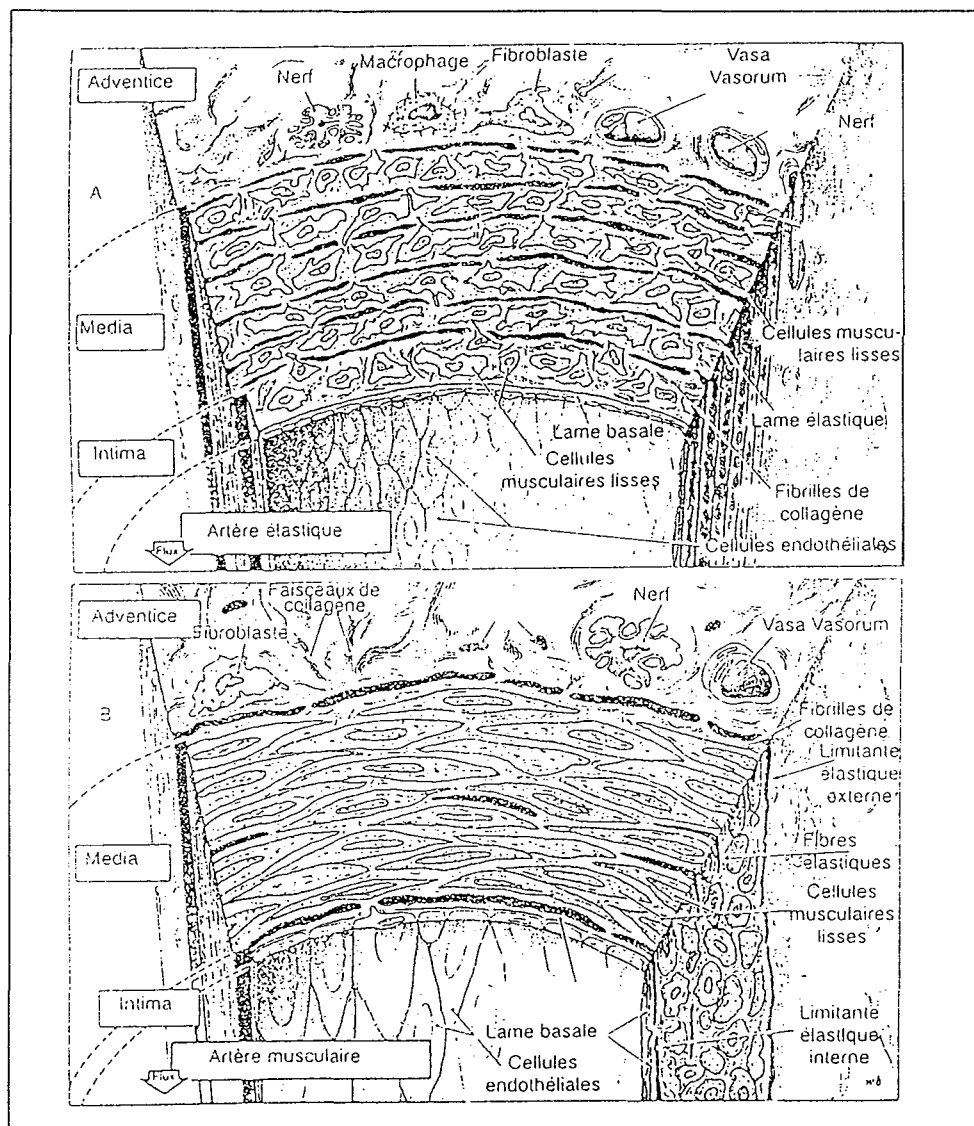


Figure 14. Représentation schématique de la structure d'une artère élastique (A) et d'une artère musculaire (B). D'après Tedgui *et al.*, 1994.

La média est formée de cellules musculaires lisses, disposées en couches successives et s'appuyant sur une matrice fibreuse constituée de glycosaminoglycanes, d'élastine et de collagène. La cellule musculaire lisse est une cellule allongée à noyau ovalaire entourée par une membrane basale. Chez le sujet jeune, les cellules musculaires lisses sont contractiles et possèdent un cytoplasme riche en myofilaments. Avec l'âge, les cellules changent d'orientation, se mobilisent et migrent vers l'intima pour devenir en grand nombre des cellules sécrétantes. Le cytoplasme perd les myofilaments et s'enrichit en organites élaborant

de l'élastine, du collagène et des glycoprotéines structurales (Laurent S. *et al.*, 1996 ; Archer S. *et al.*, 1996 ; Dohi Y. *et al.*, 1995).

L'adventice, constituée de tissu conjonctif lâche, est le siège de terminaisons nerveuses libérant des neurotransmetteurs responsables de signaux divers pour la cellule musculaire lisse.

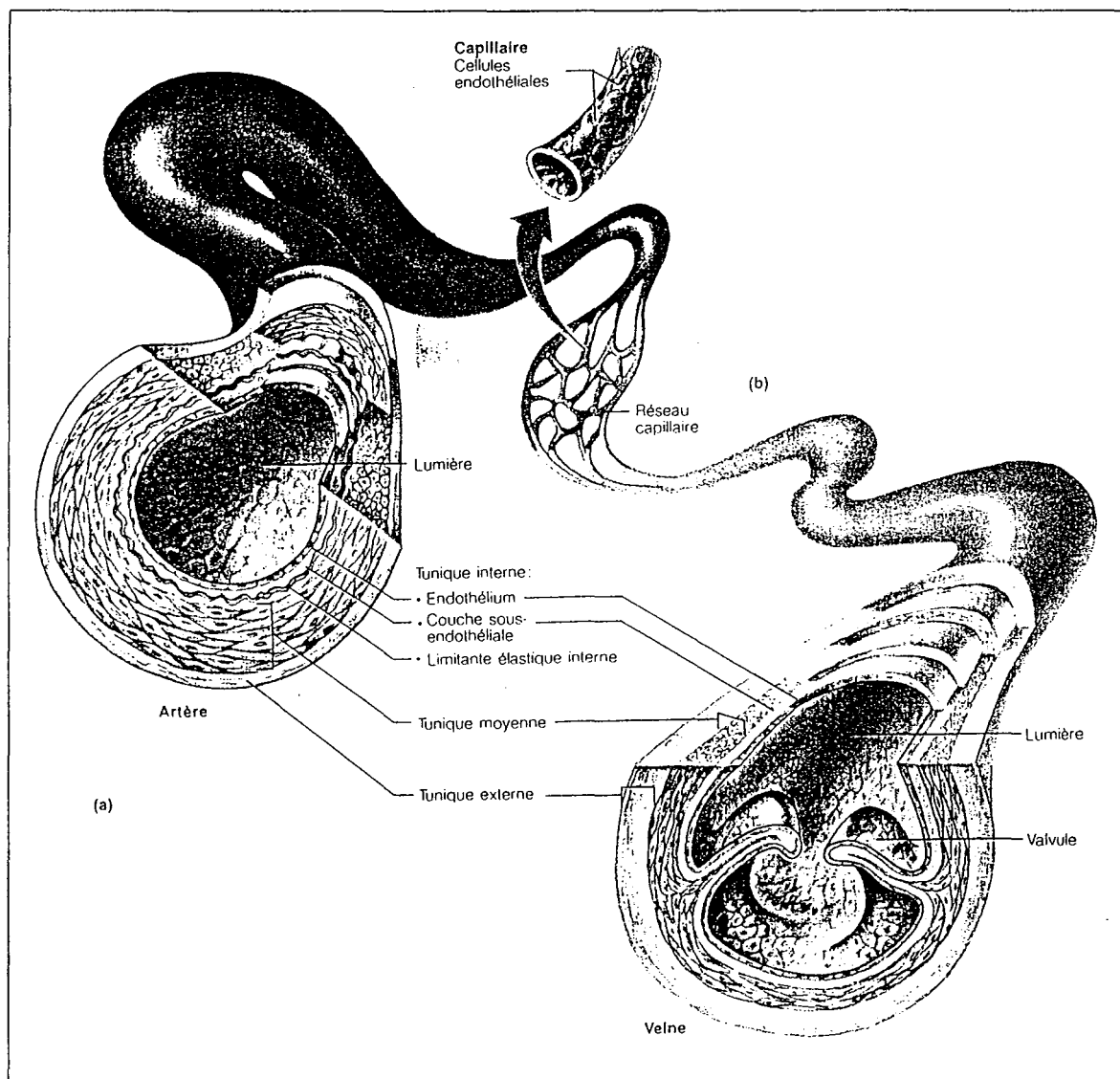


Figure 15. Structure des artères, des veines et des capillaires. D'après Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines, 2^e édition, Ed. De Boeck Université, 1993, p 634.

Selon la proportion des constituants de la couche moyenne, deux types d'artères, élastiques et musculaires (ou de résistance), sont décrits (figure 14). Les artères élastiques ou de compliance représentées par l'aorte et ses branches ont pour rôle de conduire le sang de la sortie du cœur vers les artères de faible calibre et les capillaires. Elles participent par leurs

propriétés élastiques à la transformation du débit pulsatile en débit continu. Les artères musculaires ou de résistance ont pour rôle d'apporter le sang aux capillaires afin d'oxygéner les tissus périphériques. La structure des petites artères ou artérioles leur confère une capacité vasomotrice active qui permet d'adapter les débits sanguins vers les capillaires à la demande des tissus en oxygène. Lorsque les artérioles se contractent, le sang contourne les tissus qu'elles irriguent tandis que lorsqu'elles se dilatent, le débit sanguin dans les capillaires augmente.

1.3 - Les capillaires

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins (figure 15). Ils sont formés d'une seule couche de cellules endothéliales et assurent l'échange de substances entre le sang et le liquide interstitiel. Ils se répartissent en capillaires continus, les plus abondants, dans lesquels les cellules endothéliales sont réunies par des jonctions étanches, et en capillaires discontinus ou fenestrés, dans lesquels la couche de cellules endothéliales est percée de pores recouverts par une membrane. Les capillaires se regroupent en réseaux ou lits capillaires où s'effectuent les échanges. Les lits capillaires sont constitués de capillaires vrais (plusieurs dizaines) et d'une métartériole, de structure intermédiaire entre artériole et capillaire. Les capillaires vrais sont entourés à leur origine de sphincters précapillaires qui contrôlent le passage du flux sanguin en modulant le nombre de capillaires ouverts. Ainsi, le sang peut soit emprunter la métartériole et passer dans les capillaires vrais s'ils sont ouverts, soit circuler uniquement dans la métartériole si les capillaires sont fermés (figure 16). Le débit de sang qui passe dans les capillaires vrais est régulée par des fibres nerveuses vasomotrices en fonction des besoins des tissus. Aussi, dans les conditions normales, seule une fraction des capillaires est perfusée. En cas d'hypoxie tissulaire (diminution de la PO_2), des signaux rétrogrades agissent sur les artérioles et les sphincters précapillaires : les capillaires s'ouvrent et par voie de conséquence, l'apport en oxygène augmente (figure 16).

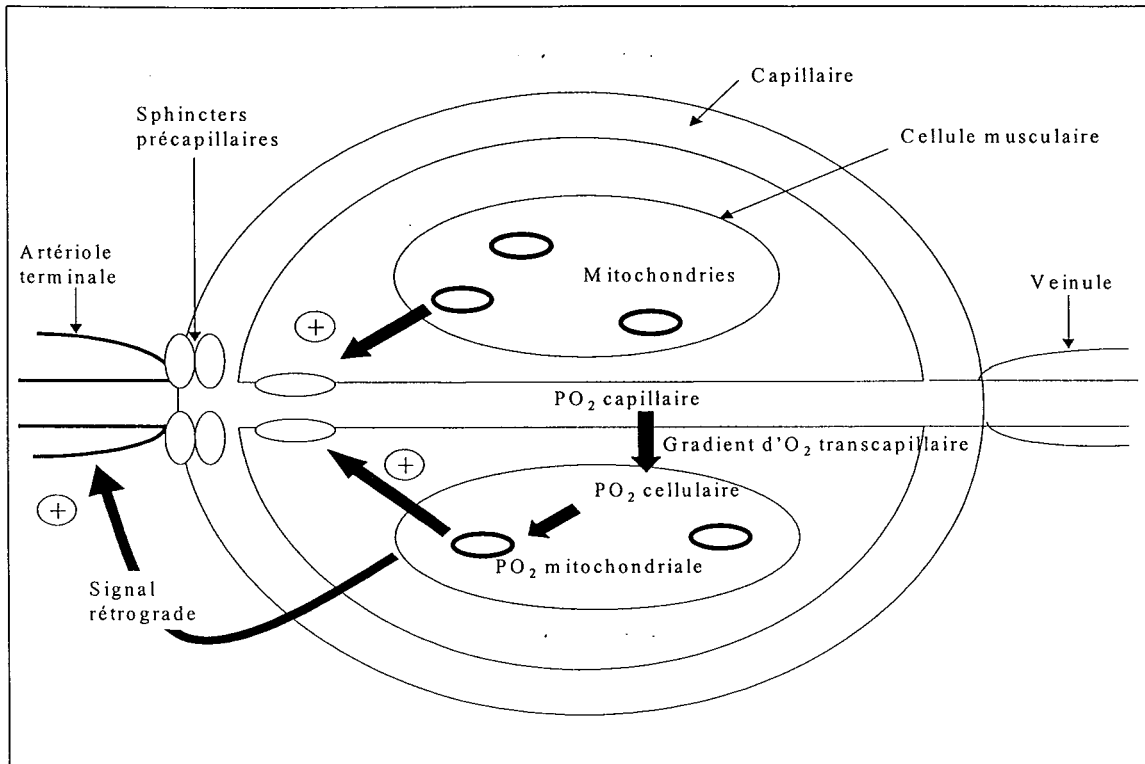


Figure 16. Représentation schématisée de la théorie du contrôle local de la microcirculation du muscle squelettique. D'après Vallet B. *et al.*, 1995.
 PO_2 : pression partielle en oxygène.

1.4 - Le système veineux

La fonction du système veineux est d'amener le sang des capillaires au cœur. De la périphérie vers le cœur, on distingue des vaisseaux de faible diamètre formés par l'union des capillaires, les veinules, et des vaisseaux plus larges, les veines. Les veinules sont formées d'une seule couche de cellules endothéliales entourée de fibroblastes. Les veines sont constituées, comme les artères, de trois couches (intima, média et adventice), mais comparativement leur paroi est plus fine et leur lumière plus large (figure 15). La couche externe est la plus épaisse et est recouverte de bandes musculaires dans les plus grosses veines. En raison du large diamètre permettant de diminuer la résistance à l'écoulement du sang, la pression sanguine régnant dans les veines est faible et serait insuffisante pour permettre le retour du sang vers le cœur sans la présence d'un système favorisant le retour veineux. Le système est constitué de valvules qui sont des replis de l'intima s'opposant au reflux sanguin et sont particulièrement abondantes dans les veines des membres où l'effet de la force gravitationnelle est le plus important. La contraction et le relâchement des muscles squelettiques entourant les veines profondes permettent d'assurer la propagation du sang en direction du cœur. Enfin, la force exercée par le diaphragme sur les organes de l'abdomen lors

de l'inspiration contribue à la compression des veines locales et favorise ainsi la propagation du sang vers le cœur.

Les éléments décrits ci-dessus participent activement au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire, en agissant sur le débit sanguin, la pression sanguine et la résistance à l'écoulement du sang.

2 - Pression, débit et résistance

Ces trois grandeurs physiques sont essentielles dans la physiologie de la circulation. Le cœur, assimilable à une pompe, régite le débit sanguin transmis aux artères de compliance, les artères de résistance adaptent les apports aux capillaires, lieux des échanges, par modification des débits sanguins locaux et les veines régulent le retour du sang au muscle cardiaque par leur fonction de réservoir.

2.1 - Pression sanguine

La pression sanguine est la force qu'exerce le sang sur la paroi d'un vaisseau par unité de surface. La pression est le résultat de la résistance qui s'oppose à l'écoulement du sang propulsé par la pompe cardiaque. Elle s'exprime en millimètres de mercure (mmHg) ou en Pascal (Pa). La pression sanguine veineuse dépend de la pression sanguine artérielle et c'est donc ce dernier paramètre qui est classiquement étudié. La pression qui s'exerce dans les artères élastiques est liée au volume de sang propulsé par le cœur à chaque battement et aux propriétés élastiques des artères (Marchais *et al.*, 1993). Pour chaque cycle cardiaque, on différencie la pression systolique qui correspond à la pression maximale exercée par le sang lorsque les ventricules se contractent, et la pression diastolique qui correspond à la pression minimale du sang lorsque le cœur se remplit. Le long de l'arbre artériel, la pression artérielle décroît progressivement et la pulsatilité s'atténue pour être nulle à l'entrée des capillaires. Dans le système veineux, la pression varie très peu au cours du cycle cardiaque (figure 17). Du fait de la pulsatilité de la pression sanguine dans les artères de gros calibre, on calcule une pression théorique assurant le même débit dans un système continu et non pulsatile : la pression artérielle moyenne (PAM). La pression sanguine est régulée par divers mécanismes qui seront abordés plus loin et qui visent à s'adapter aux conditions physio-pathologiques de l'organisme (Persson PB., 1996).

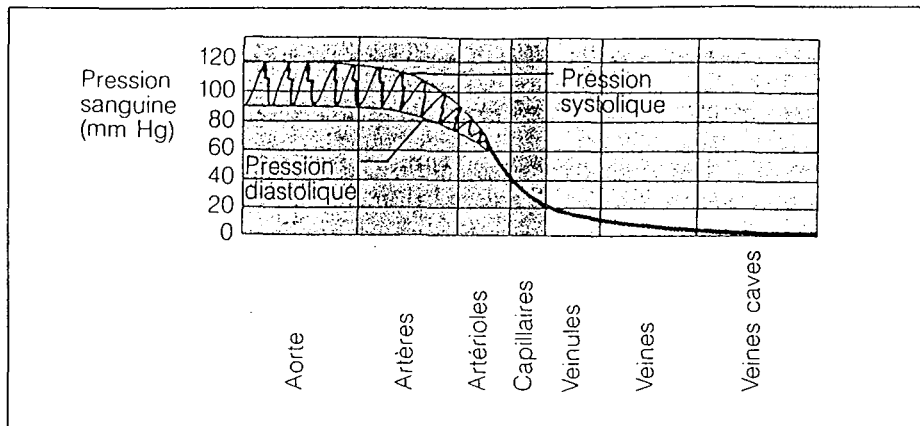


Figure 17. Pression sanguine dans les différents vaisseaux de la circulation systémique chez l'homme. D'après Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines, 2^e édition, Ed. De Boeck Université, 1993, p 640.

2.2 - Débit sanguin

Le débit sanguin est le volume de sang circulant dans un vaisseau en un temps donné. On exprime classiquement ce paramètre en L/min ou en mL/min selon la taille du vaisseau considéré. A la sortie du cœur, le débit sanguin est maximal et peut se calculer comme le produit du volume de sang éjecté par le ventricule gauche et de la fréquence cardiaque. Tout comme pour la pression, le débit sanguin est pulsatile dans les artères de gros calibre et devient graduellement continu à l'approche des capillaires. Physiologiquement, la relation pression/débit est passive dans les territoires non vitaux (peau, muscles squelettiques). Dans les organes vitaux, le débit sanguin instantané peut varier considérablement en fonction des besoins immédiats et est autorégulé par des mécanismes visant à préserver les apports en oxygène.

2.3 - Résistance

La résistance est la force qui s'oppose à l'écoulement du sang dans les vaisseaux (Lautt WW., 1989). Selon le type de vaisseau, le sang en mouvement s'écoule de façon différente. On distingue classiquement deux types d'écoulement, l'un dit laminaire, l'autre dit turbulent. Dans les vaisseaux de gros calibre tels que l'aorte, l'écoulement est proche du régime laminaire, tandis que dans les petites artères, l'écoulement est plutôt turbulent. Toutefois, dans la plupart des vaisseaux, l'écoulement n'est ni parfaitement turbulent, ni parfaitement laminaire (Li JKJ., 1988).

En cas d'écoulement laminaire, les globules rouges contenus dans le fluide se déplacent parallèlement au grand axe du vaisseau. Leur vitesse est faible au contact des parois et augmente selon un profil parabolique de la paroi vers le centre du vaisseau (figure 18).

Dans ce type d'écoulement, les échanges entre les éléments du sang et les parois sont médiocres. En cas d'écoulement turbulent, les globules rouges sont animés de mouvements tourbillonnaires et le profil des vitesses tend à être plat (figure 18). Ce type d'écoulement favorise les échanges entre les éléments du sang et les parois.

Ainsi, la résistance à l'écoulement est prépondérante dans les vaisseaux les plus petits, où les forces de friction du sang sur les parois vasculaires sont importantes ; pour cette raison on parle souvent de résistance périphérique. La résistance à l'écoulement est influencée par trois facteurs : le diamètre du vaisseau, sa longueur et la viscosité du sang. Cette relation est décrite par la formule de Poiseuille :

$$R = \frac{8}{\pi} \cdot \mu \cdot \frac{l}{r^4}$$

où R est la résistance, μ , la viscosité du sang, l , la longueur du vaisseau et r , le rayon du vaisseau.

La longueur du vaisseau est un paramètre invariable et la viscosité du sang fluctue peu dans les conditions physiologiques. Le diamètre du vaisseau est donc le facteur essentiel de la résistance périphérique puisque la résistance est inversement proportionnelle à la puissance quatrième du rayon d'après la relation de Poiseuille. Le diamètre des vaisseaux les plus périphériques est susceptible de varier en fonction des contraintes physiologiques. Ainsi, une diminution de diamètre (vasoconstriction) contribue à augmenter les forces de friction du sang et donc à accroître la résistance à l'écoulement du sang, et inversement, une augmentation de diamètre (vasodilatation) réduit les forces de friction et donc diminue la résistance.

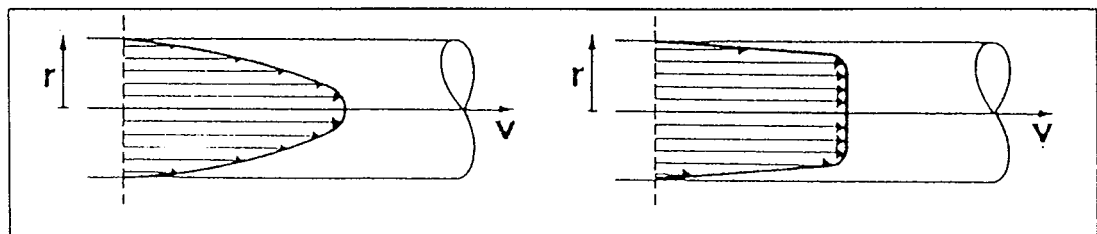


Figure 18. Profils des vitesses (v) pour des écoulements laminaire (à gauche) et turbulent (à droite). r : rayon du vaisseau. D'après Péronneau P. Vélométrie Doppler. Applications en pharmacologie cardio-vasculaire animale et clinique. Ed. INSERM, 1991, p 49.

2.4 - Relation entre pression, débit et résistance

Les trois grandeurs décrites ci-dessus sont liées. En effet, le débit sanguin varie proportionnellement avec la différence de pression sanguine entre deux points donnés du compartiment cardio-vasculaire et il est inversement proportionnel à la résistance périphérique (Lautt WW., 1989). Ces relations peuvent s'exprimer suivant la formule:

$$\text{Débit} = \frac{\text{différence de pression}}{\text{résistance périphérique}}$$

Dans la circulation générale, un ensemble d'éléments régule la pression artérielle, tandis que les autres paramètres tels que le débit cardiaque s'adaptent aux besoins. Plusieurs mécanismes régulateurs coexistent et peuvent être mis en œuvre à court, moyen ou long terme, afin d'assurer une pression de perfusion et un retour veineux adaptés aux conditions physiologiques (Persson PB., 1996).

3 - Régulation nerveuse

Le système nerveux autonome exerce son action sur les organes par l'intermédiaire de médiateurs chimiques : l'acétylcholine pour le parasympathique et les catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine) pour le sympathique. Ces médiateurs chimiques sont libérés par des neurofibres vasomotrices efférentes qui innervent la couche musculaire des vaisseaux sanguins et particulièrement des artéioles. La plupart des neurofibres vasomotrices libèrent en permanence de la noradrénaline, substance vasoconstrictrice, par l'intermédiaire de récepteurs post-synaptiques α -adrénergiques (α_1 et α_2) et maintiennent ainsi un tonus vasomoteur basal. Le rythme des influx transmis à ces neurofibres est régi par le centre vasomoteur, composé de neurones sympathiques situés dans le bulbe rachidien, qui assure la régulation de la pression artérielle. Le système de régulation instantané de la pression artérielle comprend trois éléments : l'arc baroréflexe, les chémorécepteurs et le réflexe ischémique central (Persson PB., 1996).

3.1 - L'arc baroréflexe

Les barorécepteurs sont des mécanorécepteurs situés dans le sinus carotidien et dans la crosse aortique, pour le système baroréflexe à haute pression, et dans les grosses artères du cou et du thorax, pour le système baroréflexe à basse pression. Ces mécanorécepteurs sont sensibles à la déformation de la géométrie vasculaire et réagissent instantanément et de façon fugace à des variations aiguës de pression artérielle par l'intermédiaire du centre vasomoteur

(figure 19). Les anesthésiques intraveineux et halogénés ont des effets marqués sur l'arc baroréflexe et pourront de ce fait avoir une influence dans nos expérimentations comme nous le verrons plus loin (Edouard A. *et al.*, 1985 ; Hatton DC. *et al.*, 1997).

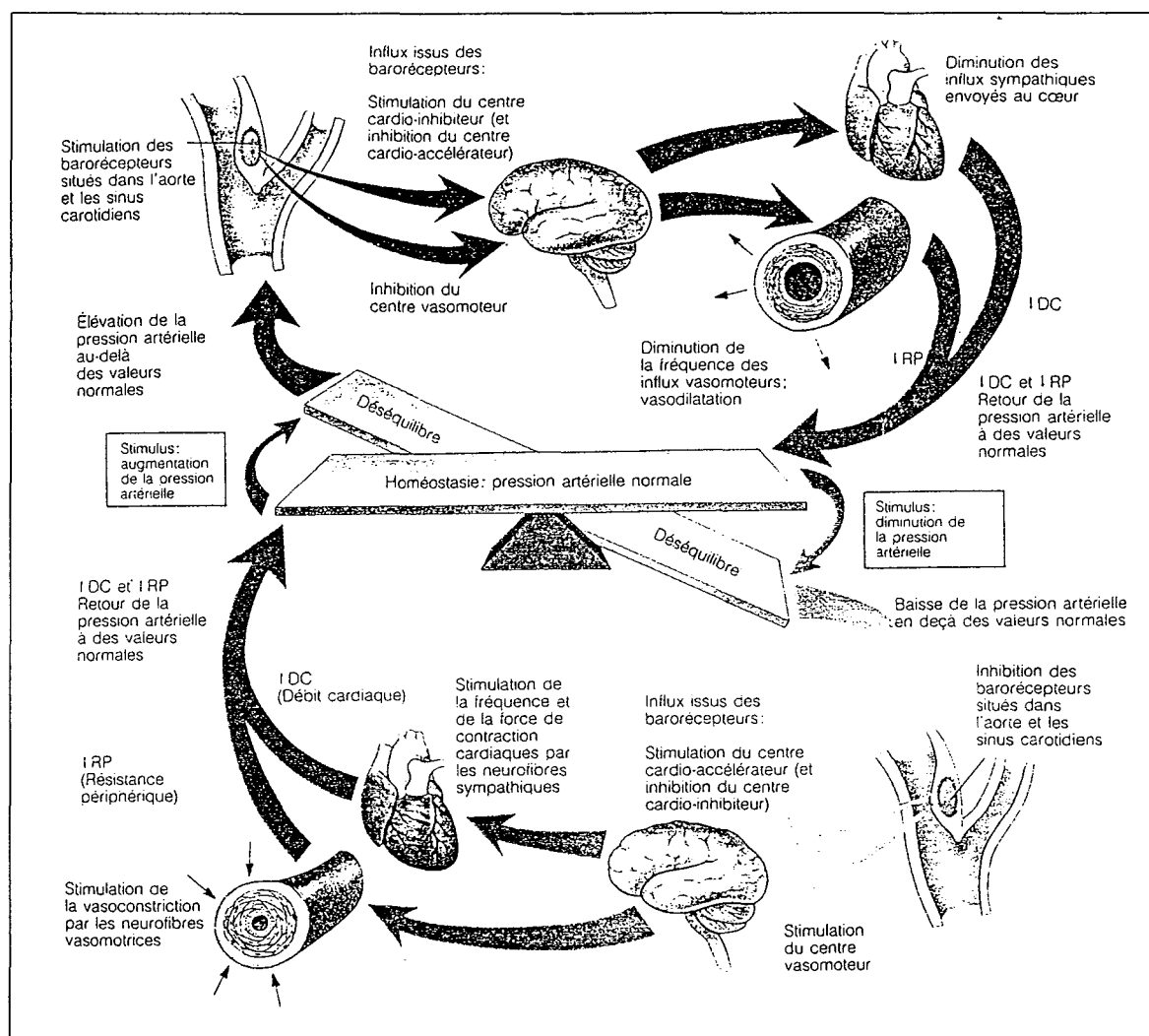


Figure 19. Réflexes déclenchés par les barorécepteurs pour maintenir la pression artérielle. D'après Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines, 2^e édition, Ed. De Boeck Université, 1993, p 643.

DC : débit cardiaque ; *RP* : résistance périphérique.

3.2 - Les chémorécepteurs

Les chémorécepteurs centraux (situés de part et d'autre du bulbe rachidien) et périphériques (situés dans la crosse de l'aorte et dans les corpuscules carotidiens) sont sensibles aux variations de la teneur en oxygène et du pH sanguins (Persson PB., 1996 ; Alkjoer C. *et al.*, 1996). Par l'intermédiaire du centre vasomoteur, ils induisent :

- une vasoconstriction réflexe en cas de diminution du pH et/ou de la teneur en oxygène, qui permet d'accélérer le retour veineux vers le cœur et les poumons.

- inversement, une vasodilatation réflexe en cas d'augmentation du pH et/ou de la teneur en oxygène.

3.3 - Le réflexe ischémique central

Ce système de régulation, plus puissant que l'arc baroréflexe, intervient lorsque la pression artérielle au niveau du tronc cérébral atteint des valeurs critiques, au cours d'une hémorragie importante par exemple. Les récepteurs adrénergiques vasculaires α_2 activés par les catécholamines plasmatiques et les récepteurs adrénergiques neuronaux α_1 post-synaptiques activés par la libération pré-synaptique de noradrénaline induisent une augmentation globale de la résistance périphérique (Persson PB., 1996).

D'autres mécanismes mis en œuvre à moyen terme, tels que le stress vasculaire et le système de transfert liquidien transcapillaire participent à la régulation de la pression artérielle. Toutefois, leurs capacités de régulation sont plus limitées (figure 20).

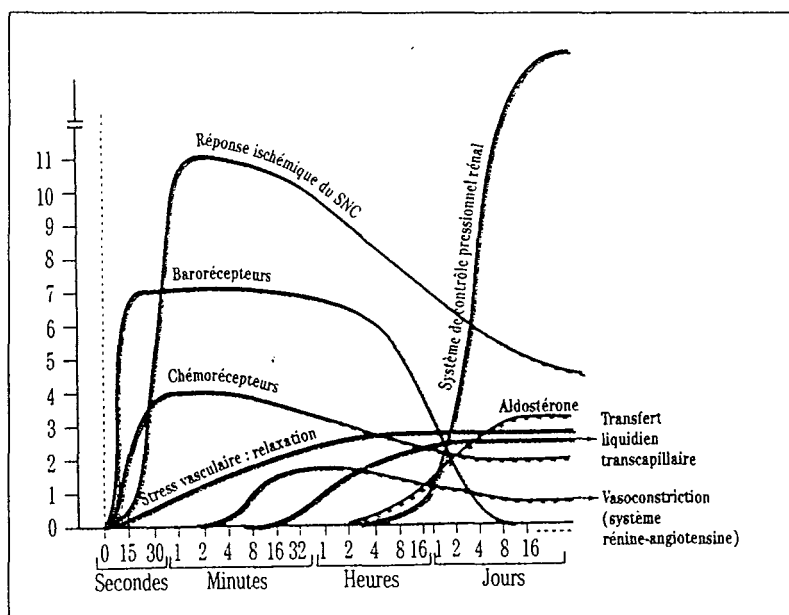


Figure 20. Intensité et durée de réponse des principaux mécanismes de régulation de la pression artérielle. D'après Monod T. Mécanismes de régulation de la pression artérielle. *L'essentiel Euthérapie* 1996;3:5-7.

4 - Système de contrôle pressionnel rénal : le système rénine-angiotensine-aldostérone

Ce système rénal de régulation de la pression artérielle est très étroitement intriqué avec l'homéostasie sodique. Il est stimulé entre autres par une baisse de pression artérielle et contribue à la régulation à moyen et long terme (figure 20).

La rénine sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire du rein dégrade l'angiotensinogène, produit hépatique, en angiotensine I, transformée par l'enzyme de conversion en angiotensine II. L'angiotensine II entraîne un ensemble de réactions visant à élever la pression artérielle (vasoconstriction rénale artériolaire, stimulation surrénalienne avec sécrétion de catécholamines et d'aldostérone, stimulation de la réabsorption liquidienne intestinale, action sur les centres de la soif). L'aldostérone, minéralocorticoïde sécrété par stimulation surrénalienne, augmente la réabsorption de sodium et d'eau au niveau tubulaire distal, favorisant ainsi une augmentation de la volémie et donc une élévation de la pression artérielle (Guyton AC., 1991).

5 - Régulation locale par l'endothélium vasculaire

De multiples mécanismes locaux participent à la régulation du tonus vasculaire aux niveaux artériel et artériolaire, visant à adapter le diamètre des vaisseaux à l'apport d'oxygène. Des substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices sont synthétisées par les cellules endothéliales vasculaires et assurent un équilibre permanent du tonus vasomoteur basal en réponse à des stimuli mécaniques et humoraux aboutissant à la synthèse de seconds messagers qui vont agir sur les cellules musculaires lisses sous-jacentes (figure 21).

5.1 - Tonus vasodilatateur

5.1.1 - *Le monoxyde d'azote (NO)*

En 1980, R. Furchgott et J. Zawadski ont montré que la relaxation induite par des substances vasodilatatrices telles que l'acétylcholine est assurée par l'EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), sécrété par des cellules endothéliales *in vitro* (Furchgott RF. *et al.*, 1980). Sept années plus tard, S. Moncada et son équipe ont établi que l'EDRF est en fait le monoxyde d'azote en montrant l'identité des deux composés en termes de stabilité chimique, d'activité biologique, d'inactivation par l'hémoglobine et de potentialisation par la superoxyde dismutase (Palmer RMJ. *et al.*, 1987). Discutée par certains auteurs, la similitude des deux molécules a fait l'objet d'une mise au point en 1994 et a permis d'écarter les hypothétiques candidats à la fonction vasodilatatrice de l'EDRF (Feelisch M. *et al.*, 1994). NO est synthétisé en petites quantités (pmol/min par mg de protéine d'homogénat) dans les

cellules endothéliales par l'isoforme III de la NO synthase (EC 1.14.13.39) ou NOSe (Förstermann U. *et al.*, 1994 ; Lincoln J. *et al.*, 1997). Il s'agit d'une dioxygénase de 133 kD de masse moléculaire contenant un noyau hème. Cette enzyme spécifique des cellules endothéliales est constitutive et son action est régulée par les ions calcium (Ca^{2+}) et la calmoduline (Förstermann U. *et al.*, 1994). NO est formé par oxydation d'un atome d'azote du groupement guanidique de la L-arginine (figure 22), substrat stéréospécifique de l'enzyme comme l'ont montré des études avec plusieurs analogues structuraux de l'acide aminé (Palmer RMJ. *et al.*, 1988 ; MacAllister RJ. *et al.*, 1996).

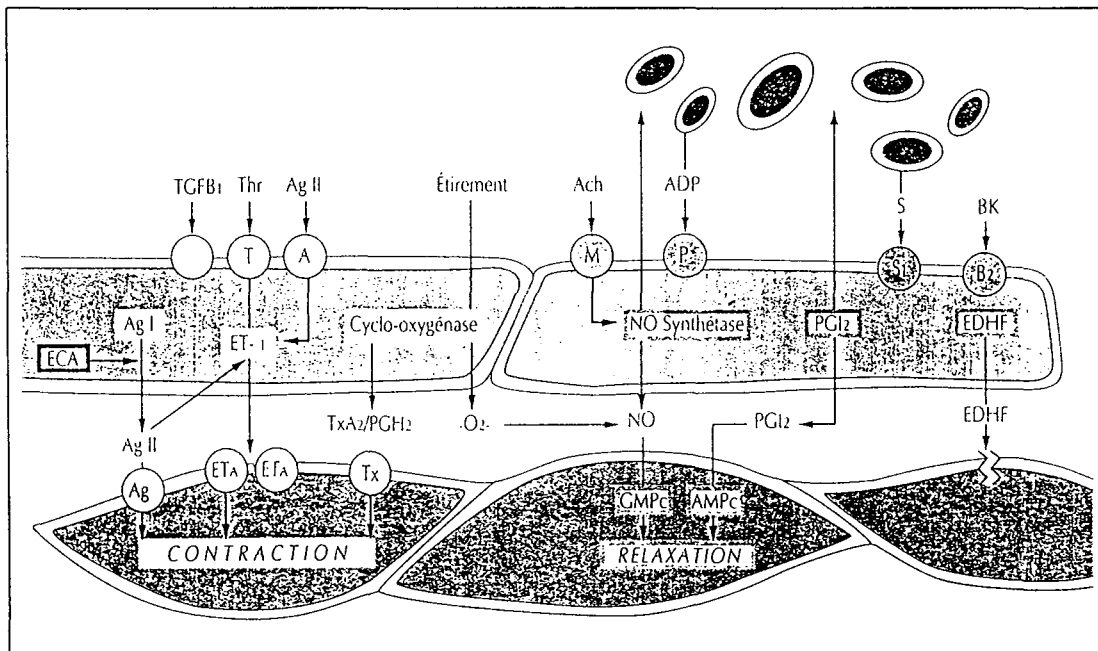


Figure 21. Régulation du tonus vasomoteur par l'endothélium vasculaire. D'après : Gros plan sur la fonction endothéliale. Parke-Davis, département cardio-vasculaire, 1996, p.7 (réf. 1150293).

TGFβ1 : Transforming Growth Factor β . *Thr* : thrombine. *Ag I* : Angiotensine I. *Ag II* : Angiotensine II. *Ach* : Acétylcholine. *ET-1* : Endothéline-1. *ADP* : Adénosine Diphosphate. *S* : Sérotonine. *BK* : Bradikinine. *PGI₂* : prostacycline. *EDHF* : Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor. *TxA₂* : Thromboxane A₂. *PGH₂* : prostaglandine H₂. *NO* : monoxyde d'azote. *O₂⁻* : anion superoxyde. *Tx* : récepteur thromboxane. *T* : récepteur thrombine. *A* : récepteur de l'angiotensine. *M* : récepteur muscarinique. *P* : récepteur purinique. *S1* : récepteur sérotonine. *B2* : récepteur bradykinine. *ECA* : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine.

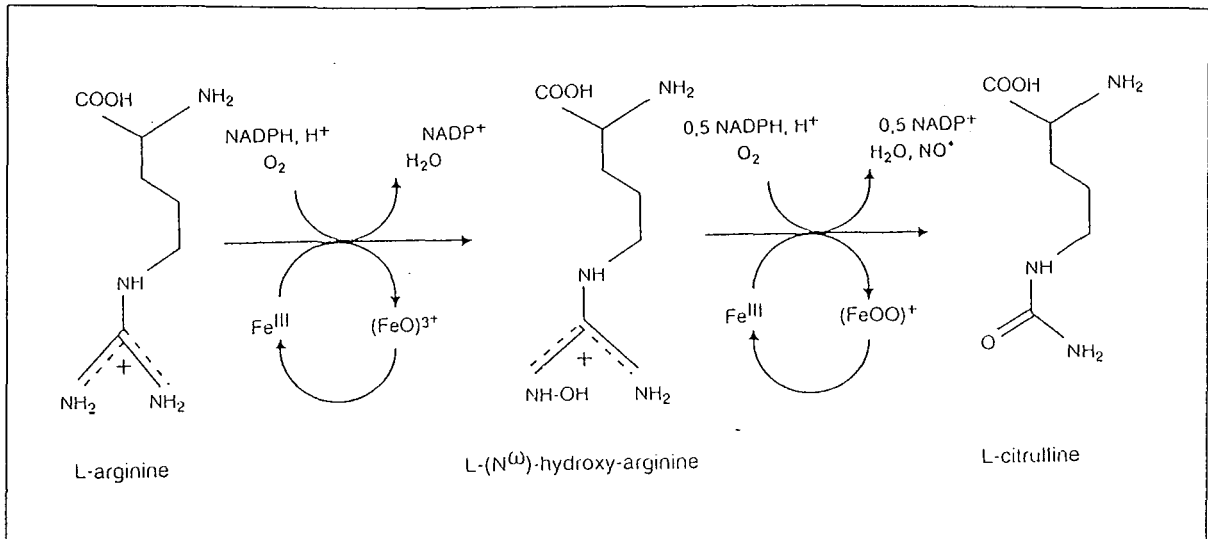


Figure 22. Mécanisme chimique de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) par la NO synthase. D'après Ducrocq C, Guissani A, Tenu J-P, Henry Y. Chimie et biochimie du monoxyde d'azote. I- Synthèse. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1994;6:441-447.

Les analogues stériques de la L-arginine sont de puissants inhibiteurs de l'enzyme utilisés comme outils pharmacologiques pour inhiber l'effet relaxant de NO (Moncada S. *et al.*, 1991 ; MacAllister RJ. *et al.*, 1996). La synthèse de NO nécessite la présence de cosubstrats : O₂ et NADPH. La régulation de cette synthèse est en partie assurée par NO qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la NOS (Förstermann U. *et al.*, 1994 ; Rengasamy A. *et al.*, 1993).

Synthétisé dans les cellules endothéliales, NO diffuse soit vers la lumière du vaisseau où il peut être capté par les plaquettes et inhiber alors leur agrégation et leur adhésion au vaisseau, soit dans les cellules musculaires lisses sous-jacentes où il participe à la régulation du tonus vasomoteur basal (Moncada S. *et al.*, 1991 ; Lincoln J. *et al.*, 1997). Dans les cellules musculaires lisses, NO se lie avec son récepteur, l'atome de fer du noyau hème de la guanylyl cyclase. Cette liaison provoque une déformation de l'hème qui active la production de GMP cyclique (GMPc) à partir de GTP. L'augmentation de la concentration intracellulaire de GMPc conduit à une diminution du taux de calcium intracellulaire et par cela à une diminution du tonus vasculaire responsable de la vasodilatation (Moncada S. *et al.*, 1991 ; Ignarro LJ. *et al.*, 1991). Ce mécanisme de contrôle du tonus basal des vaisseaux est déclenché par des stimuli tels que la fixation d'agonistes aux récepteurs endothéliaux et principalement par les forces de cisaillement qu'exerce le sang en mouvement sur la paroi endothéliale ; c'est le phénomène de débit-dépendance (figure 23) (Joannides R. *et al.*, 1995 ; Cabrera C. *et al.*, 1995).

L'adaptation des débits sanguins locaux par le monoxyde d'azote fait intervenir par ailleurs l'hémoglobine *S*-nitrosylée, formée par fixation de NO à l'hémoglobine oxygénée (sous forme R) au niveau pulmonaire (voir paragraphe *Structure et fonctions de l'hémoglobine*, figure 6).

Le monoxyde d'azote n'exerce pas uniquement une action vasodilatatrice directe, il peut également moduler la synthèse d'autres facteurs impliqués dans la régulation du tonus vasomoteur. Il peut exercer par exemple un effet inhibiteur sur la libération de rénine ou d'endothéline (Fenoy FJ. *et al.*, 1995 ; Rubinstein I. *et al.*, 1995 ; Richard V. *et al.*, 1995).

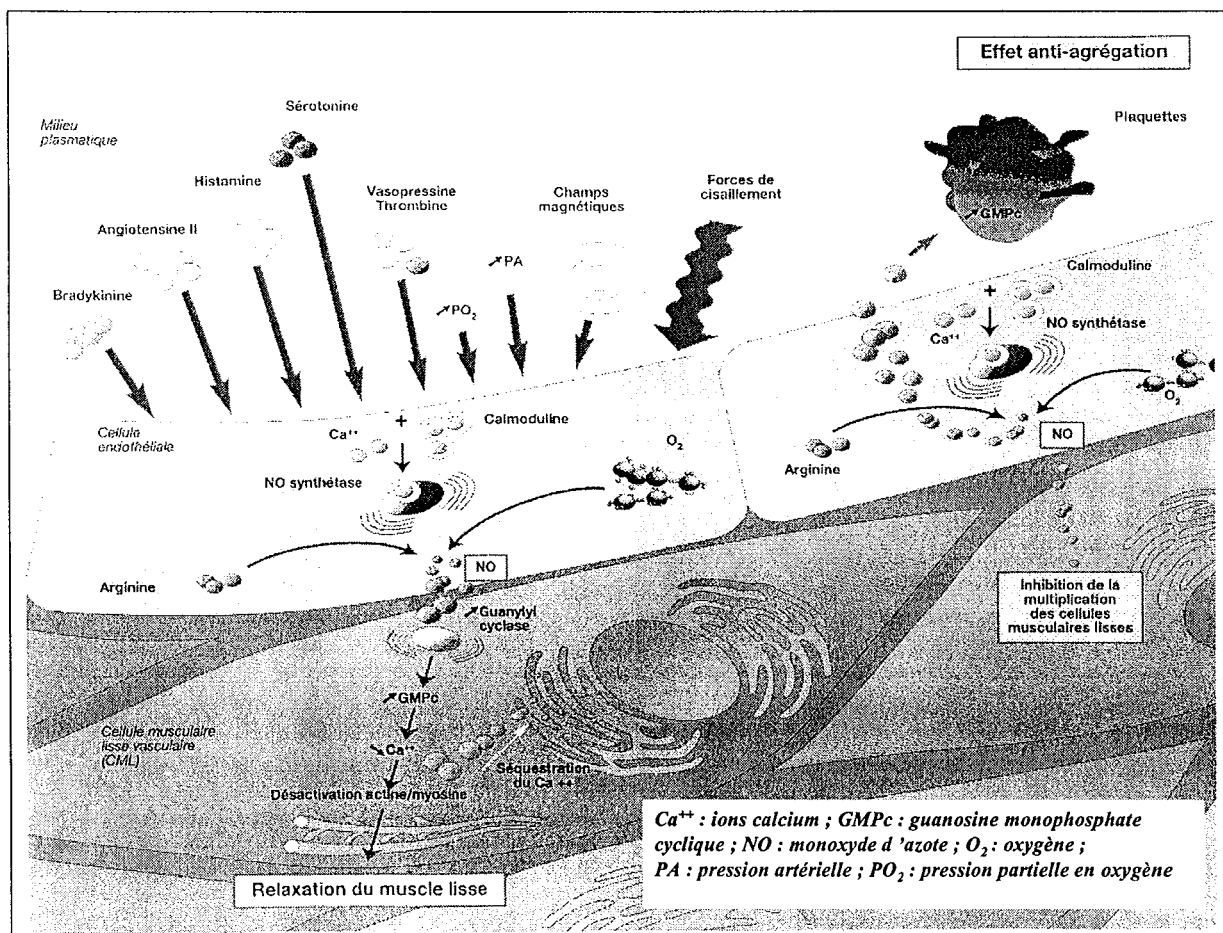


Figure 23. Mécanismes d'induction de la synthèse du monoxyde d'azote dans la cellule endothéliale et de son action sur la cellule musculaire lisse. D'après : Le NO. *Actualités Innovations-Médecine* 1997;38:23.

La relaxation de l'endothélium n'est pas limitée à l'action du monoxyde d'azote et d'autres substances vasodilatatrices sont synthétisées par les cellules endothéliales vasculaires, comme nous allons le voir dans les prochains paragraphes.

5.1.2 - La prostacycline (PGI₂)

Ce dérivé de l'acide arachidonique métabolisé par la voie de la cyclo-oxygénase est synthétisé par les cellules endothéliales vasculaires et produit une relaxation des cellules musculaires lisses par un mécanisme différent de celui de NO. La prostacycline se lie à l'adénylyl cyclase et stimule la synthèse d'AMP cyclique (AMPc) par les cellules musculaires lisses dont l'augmentation de concentration intracellulaire conduit à la relaxation vasculaire (Shireman PK. *et al.*, 1996).

De même que pour le monoxyde d'azote, la libération de prostacycline répond à des stimuli mécaniques et humoraux (figure 21). Il existe ainsi un couplage entre la production de NO et celle de prostacycline dont l'importance relative varie selon les lits vasculaires (Shireman PK. *et al.*, 1996 ; Michel JB., 1997).

5.1.3 - Le(s) facteur(s) hyperpolarisant dérivé(s) de l'endothélium (EDHF)

En plus de ces mécanismes agissant sur le taux de nucléotides cycliques dans la cellule musculaire lisse, il existe un ou plusieurs facteurs pouvant induire la relaxation vasculaire par hyperpolarisation de la membrane des cellules musculaires lisses (figure 21). L'identification de cette substance diffusible baptisée EDHF (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor) est rendue difficile du fait de sa demi-vie très courte. Son activité fut révélée par la persistance d'une relaxation vasculaire, en réponse à l'acétylcholine, après inhibition conjointe des voies de la NO synthase et de la cyclo-oxygénase (De Mey *et al.*, 1982). L'EDHF agit par stimulation des canaux potassiques de la membrane des cellules musculaires lisses (Féléto M. *et al.*, 1996). La contribution de l'EDHF au maintien du tonus vasomoteur basal est comparativement plus importante dans la microcirculation que dans les artères de gros calibre (Féléto M. *et al.*, 1996).

5.2- Tonus vasoconstricteur

5.2.1 - L'endothéline-1 (ET-1)

En 1988, M. Yanagisawa parvint à extraire de cellules endothéliales d'aorte porcine en culture un peptide aux propriétés vasoconstrictrices très importantes, mises en évidence sur l'artère coronaire porcine (Yanagisawa *et al.*, 1988). Ce peptide de 21 acides aminés (figure 24), appelé endothéline-1 (ET-1), est synthétisé à partir d'un précurseur, la pré-endothéline-1. La pré-proET-1 est clivée par une protéase en bigET-1, qui est convertie en ET-1 par action d'une enzyme de conversion de l'endothéline (ECE). La pré-proET-1 est

exprimée sous l'effet de stimuli d'hormones vasopressives (angiotensine II, adrénaline) et des forces de cisaillement exercées par le sang (Kanaide H., 1996). Deux isoformes de l'ET-1 furent identifiées par la suite, ET-2 et ET-3. Les trois isoformes sont codées par des gènes différents mais sont synthétisées suivant le même processus enzymatique (Sokolovsky M., 1995).

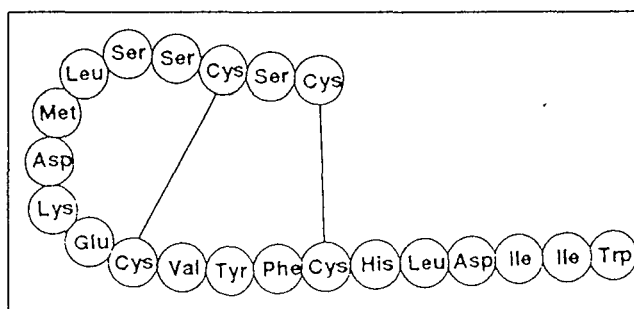


Figure 24. Structure primaire de l'endothéline-1. D'après Sokolovsky M., 1995.

Deux types de récepteurs à l'endothéline, ET_A et ET_B , ont été identifiés. Ils possèdent une identité structurale variant de 59% de similitude chez l'homme à 85% chez d'autres espèces de mammifères (Sokolovsky M., 1995). Les récepteurs ET_A situés sur les cellules musculaires lisses présentent une forte affinité pour l'ET-1 et leur stimulation provoque une vasoconstriction. Les récepteurs ET_B localisés sur les cellules endothéliales présentent une affinité semblable pour les trois isoformes d'endothéline et leur stimulation conduit aussi bien à une vasodilatation qu'à une vasoconstriction. La présence de ces deux types de récepteurs dans la paroi vasculaire permet d'expliquer le fait, apparemment paradoxal, qu'une injection d'ET-1 entraîne une vasodilatation à faible dose suivie d'une vasoconstriction dose-dépendante (Kanaide H., 1996). Il existe actuellement des antagonistes sélectifs des récepteurs ET_A et ET_B , mais la participation des récepteurs ET_B aux effets vasoconstricteurs de l'ET-1 a conduit certains groupes pharmaceutiques à mettre au point des antagonistes mixtes ET_A/ET_B , tels que le bosentan (RO-470203, Clozel M. *et al.*, 1994).

Dans les cellules musculaires lisses, le mécanisme d'action de l'ET-1 est complexe et fait intervenir une cascade de signaux. Après liaison à son récepteur couplé à une protéine G membranaire, l'ET-1 active la phospholipase C qui hydrolyse le phospho-inositol en deux seconds messagers, l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et le diacyl-glycérol (DAG). L' IP_3 provoque la mobilisation d'ions Ca^{2+} intracellulaires et l'afflux d'ions Ca^{2+} extracellulaires, le DAG induit l'activation de la protéine kinase C. Ces deux mécanismes aboutissent conjointement à la contraction vasculaire. Des mécanismes faisant intervenir la phospholipase

D et la phospholipase A_2 qui convertit l'acide arachidonique en thromboxane A_2 et prostaglandine E_2 , contribuent également à la vasoconstriction (figure 25).

Le dosage plasmatique de l'ET-1 ne reflète pas parfaitement sa concentration dans la paroi vasculaire, car l'ET-1 est rapidement métabolisée et peut être synthétisée par la cellule musculaire lisse.

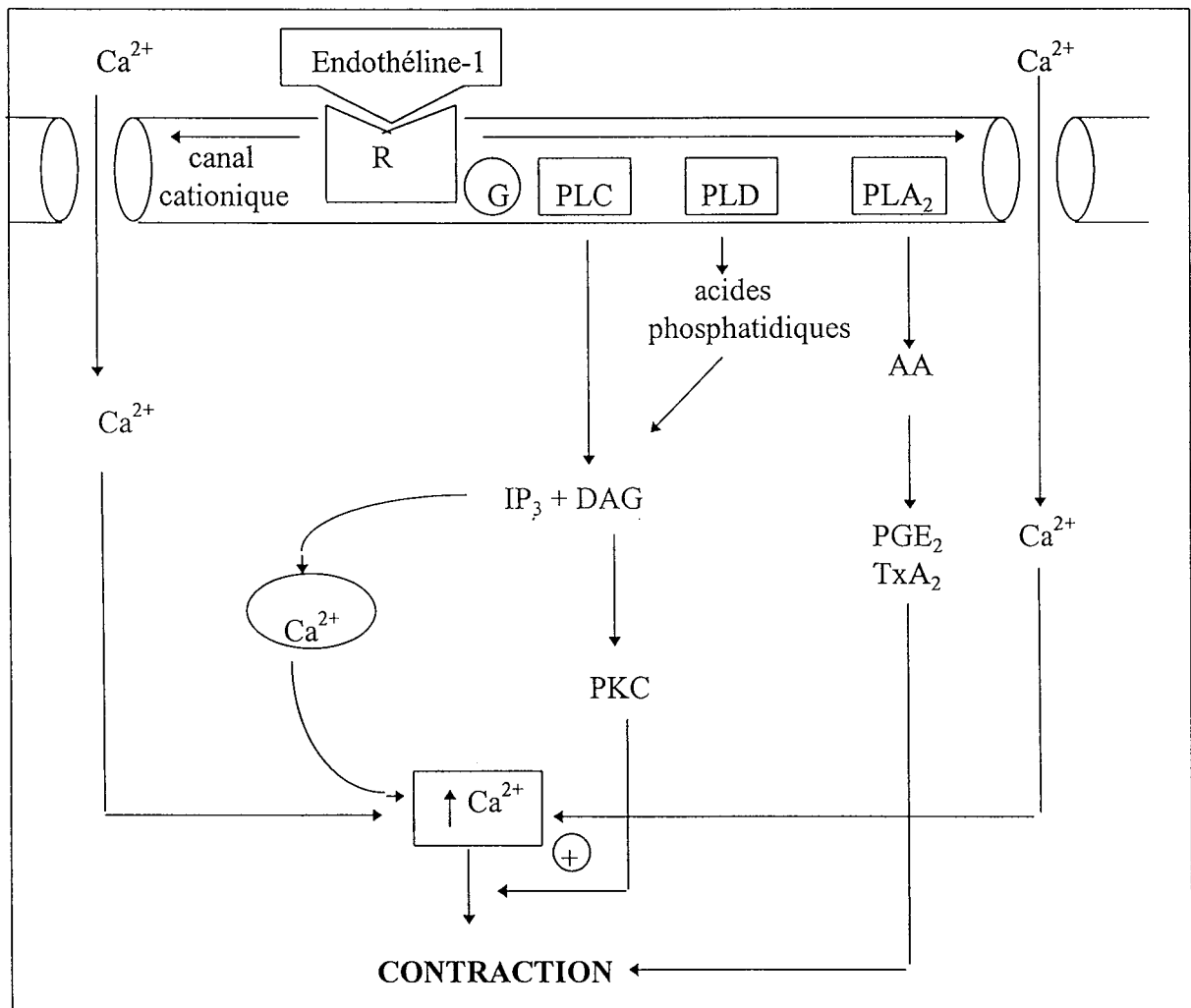


Figure 25. Signaux intracellulaires activés par la liaison de l'endothéline-1 à ses récepteurs membranaires dans les cellules musculaires lisses vasculaires. D'après Sokolovsky M., 1995. Ca^{2+} : ions calcium. R : récepteur à l'endothéline-1. PLC : phospholipase C. PLD : phospholipase D. PLA₂ : phospholipase A₂. AA : acide arachidonique. IP₃ : inositol 1,4,5-triphosphate. DAG : diacyl-glycérol. PGE₂ : prostaglandine E₂. TxA₂ : thromboxane A₂. PKC : protéine kinase C.

5.2.2 - Le système rénine-angiotensine local

Une quantité importante de l'enzyme de conversion de l'angiotensine se trouve dans les cellules endothéliales vasculaires. L'endothélium joue un rôle essentiel dans l'activation locale de l'angiotensine I en angiotensine II, qui exerce un effet vasoconstricteur direct en se

liant à des récepteurs spécifiques localisés sur les cellules musculaires lisses. L'angiotensine II peut, de plus, stimuler la production d'ET-1 et de radicaux libres comme les anions superoxyde (Dohi Y. *et al.*, 1992). L'enzyme de conversion de l'angiotensine peut également moduler la présence de bradykinine, facteur provoquant une relaxation endothélium-dépendante (par libération de NO, de prostacycline et d'EDHF), en la dégradant en peptides inactifs.

5.2.3 - Les dérivés de l'acide arachidonique

La cellule endothéliale peut synthétiser des vasoconstricteurs, tels que le thromboxane A₂ et la prostaglandine H₂, produits de la voie de la cyclo-oxygénase, et les leucotriènes, produits de la lipo-oxygénase. Physiologiquement, il existe un équilibre entre la production de prostacycline et de thromboxane A₂ assurant le maintien du tonus vasculaire (Shireman PK. *et al.*, 1996 ; Davies MG. *et al.*, 1993).

5.2.4 - L'anion superoxyde

La cellule endothéliale peut également synthétiser des anions superoxyde (O₂⁻) qui provoquent la contraction de la cellule musculaire lisse, soit directement, soit indirectement par inhibition de la fonction vasodilatatrice de NO. Les anions O₂⁻ réagissent en effet avec le radical NO pour former des anions péroxynitrite ONOO⁻. A l'état physiologique, cette réaction est en compétition avec l'élimination des anions superoxyde par la superoxyde dismutase intracellulaire présente en forte concentration (Beckman JS. *et al.*, 1996). Les anions superoxyde ne participent pas au tonus vasomoteur basal mais leur implication est importante dans certaines conditions pathologiques, telles que l'ischémie-reperfusion.

Parmi les éléments impliqués dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire, certains sont susceptibles de voir leur production ou leur activité biologique modifiée en présence d'hémoglobine acellulaire plasmatique. Ces changements aboutissent à une rupture de l'équilibre entre l'action des facteurs relaxants et contracturants, conduisant à un accroissement du tonus vasoconstricteur.

III - INTERACTIONS DE L'HEMOGLOBINE ACELLULAIRE AVEC CERTAINS ACTEURS DE LA REGULATION DU TONUS VASOMOTEUR

L'utilisation de modèles expérimentaux d'anneaux d'artères mis en présence d'hémoglobine acellulaire a permis de mettre en évidence l'effet vasoconstricteur de l'hémoprotéine extraite du globule rouge. En 1985, Martin W. *et al.* ont démontré que l'hémoglobine bovine acellulaire inhibe l'effet vasorelaxant de l'acétylcholine sur des anneaux d'aorte de lapin (Martin W. *et al.*, 1985). En 1993, le même type d'expérience est réalisé par Collins P. *et al.* sur des anneaux d'artère coronaire de lapin perfusés avec de l'hémoglobine humaine (figure 26 ; Collins P. *et al.*, 1993).

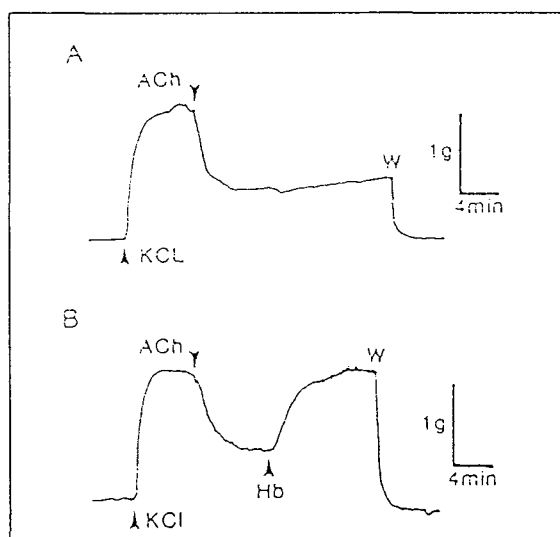


Figure 26. Graphes représentant la réponse à l'acétylcholine d'anneaux d'artère coronaire de lapin précontractés avec du KCl (30 mM), sans (A) et avec (B) perfusion d'hémoglobine humaine. D'après Collins P. *et al.*, 1993.

Ach : acétylcholine 10^{-7} M. *Hb* : hémoglobine humaine 10^{-6} M. *W* : lavage.

La majorité des études chez l'animal et des essais cliniques a confirmé l'action vasoconstrictrice de l'hémoglobine en solution dont la conséquence *in vivo* est une augmentation immédiate de la pression artérielle. Cet effet secondaire doit être impérativement éliminé ou tout au moins contrôlé pour que l'emploi des HBOCs soit envisageable à grande échelle. Différents mécanismes, plus ou moins bien élucidés, permettent aujourd'hui d'expliquer l'action vasoconstrictrice de l'hémoglobine et par conséquent de proposer des solutions pour y remédier. Nous avons choisi de présenter les trois mécanismes les plus fréquemment décrits dans la littérature, à savoir l'interaction de

l'hémoglobine avec certains facteurs endothéliaux, avec les récepteurs α -adrénergiques et avec la microcirculation.

1 - Interaction hémoglobine - facteurs endothéliaux

L'implication de l'endothélium vasculaire dans l'action vasoconstrictrice de l'hémoglobine fut mise en évidence dès 1986 dans les expériences de Martin W. *et al.* sur des anneaux d'aorte de lapin perfusés (Martin W. *et al.*, 1985). Les auteurs ont en effet montré que l'inhibition de la relaxation acétylcholine-dépendante par l'hémoglobine est abolie lorsque l'endothélium vasculaire est éliminé. Les deux facteurs endothéliaux généralement mis en cause sont le monoxyde d'azote et l'endothéline-1 ; leur interaction avec l'hémoglobine acellulaire est présentée dans les paragraphes qui suivent.

1.1 - Interaction de l'hémoglobine avec le monoxyde d'azote

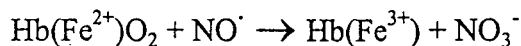
La découverte de la fonction vasodilatatrice du monoxyde d'azote (Palmer RMJ. *et al.*, 1987) a permis de suspecter l'implication de ce facteur endothélial dans l'action vasoconstrictrice de l'hémoglobine. En effet, depuis longtemps déjà, la grande réactivité de cette substance radicalaire avec l'hémoglobine était connue, comme en témoigne l'étude de Gibson QH. *et al.* publiée en 1957 (Gibson QH. *et al.*, 1957).

1.1.1 - Affinité de l'hémoglobine pour le monoxyde d'azote : bases moléculaires

En 1865, Hermann démontra la très forte affinité de NO pour l'hémoglobine, de l'ordre de 5 fois celle du monoxyde de carbone, soit une affinité 100 000 fois supérieure à celle de l'oxygène (Gibson QH. *et al.*, 1957). Cette forte affinité s'explique par la structure radicalaire du monoxyde d'azote qui lui confère une réactivité importante avec les métaux paramagnétiques tels que le fer contenu dans les groupements hémiques. Ainsi, le récepteur naturel de NO dans la cellule musculaire lisse sous-jacente à l'endothélium est la guanylyl cyclase, et plus particulièrement le groupement hémique de l'enzyme (figure 27). De la même manière, qu'il traverse la membrane des cellules musculaires lisses, NO diffuse aisément à travers la membrane érythrocytaire et réagit avidement avec le groupement hémique de l'hémoglobine.

Dans le sang artériel, la saturation en oxygène de l'hémoglobine intra-érythrocytaire est de 94 à 99% (figure 5) et de ce fait, NO réagit principalement avec l'hémoglobine sous forme oxygénée (oxyhémoglobine). La réaction de l'oxyhémoglobine (Fe^{2+}) avec NO aboutit

à la formation de nitrosylhémoglobine, rapidement convertie en anion nitrate (NO_3^-) et méthémoglobine (Fe^{3+}), à son tour réduite par le système de la méthémoglobine réductase du globule rouge en désoxyhémoglobine (Fe^{2+}) fonctionnelle (figure 7). La réaction se résume à l'équation :



En milieu biologique oxygéné, la durée de vie de l'intermédiaire réactionnel, la nitrosohémoglobine, est très courte, mais ce composé peut être détecté par résonance paramagnétique électronique (Eriksson LEG., 1994 ; Bemski G., 1997).

Le monoxyde d'azote peut aussi réagir avec la forme oxydée (Fe^{3+}) de l'hème et conduire à une autre forme oxydée d'hémoglobine (Fe^{4+}) ou ferrylhémoglobine (Goldman DW., 1998). Toutefois, ce type de réaction reste mineur dans les conditions physiologiques car le taux d'hémoglobine oxydée (Fe^{3+}) est faible et régulé par les systèmes de réduction érythrocytaires et plasmatiques.

Le monoxyde d'azote réagit également de manière physiologique avec les thiols des résidus cystéine β 93 de l'hémoglobine pour former des *S*-nitrosothiols impliqués dans la régulation des débits sanguins régionaux (voir paragraphe *Structure et fonctions de l'hémoglobine*, figure 6).

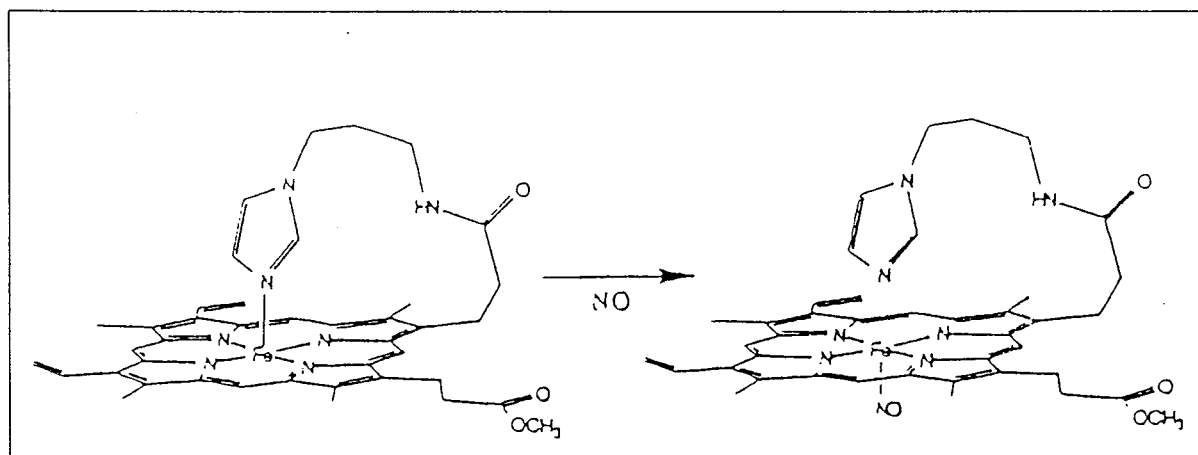


Figure 27. Modélisation de la fixation du monoxyde d'azote sur l'atome de fer ferreux (Fe^{2+}) de l'hème. D'après Duprat AF. *et al.* Myoglobin-NO at low pH: free four-coordinated heme in the protein pocket. *Biochemistry* 1995;34:2634-2644.

1.1.2 - Affinité de l'hémoglobine pour le monoxyde d'azote : conséquences physiologiques

Dans le cas d'une administration intraveineuse d'une solution d'hémoglobine acellulaire, l'ensemble de ces réactions se produira à une échelle beaucoup plus importante

dans le plasma, puisque l'hémoglobinémie peut atteindre 5 à 30 g/L (soit 1000 à 6000 fois les valeurs physiologiques).

Dans ces conditions, le piégeage de NO par l'hème de l'hémoglobine est massif et aboutit à une inhibition de la fonction vasodilatatrice NO-dépendante. L'interaction de l'hème avec NO est décrite dans la littérature comme la composante essentielle de la vasoconstriction systémique et de l'effet hypertenseur des HBOCs observés *in vivo* (Everse J. *et al.*, 1997 ; Katsuyama SS. *et al.*, 1994 ; Ulatowski JA, *et al.*, 1996b). Cette interaction est également à l'origine des modifications de la motricité œsophagienne dont la régulation est assurée par des cellules musculaires lisses (Murray JA. *et al.*, 1995). La mise en évidence de l'interaction NO-cystéine β 93 a soulevé l'hypothèse de l'implication de ce mécanisme dans la vasoactivité de l'hémoglobine (figure 6). Ainsi, Jia L. *et al.* ont montré, sur des anneaux d'aorte thoracique de lapin précontractés à la noradrénaline, l'implication conjointe de l'interaction de NO avec l'hème et avec les résidus cystéine β 93 de l'hémoglobine (Jia L. *et al.*, 1996). Pour ce faire, les auteurs ont bloqué alternativement chacun de ces groupements réactionnels et ont enregistré le pourcentage de relaxation des anneaux en réponse à l'acétylcholine. Les résultats ont montré que l'effet de l'interaction hème-NO est quantitativement plus important que celui de l'interaction cystéine β 93-NO (figure 28).

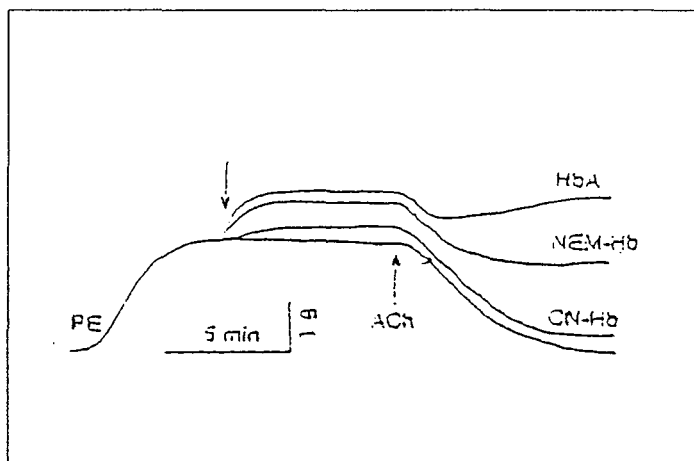


Figure 28. Réponse à l'acétylcholine d'anneaux d'aorte thoracique de lapins précontractés à la phényléphrine (PE) en présence d'hémoglobine humaine non modifiée (HbA), d'hémoglobine humaine dont les groupements thiol sont bloqués (NEM-Hb), et d'hémoglobine humaine dont les groupements hème sont bloqués (CN-Hb). D'après Jia L. *et al.*, 1996.

Dans une étude récente, Doherty DH. *et al.* ont synthétisé diverses hémoglobines recombinantes se différenciant par la réactivité des formes oxy- et désoxy- pour NO (Doherty DH. *et al.*, 1998). Par cette approche originale, les auteurs ont montré que les hémoglobines

possédant la plus faible affinité pour NO sont celles qui induisent le moins de variations de la pression artérielle moyenne chez le rat.

L'inhibition de la fonction vasodilatatrice de NO peut être contrôlée en administrant un donneur de NO ou de la L-arginine, substrat de la synthèse de NO. Les travaux réalisés notamment avec la DCLHb™ indiquent que ces opérations n'éliminent toutefois pas complètement l'effet vasoconstricteur de l'hémoglobine (Sharma AC. *et al.*, 1995b ; Katsuyama SS. *et al.*, 1994). Plus récemment, et au contraire de l'étude de Doherty DH. *et al.*, Rohlfis RJ. *et al.* ont montré dans un modèle d'échange transfusionnel chez le rat l'absence de relation entre l'affinité pour NO de diverses solutions d'hémoglobine modifiée chimiquement et les variations de pression qu'elles engendrent (Rohlfis RJ. *et al.*, 1998). Ceci suggère donc l'implication d'autres mécanismes dans l'action vasoactive de l'hémoglobine (figure 29).

1.2 - Interaction de l'hémoglobine avec le système de régulation par l'endothéline-1

L'influence de l'hémoglobine libre sur la fonction vasomotrice dépendante de l'ET-1 a tout d'abord été abordée *in vitro* sur des cellules endothéliales en culture. Selon les conditions expérimentales, incluant en particulier le type d'hémoglobine, les auteurs ont obtenus des résultats opposés. Simoni J. *et al.* ont observé une inhibition de la synthèse d'ET-1 par des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine en culture, en présence d'hémoglobine bovine native dont le fer est sous forme réduite (Fe^{2+}). Dans la même étude, les auteurs ont montré l'absence d'effet de l'hémoglobine polymérisée (sous forme réduite) et de l'hémoglobine native sous forme oxydée (Fe^{3+}) (Simoni J. *et al.*, 1995). Cocks TM. *et al.* ont à l'inverse observé une stimulation de la production d'ET-1 par des cellules endothéliales d'aorte thoracique bovine en culture, mises en présence d'oxyhémoglobine (Fe^{2+}) ou de méthémoglobine (Fe^{3+}) (Cocks TM. *et al.*, 1991). La divergence des résultats semble être le fait de la présence ou non d'une étape d'extraction de l'ET-1 avant son dosage, mais également de la source des cellules endothéliales utilisées.

Les connaissances de l'interaction hémoglobine-ET-1 *in vivo* sont encore limitées puisque l'identification de l'ET-1 est récente et que seules des études réalisées avec la DCLHb™ ont été publiées à notre connaissance. Ces études ont toutefois permis de mettre clairement en évidence la participation de l'ET-1 à l'effet vasoconstricteur de la DCLHb™ dans différents modèles expérimentaux et cliniques, par augmentation de sa synthèse ou de sa

libération (Gulati A. *et al.*, 1995 ; Gulati A. *et al.*, 1996 ; Gulati A. *et al.*, 1997 ; Saxena R. *et al.*, 1998). Si le mécanisme exact des effets cardio-vasculaires induits par cette solution d'hémoglobine reste encore à établir, il semble que celui-ci n'implique pas l'étape de conversion de la big-endothéline en ET-1 (Gulati A. *et al.*, 1995). Il a également été démontré que l'administration d'un antagoniste des récepteurs ET_A, le BQ-123, permet de diminuer l'effet vasoconstricteur de la solution, mais n'empêche pas l'augmentation du débit sanguin vers le cœur qu'elle engendre (Gulati A. *et al.*, 1996).

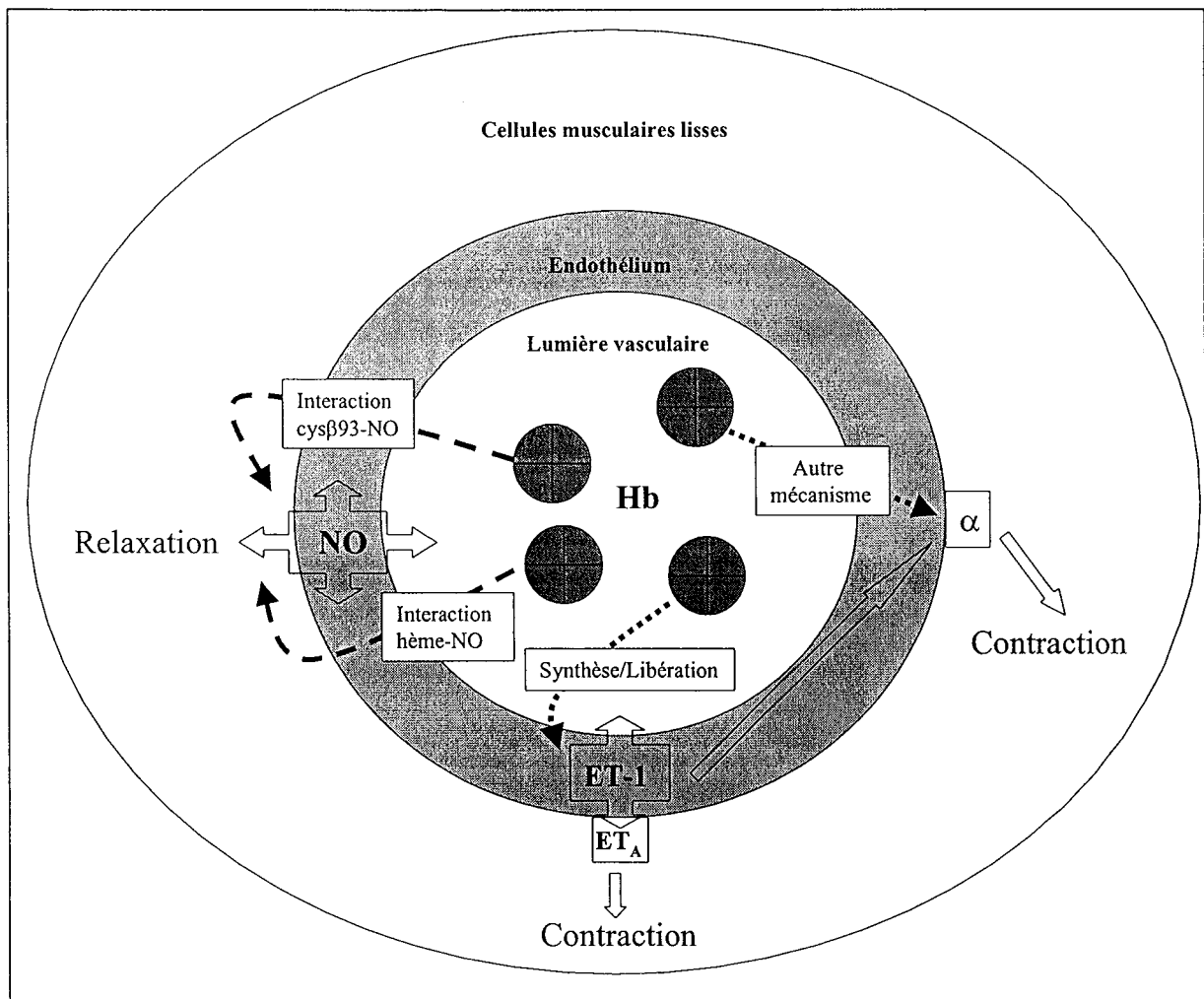


Figure 29. Représentation schématique des interactions de l'hémoglobine libre avec les mécanismes de régulation du tonus vasomoteur dans un vaisseau périphérique.

→ mécanismes physiologiques ; - - -▶ action stimulante de l'hémoglobine ;
 - - -▶ action inhibitrice par l'hémoglobine

Hb : hémoglobine; NO : monoxyde d'azote; ET-1 : endothéline-1; ET_A : récepteurs à l'endothéline-1; α : récepteurs α-adrénergiques

2 - Potentialisation de la réponse α-adrénergique vasculaire par l'hémoglobine acellulaire

De même que pour l'interaction entre hémoglobine et ET-1, peu d'études font état de l'action de l'hémoglobine sur le système α -adrénergique vasculaire périphérique. Les principaux travaux ont été effectués avec la DCLHb™ par l'équipe de A. Gulati. Ces auteurs ont démontré chez le rat que l'effet vasopresseur de cette solution n'implique pas le système nerveux central, mais qu'il est en partie dépendant du système vasculaire périphérique (Gulati A. *et al.*, 1994). La DCLHb™ potentialise en effet la réponse à des substances vasoconstrictrices comme l'adrénaline, la noradrénaline ou la clonidine, ce qui suggère une augmentation de la sensibilité des récepteurs α -adrénergiques vasculaires périphériques (Gulati A. *et al.*, 1994). Les mêmes auteurs ont montré que cette action vasopressive peut être annulée chez le rat par l'administration de prazosine, un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, ou de yohimbine, un antagoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques (Sharma AC. *et al.*, 1995a).

Le mécanisme de sensibilisation des récepteurs α -adrénergiques vasculaires périphériques pourrait faire intervenir la stimulation de la synthèse ou de la libération d'ET-1, qui possède un effet potentialisateur sur ces récepteurs (Sharma AC. *et al.*, 1995b).

L'implication d'autres mécanismes non encore définis est également probable (figure 29).

3 - Solutions d'hémoglobine et tonus microcirculatoire

Les bases de la théorie métabolique du contrôle local de la microcirculation indiquent que le tonus microvasculaire est couplé à la demande métabolique, afin de maintenir la PO_2 intracellulaire au-dessus du niveau critique entraînant une diminution de la production d'ATP par phosphorylation oxydative (Vallet B., 1995). Ainsi, un apport excessif en O_2 provoque une vasoconstriction artériolaire, une fermeture des capillaires et une diminution de la PO_2 . Ces mécanismes d'autorégulation sont décrits dans la figure 16.

Dans un modèle de hamster anesthésié, il a été montré que l'administration de DCLHb™, aussi bien en hypervolémie qu'en isovolémie, est suivie d'une réduction très transitoire du diamètre des plus petites artérioles (10-60 μm) et d'une diminution de leur vasomotricité dans les deux premières minutes (Nolte D. *et al.*, 1997a). Un retour rapide à la normale de ces paramètres, dû à la fonction d'autorégulation de la microcirculation visant à adapter les apports en O_2 à la demande tissulaire, a été observé. Les auteurs ont suggéré que ces phénomènes sont à l'origine de l'augmentation immédiate de pression artérielle induite

par la solution, ce qui permettrait en outre d'expliquer que la réponse est dose-indépendante. La persistance de l'hypertension serait due à l'accroissement de la résistance dans les artérioles de plus large diamètre, par diminution de leur capacité vasomotrice, sans vasoconstriction. Une seconde étude a permis de conclure que les effets de la DCLHbTM sur la vasomotricité microcirculatoire seraient dus à sa capacité de répartir de façon plus homogène la PO₂ dans les tissus et donc à une augmentation de la PO₂ (Nolte D. *et al.*, 1997b).

4 - Conclusion

Les origines des effets secondaires générés par l'injection d'hémoglobine acellulaire en solution dans le compartiment cardiovasculaire sont donc multiples. Même si la plupart des auteurs s'accorde à penser que l'action vasoconstrictrice des HBOCs est principalement le résultat de l'inhibition de la relaxation NO-dépendante des cellules musculaires lisses vasculaires, l'ensemble des mécanismes impliqués dans cette action n'est pas encore parfaitement compris. Des études expérimentales chez l'animal sont menées parallèlement aux investigations cliniques afin de mieux cerner ces mécanismes et d'être en mesure de proposer des solutions aux effets délétères de certains HBOCs. Pour ce faire, divers modèles expérimentaux permettant d'appréhender la fonction vasomotrice sont utilisés et décrits dans la littérature. La présentation des principaux modèles fait l'objet du prochain chapitre.

IV - PRINCIPAUX MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DE L'ACTION DE L'HEMOGLOBINE DANS LE COMPARTIMENT VASCULAIRE

Le comportement tonique des vaisseaux en présence d'hémoglobine est abordé expérimentalement par diverses techniques, allant de mesures *in vitro* sur des portions de vaisseaux, à des mesures hémodynamiques (pression, débit et résistance) et/ou morphométriques (diamètre) sur l'organisme entier.

1 - Techniques *in vitro*

De nombreux auteurs ont utilisé des modèles de vaisseaux isolés pour mettre en évidence les bases moléculaires de l'action vasoconstrictrice des solutions à base d'hémoglobine.

1.1 - Vaisseaux isolés immergés

Le modèle consiste en la mesure des variations de tension circumférentielle d'une portion de vaisseau placée en milieu physiologique, en réponse à l'ajout de substances d'intérêt pharmacologique dans le milieu. La portion de vaisseau est fixée par un système d'ancrage permettant de régler une tension de repos et est reliée par le haut à un tensiographe (type myographe) par l'intermédiaire d'un système de fils selon le schéma proposé en figure 30. Différents types de vaisseaux peuvent être étudiés, artères ou veines, avec pour seule contrainte une taille minimale à respecter.

Cette technique permet d'appréhender les mécanismes physiologiques de la circulation au niveau structurel le plus simple, en faisant abstraction des phénomènes de régulation de l'organisme. L'étude sur des vaisseaux désendothélialisés (par voie mécanique ou chimique) permet de distinguer les mécanismes dépendants de l'endothélium des mécanismes indépendants. Le modèle permet en outre de réaliser des études dose-réponse en administrant des doses croissantes de substance dans le milieu. A titre d'exemple, la découverte de l'EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), depuis identifié au monoxyde d'azote, fut faite grâce à ce modèle expérimental sur des portions d'aorte thoracique de lapin (Furchgott RF. *et al.*, 1980).

Ce modèle expérimental a été largement exploité pour mettre en évidence l'action vasoconstrictrice de différents HBOCs comme en témoignent les nombreux articles y faisant

référence (Martin W. *et al.*, 1985 ; Toda N., 1990 ; Collins P. *et al.*, 1993 ; Greenburg AG. *et al.*, 1995 ; Frears W. *et al.*, 1995 ; Rioux F. *et al.*, 1995a ; Rioux F. *et al.*, 1995b ; Rioux F. *et al.*, 1996 ; Muldoon SM. *et al.*, 1996 ; Nakai K. *et al.*, 1996 ; Hart JL. *et al.*, 1997).

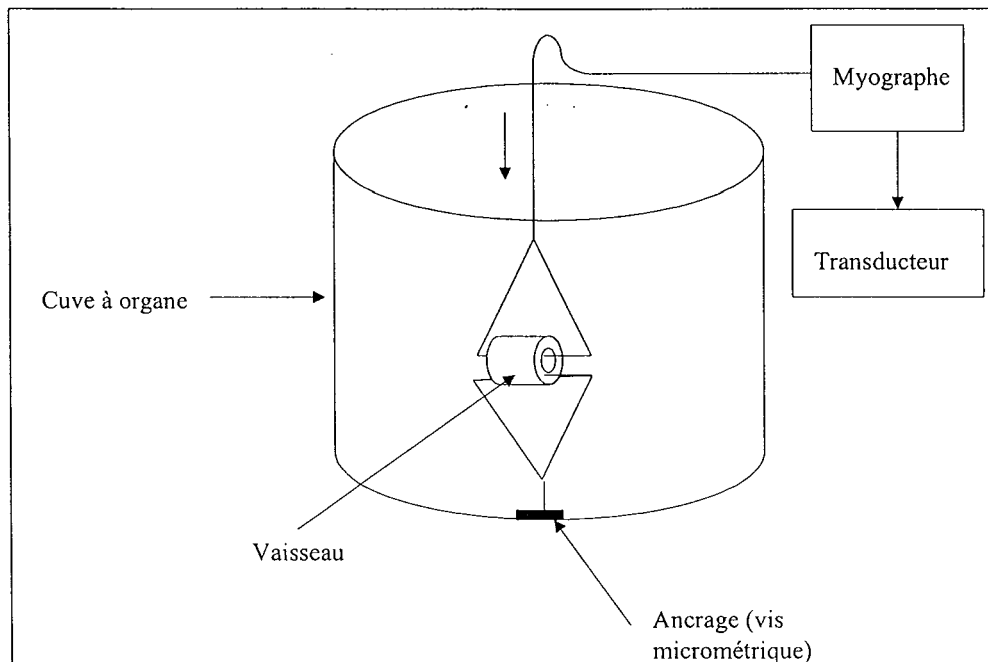


Figure 30. Schéma du montage d'un vaisseau isolé immergé.

1.2 - Vaisseaux isolés perfusés

Cette technique permet de suivre les modifications de diamètre interne d'un vaisseau perfusé en reconstituant *in vitro* des conditions physiologiques de débit et de pression. Les variations de diamètre sont suivies par un système vidéo en temps réel ou différé. Le montage implique l'utilisation de vaisseaux translucides, donc de petit calibre et contenant peu de fibres élastiques. La portion de vaisseau est cannulée à ses deux extrémités et placée dans une cuve à organes sous une tension appropriée (figure 31). Un système de perfusion servo-contrôlé permet d'adapter le débit et la pression à la taille du vaisseau pour respecter les contraintes hémodynamiques physiologiques. Dans ce montage, et contrairement à la technique précédente, la substance perfusée agit uniquement à la face luminale du vaisseau, ce qui permet de reconstituer *in vitro* une situation proche des conditions physiologiques. Cette méthode nécessite toutefois des volumes de solutions à perfuser plus importants que pour la méthode de vaisseau immergé. Ce modèle expérimental a notamment été utilisé par Rudolph AS. *et al.* dans une étude portant sur les effets de l'hémoglobine encapsulée qui a montré que ce type de produit possède une action vasoconstrictrice moindre que l'hémoglobine en solution (Rudolph AS. *et al.*, 1997).

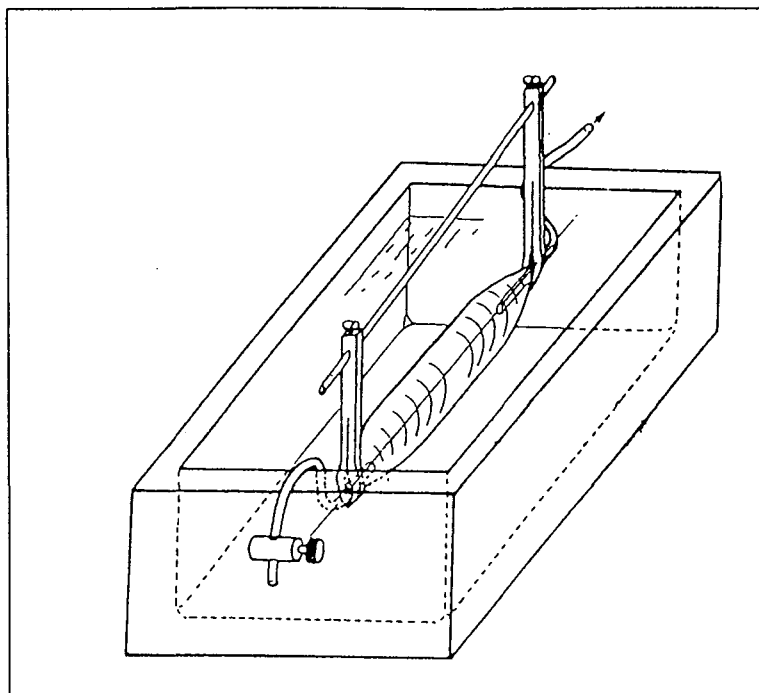


Figure 31. Schéma du montage d'un vaisseau isolé perfusé. D'après Swynghedauw B. Expérimentation animale en cardiologie. Ed. INSERM, 1987, p 94.

Ainsi, les mesures *in vitro* constituent une approche des phénomènes de vasomotricité engendrés par l'hémoglobine acellulaire au niveau d'organisation le plus simple. Les études à l'échelle des organes ou de l'organisme entier font appel à des mesures de pression et de débit, lesquelles permettent d'estimer les résistances circulatoires régionales ou systémiques. Sur les vaisseaux de plus gros calibre, des mesures de diamètre sont réalisables.

2 - Mesure de la pression artérielle

Chez l'animal, la mesure de la pression artérielle nécessite généralement l'introduction d'un cathéter relié à un capteur de pression, pour des raisons de précision et de simplicité d'utilisation. Le signal est recueilli sous forme d'onde de pression qui permet de déterminer la pression artérielle systolique, diastolique, pulsée et moyenne. Cette technique sera reprise plus en détail dans la partie expérimentale de notre travail.

Aussi bien chez l'animal que chez l'homme, ce paramètre est classiquement mesuré pour étudier l'effet vasoconstricteur des HBOCs dans le compartiment cardio-vasculaire. Toutefois, la pression artérielle moyenne étant le produit du débit cardiaque et de la résistance périphérique, l'interprétation d'une variation de pression comme conséquence d'une variation de résistance n'est possible qu'à débit cardiaque constant. La mesure conjointe de la pression artérielle moyenne et du débit cardiaque permet de calculer la résistance périphérique,

indicateur global de la fonction vasomotrice. Plusieurs techniques de détermination du débit sanguin sont utilisées en expérimentation animale pour analyser les effets des HBOCs.

3 - Mesure du débit sanguin

3.1 - Technique des microsphères

La mesure de débits sanguins par la technique des microsphères consiste à injecter des indicateurs détectables et quantifiables dans le compartiment intravasculaire. Des particules de différentes tailles et matières peuvent être administrées, mais les techniques les plus courantes font appel à des microsphères de plastique d'environ 10-20 µm de diamètre. Il existe deux grands types de marquage des microsphères, l'un basé sur l'utilisation de radioéléments (⁴⁶Sc, ⁹⁵Nb, ¹⁰³Ru, ¹¹³Sn, ¹²⁵I, ¹⁴¹Ce, ¹⁵³Gd,...), l'autre sur celle de colorants (Heymann MA. *et al.*, 1977 ; Bauer R. *et al.*, 1996).

La validité de la technique de mesure repose sur une répartition homogène des microsphères dans la circulation de telle sorte que les concentrations dans les différents lits vasculaires soient identiques. De plus, une capture complète et permanente des microsphères dans les compartiments vasculaires en aval du site d'injection est indispensable pour une quantification correcte des débits sanguins régionaux. Enfin, l'injection et la capture des particules dans le compartiment vasculaire ne doivent pas perturber la répartition des débits sanguins. En général, dans la plupart des espèces, 300 000 à 500 000 microsphères de 15 µm de diamètre peuvent être injectées par voie artérielle sans produire de modification aiguë ou chronique des paramètres hémodynamiques (Heymann MA. *et al.*, 1977).

La quantification s'effectue sur les tissus prélevés et pesés à un instant donné, par comptage de la radioactivité au moyen d'un compteur gamma ou par détermination spectrophotométrique, selon le type de marquage utilisé. Le débit sanguin absolu est calculé par la formule :

$$\text{débit}_{\text{tissu}} = \text{nbre de microsphères}_{\text{tissu}} \times \left(\frac{\text{débit}_{\text{référence}}}{\text{nbre de microsphères}_{\text{référence}}} \right)$$

et est exprimé en unités de volume par unités de temps et par gramme de tissu.

L'avantage principal de cette technique est de permettre la mesure simultanée du débit sanguin dans différents tissus et sur le même animal. Un grand nombre d'animaux est toutefois nécessaire dans le cas d'une étude temporelle. De nombreux travaux d'évaluation de la DCLHb™ ont été réalisés chez le rat au moyen de cette technique (Gulati A. *et al.*, 1994 ; Loeb A. *et al.*, 1997 ; Noone RB. *et al.*, 1998 ; Sharma AC. *et al.*, 1995b). La technique a

également été décrite chez le chat dans un modèle d'échange transfusionnel avec de l'hémoglobine bovine $\beta\beta$ -pontée (Ulatowski JA. *et al.*, 1996a ; Ulatowski JA. *et al.*, 1996b).

3.2 - Ultrasonographie Doppler pulsé

La mesure du débit sanguin par ultrasonographie est basée sur le principe de l'effet Doppler énoncé en 1843 par le physicien et mathématicien autrichien de ce nom. Selon Doppler, tout phénomène périodique propagé est perçu par le récepteur à une fréquence différente de sa fréquence d'émission lorsqu'il existe un déplacement relatif entre l'émetteur et le récepteur.

En pratique, on utilise un cristal piézoélectrique émetteur et récepteur qui envoie des ondes ultrasonores de manière pulsée en direction des globules rouges circulant dans un vaisseau. Ceux-ci réfléchissent les ondes et le cristal mesure la différence de fréquence entre l'onde émise et l'onde réfléchi. L'équation de Doppler montre que la vitesse du sang est proportionnelle à la différence de fréquence :

$$\Delta f = 2f_0 \cdot V \cdot \cos\theta / C$$

avec Δf : différence de fréquence Doppler; f_0 : fréquence d'émission; V : vitesse du sang; C : vitesse du son au sein du fluide; θ : angle formé par le faisceau ultrasonore et la direction d'écoulement du sang.

Pour que la linéarité entre Δf et V soit effective, deux conditions doivent être respectées :

- l'angle θ doit être constant, ce qui implique que la source ultrasonore soit fixe par rapport à la direction du sang. En pratique, cet angle θ mesure 45 degrés (figure 32).

- l'onde incidente doit atteindre les érythrocytes passant par le centre du vaisseau.

En effet, l'écoulement sanguin étant normalement laminaire, la vitesse est fonction du diamètre du vaisseau : elle est maximale en son centre et minimale le long de sa paroi (figure 18). Le positionnement du signal ultrasonore au centre du vaisseau est ajustable par l'expérimentateur au moyen d'une porte électronique réglable (figure 32).

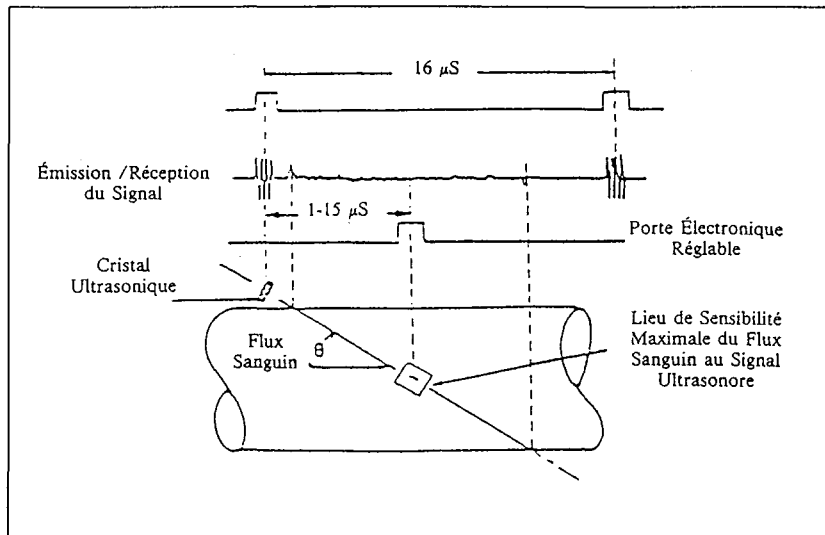


Figure 32. Principe de fonctionnement d'une sonde à effet Doppler pulsé en vue de la détermination de la vitesse sanguine dans un vaisseau. D'après Van Orden DE. *et al.*, 1984.

Pratiquement, le cristal est enchassé avec une gaine en forme de gouttière dont le diamètre interne est choisi en fonction de la taille du vaisseau à étudier et de façon à former un angle θ de 45° avec l'axe du flux sanguin. Deux fils conducteurs relient le cristal à un module Doppler pulsé calculant la vitesse du sang à partir de la différence de fréquence mesurée (figure 33). Ce même module permet de fixer la fréquence d'émission des ultrasons et leur fréquence de répétition. Dans le cas des petits vaisseaux (de 1 à 5 mm de diamètre), ces valeurs sont respectivement 20 MHz et 62,5 kHz (Hartley CJ. *et al.*, 1974 ; Haywood *et al.*, 1981 ; Van Orden DE. *et al.*, 1984).

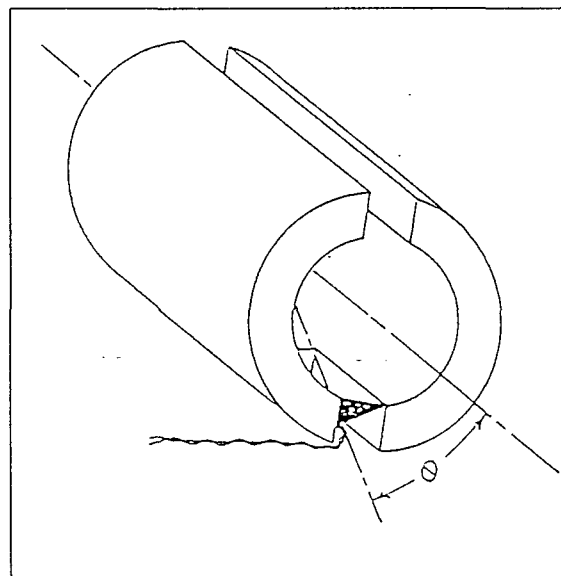


Figure 33. Représentation schématique d'une sonde Doppler. D'après Hartley CJ. *et al.*, 1974.

Le débit sanguin peut être calculé selon l'hypothèse que le profil d'écoulement du sang est laminaire, la sonde étant positionnée à 45° sur une portion rectiligne du vaisseau distante de toute ramification. Dans ces conditions, le profil de vitesse du flux sanguin est supposé parabolique, la vitesse maximale étant située au centre du vaisseau (figure 18). Le débit sanguin (Q) est calculé d'après la formule suivante :

$$Q = 1,25 d^2 \Delta f$$

avec d : diamètre de la lumière du vaisseau (mm) et Δf : différence de fréquence Doppler (kHz) (CBI-8000 - Physiologic Research System - User Manual, Crystal Biotech, 1996, p.26-28).

Le choix de considérer a priori que le profil d'écoulement est parabolique (la vitesse moyenne est alors la moitié de la vitesse maximale ou axiale) n'est valable que pour un vaisseau large, lorsque le volume de mesure est bien placé au centre du vaisseau, où il rencontre la vitesse la plus élevée. Dans tous les autres cas (cas des vaisseaux les plus larges ou dans la majorité des vaisseaux, lors de la phase d'accélération systolique), ce choix conduit à une incertitude plus ou moins systématique. Sur un vaisseau large, le volume de mesure étant plus petit que la lumière, le signal obtenu donne une valeur supérieure à la moyenne vraie si le volume est bien placé au centre du vaisseau ou inférieure si le volume est placé au bord du vaisseau. Dès lors, il existe donc un risque de sur- ou sous-estimation de la vitesse moyenne. Si le vaisseau est de petit diamètre, donc lorsque le volume de mesure couvre en grande partie la lumière vasculaire, un coefficient de correction est introduit dans l'équation précédente qui devient :

$$Q = 0,817 d^2 \Delta f$$

Quoiqu'il en soit, les appareils de mesure tels que celui qui sera décrit dans la partie expérimentale de notre travail sont parfaitement utilisables pour transcrire des variations de débit dans le temps (application choisie par la plupart des auteurs), plutôt que pour fournir des valeurs absolues.

L'implantation sur l'animal de sondes de débitmétrie Doppler pulsé permet de réaliser des études temporelles (aiguës ou chroniques) des effets vasomoteurs de l'hémoglobine acellulaire. Dans ce type d'étude, les besoins en matériel vivant sont considérablement réduits par rapport à la technique des microsphères. Toutefois, l'utilisation de la technologie d'ultrasonographie à effet Doppler pulsé dans le cadre de l'évaluation des HBOCs est relativement marginale (et récente) au regard du nombre d'études publiées (Aranow JS. *et al.*, 1996 ; Dietz NM. *et al.*, 1997 ; Fischer SR. *et al.*, 1997 ; Sakai H. *et al.*, 1997).

3.3 - Débit sanguin microcirculatoire mesuré par laser-Doppler

La débitmétrie laser-Doppler est une méthode non invasive de mesure du débit sanguin tissulaire basée sur l'analyse de la différence de fréquence Doppler d'une lumière réfléchi par les éléments en mouvement du tissu. Un faisceau de lumière monochromatique de faible intensité émis par une diode laser et véhiculé le long de fibres optiques illumine, par l'extrémité d'une sonde de contact, la portion de tissu à étudier. La fréquence du faisceau laser réfléchi en direction de la sonde par les éléments réfléchissants du tissu est analysée par des algorithmes permettant de calculer le débit sanguin tissulaire exprimé en mL/min/100 g de tissu. Ces algorithmes servent à calculer la part de lumière réfléchi par les éléments immobiles et par les éléments en mouvement, essentiellement les érythrocytes.

La technique de débitmétrie laser-Doppler permet de refléter en continu la vasomotricité de l'ensemble des microvaisseaux de la portion de tissu étudiée. Cette technique est relativement peu décrite dans la littérature comme moyen d'investigation des effets des HBOCs sur le tonus vasomoteur microcirculatoire (Aranow JS. *et al.*, 1996; Gulati A. *et al.*, 1998).

3.4 - Débit sanguin microcirculatoire mesuré par analyse en microscopie intravitale

Le modèle mis au point par Endrich *et al.* sur le hamster permet de mesurer les paramètres hémodynamiques et les gaz du sang au niveau microcirculatoire par analyse d'une fenêtre cutanée par microscopie intravitale. Une petite surface cutanée pincée dans une chambre d'analyse implantée sur le dos de l'animal est illuminée et observée au moyen d'un microscope inversé muni d'un objectif à immersion. Le microscope relié à un système d'analyse d'images, permet d'étudier en temps réel ou différé le diamètre des microvaisseaux. La vélocité sanguine dans les artérioles est mesurée en temps réel au moyen d'une fibre optique et d'une photodiode. Le débit sanguin est calculé par combinaison des mesures de diamètre et de vélocité sanguine (Kerger H. *et al.*, 1997a).

Ce modèle a permis de mettre en évidence les effets de plusieurs HBOCs sur l'état vasomoteur des microvaisseaux et l'oxygénation tissulaire (Kerger H. *et al.*, 1997b ; Nolte D. *et al.*, 1997a ; Nolte D. *et al.*, 1997b ; Sakai H. *et al.*, 1998). En particulier, Nolte D. *et al.* ont montré que l'administration de DCLHbTM, aussi bien en hypervolémie qu'en isovolémie, est suivie d'une réduction du diamètre et d'une diminution de la vasomotricité très transitoires des plus petites artérioles (Nolte D. *et al.*, 1997a). Toutefois, ces résultats ne rendent compte

de l'évolution du débit sanguin qu'au niveau cutané et ne peuvent être extrapolés à tous les tissus car les mécanismes de régulation de la microcirculation diffèrent d'un territoire à l'autre.

4 - Conclusion

Ces divers modèles expérimentaux permettent d'étudier les effets des solutions d'hémoglobine acellulaire dans le compartiment cardio-vasculaire chez l'animal, et ce à différents niveaux structurels et fonctionnels. La complémentarité des modèles décrits dans la littérature permet de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les HBOCs exercent leur action vasoconstrictrice et ainsi de proposer des améliorations en vue de l'utilisation prochaine de ces produits chez l'homme. Toutefois, un même type de solution d'hémoglobine est souvent évalué par un nombre restreint de techniques ou de modèles expérimentaux, ce qui rend difficile une comparaison objective des effets secondaires de différents HBOCs. Notre travail a consisté en partie à mettre au point un modèle permettant de tester différentes solutions d'hémoglobine dans des conditions expérimentales identiques. L'utilisation de méthodes d'investigation alternatives, dont le but est de réduire le nombre d'animaux utilisés, n'a pu être envisagé, leur apport ne permettant pas de satisfaire aux objectifs de notre étude.

Partie expérimentale

INTRODUCTION A LA PARTIE EXPERIMENTALE

Ce chapitre a pour but de présenter la situation du sujet au laboratoire au début de notre doctorat et d'exposer les objectifs principaux que nous nous sommes fixés.

Nous tenons à préciser ici que les animaux utilisés dans les différentes études qui vont être présentées ont été manipulés selon l'éthique de l'expérimentation animale (Brugère H. *et al.*, 1992 ; Close B. *et al.*, 1996 ; Close B. *et al.*, 1997).

1. La situation du sujet au laboratoire

La préparation et la caractérisation physico-chimique d'un substitut érythrocytaire potentiel, ont été réalisées au laboratoire en collaboration avec Pasteur-Mérieux sérums & vaccins (Marcy-L'Etoile, France) depuis plusieurs années et ont abouti à la mise au point d'un conjugué d'hémoglobine humaine, l'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracarboxylate [Dellacherie E, Léonard M, Sacco D, Vigneron C. Dex-BTC-Hémoglobine oxygénée. Brevet EP 338916 (1992), Brevet USP 5 110 909 (1992)]. Son évaluation *in vivo* par des études pharmaco-toxicologiques a révélé, entre autres, le pouvoir oxyphorique, l'aptitude à maintenir en vie des animaux exsanguino-transfusés (jusqu'à 75% de la volémie) et, à l'instar des autres produits en cours de développement, l'effet vasopresseur de ce produit quelque soit l'espèce animale envisagée (Faivre B., 1993). A partir de ce dernier constat, les recherches du laboratoire se sont logiquement orientées vers l'analyse des effets vasoactifs induits par Hb-Dex-BTC et plus généralement par les transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine.

A cette époque, les connaissances sur l'effet vasoconstricteur des HBOCs était limitées et l'augmentation de pression artérielle semblait s'expliquer par l'interaction Hb/NO. Nous avons cherché une technique ou un modèle expérimental qui pourrait permettre de vérifier cette hypothèse et d'étudier le comportement de différents HBOCs. Pour ce faire, la technique d'ultrasonographie Doppler pulsé a été choisie comme moyen d'investigation de l'influence des solutions d'hémoglobine sur l'homéostasie cardiovasculaire. La première partie du travail a consisté à adapter la méthode décrite dans la littérature (Hartley CJ. *et al.*, 1974 ; Haywood *et al.*, 1981) au modèle animal utilisé au laboratoire, le cobaye. Le principe de la méthode a été présenté dans la partie bibliographique de ce travail et ne sera pas repris en détail ici. Pour la mise au point de la technique, nous avons tout d'abord recherché un vaisseau aisément

accessible et de taille adaptée au calibre des sondes commercialisées ; notre choix s'est porté sur l'artère carotide primitive.

Une étude préliminaire a permis de dégager les principales difficultés inhérentes à la technique et de dessiner les grandes orientations de notre travail de thèse. Les résultats et les conclusions issus de ce travail sont proposés dans le paragraphe suivant.

2. Etude préliminaire des effets hémodynamiques induits par des solutions d'hémoglobine acellulaire par ultrasonographie Doppler pulsé chez le cobaye anesthésié

Cette étude a consisté à suivre l'évolution de paramètres hémodynamiques (pression artérielle moyenne ou PAM, fréquence cardiaque, vitesse sanguine carotidienne moyenne, indice de résistance) au cours du temps, à la suite d'un choc hémorragique sévère et de son traitement isovolémique par différentes solutions (albumine sérique humaine, hémoglobine acellulaire non modifiée et Hb-Dex-BTC). L'instrumentation des animaux, les paramètres étudiés, le déroulement du choc hémorragique et de son traitement, et les caractéristiques physico-chimiques des solutions testées ont été décrits dans les articles présentés dans l'annexe 1.

Les principaux résultats indiquent que la restauration de la volémie par :

- le sang autologue permet un retour à la normale des valeurs de la PAM et de la vitesse sanguine carotidienne moyenne. Ce retour est accompagné d'une augmentation transitoire de l'indice de résistance (30% environ) ;
- la solution d'albumine assure le maintien des paramètres mesurés à la suite de la période hémorragique ;
- l'hémoglobine non modifiée provoque une augmentation de la PAM (avec un maximum de 40%) durant les 2 heures suivant la restauration de la volémie, un accroissement de la vitesse sanguine carotidienne moyenne (avec un maximum de 110%) et une augmentation de l'indice de résistance (avec un maximum de 20%) ;
- l'hémoglobine modifiée Hb-Dex-BTC induit une augmentation de PAM comparable à celle de l'hémoglobine native, sans modification significative de la vitesse sanguine carotidienne moyenne et de l'indice de résistance.

Ces observations ont permis de montrer que les deux solutions d'hémoglobine testées exercent un effet presseur en comparaison aux solutions de référence (sang et albumine), et confirment les résultats décrits dans la littérature. Toutefois, l'interprétation des modifications de vitesse sanguine et d'indice de résistance s'est révélée délicate du fait de l'intervention de nombreux paramètres autres que les seules propriétés vasoconstrictrices des solutions testées. Par exemple, les fortes variations de vitesse sanguine carotidienne en présence d'hémoglobine native pourraient s'expliquer par une combinaison de facteurs :

- les propriétés rhéologiques, dues à l'hémodilution avec une solution de viscosité plus faible que celle du sang total, contribueraient à favoriser l'écoulement du sang dans les vaisseaux (cf. relation de Poiseuille) ;
- la P_{50} plus faible de la solution (cf. Tableau 1, Caron A. *et al. Transfus.Clin.Biol.* 1995;2:453-462) ne permettrait pas une cession suffisante d'oxygène au niveau des territoires irrigués par l'artère carotide et conduirait, par auto-régulation, à une augmentation du débit sanguin visant à adapter la perfusion à la demande métabolique du cerveau.

La difficulté d'interprétation des modifications hémodynamiques observées et plus spécifiquement des variations de vitesse sanguine et d'indice de résistance, nous a conduit à proposer certaines améliorations à apporter au modèle expérimental. Les principaux points abordés sont exposés dans le paragraphe suivant.

3. Améliorations à apporter au modèle

3.1 - Choix de la solution témoin

Dans l'étude présentée au paragraphe précédent, nous avons d'emblée utilisé le propre sang de l'animal comme solution de référence. Ce choix pouvait s'avérer légitime au regard des faibles modifications de PAM, de FC et de vitesse sanguine carotidienne observées à la suite de la transfusion autologue. Toutefois, la réinjection de sang à l'animal ne permet pas de se placer dans une situation d'hémodilution puisque l'hématocrite après restauration de la volémie est plus élevé qu'en cas de traitement de l'hémorragie par une solution de substitution. Ceci permet notamment d'expliquer l'augmentation de l'indice de résistance que nous avons observée à la suite de la transfusion autologue (figure 4, Caron A. *et al. Transfus.Clin.Biol.* 1995;2:453-462). En effet, la résistance à l'écoulement est d'autant plus

élevée que l'hématocrite est important (Pries AR. *et al.*, 1998). Il est donc apparu nécessaire d'utiliser une solution témoin de viscosité proche de celle du plasma pour la suite de notre travail.

La solution d'albumine était classiquement choisie comme solution de remplissage vasculaire témoin du fait de certaines de ses propriétés physico-chimiques proches de celles de l'hémoglobine libre (voir tableau 1, Caron A. *et al. Transfus.Clin.Biol.* 1995;2:453-462). En particulier, sa masse moléculaire (68 kDa) est comparable à celle de l'hémoglobine tétramérique (64,5 kDa). Toutefois, les molécules d'albumine et d'hémoglobine n'ont pas la même forme tridimensionnelle et, de plus, l'hémoglobine libre a tendance à se dissocier en dimères lorsqu'elle est en solution alors que l'albumine ne se dissocie pas. L'argument de la masse moléculaire n'est par ailleurs pas valable si l'on étudie des solutions d'hémoglobine pour lesquelles la masse moléculaire de l'hémoprotéine est affectée significativement par les modifications chimiques (polymérisation, conjugaison). Dans cette situation, un succédané du plasma de masse moléculaire plus élevée devrait donc être préféré à l'albumine ; il pourrait s'agir de solutions de dextran, de gélatine fluide modifiée ou d'hydroxyéthylamidon.

3.2 - Choix du modèle d'hémodilution

Le traitement du choc hémorragique et l'échange transfusionnel sont deux modèles expérimentaux courants visant à mimer des situations cliniques potentielles durant lesquelles l'utilisation de transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine pourrait être requise.

Pour nous rapprocher d'une situation clinique justifiant l'utilisation d'HBOC (hypovolémie et oxygénation compromise), nous avons choisi dans cette étude de simuler une hémorragie sévère (50% du volume sanguin total) suivie de la restauration de la volémie par des solutions de remplissage vasculaire avec ou sans pouvoir oxyphorique. Toutefois, dans cette situation particulière d'hémodilution, les modifications hémodynamiques observées sont à la fois le fait de la réaction de compensation de l'organisme à l'état hypovolémique et celui de l'action vasopressive des solutions d'hémoglobine. En effet, à la suite de l'hémorragie, les animaux se trouvant dans un état de choc (mis en évidence par une forte augmentation de l'indice de choc, Caron A. *et al. Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 1999;27:49-64), des mécanismes de régulation à court terme sont mis en œuvre afin de maintenir la perfusion des organes principaux. La répartition du débit sanguin s'effectue alors prioritairement vers les organes vitaux (cerveau, foie, rein,...) par vasoconstriction

périphérique, notamment due à une libération accrue de catécholamines. Dans ces conditions, l'effet vasoconstricteur des solutions d'hémoglobine *per se* est donc difficile à évaluer et il est nécessaire de tenir compte des mécanismes vasoconstricteurs induits par l'hémorragie.

Pour s'affranchir de ce problème d'interprétation, nous envisagerons donc l'étude des effets cardiovasculaires des solutions d'hémoglobine dans un modèle d'échange transfusionnel partiel isovolémique, correspondant à une situation clinique telle que la circulation extra-corporelle.

3.3 - Choix des vaisseaux et des paramètres étudiés

Pour la mise au point de la technique d'ultrasonographie à effet Doppler pulsé chez le cobaye, nous avons choisi de travailler sur un vaisseau de calibre adapté à la dimension des sondes de mesure et aisément accessible, l'artère carotide primitive. Toutefois, un certain nombre de difficultés s'est posé lors de l'interprétation des enregistrements de vitesse sanguine du fait de ce choix.

Le caractère spécifique de la physiologie de la circulation carotidienne, et en particulier les phénomènes de régulation mis en œuvre pour adapter en permanence la perfusion à la demande métabolique du cerveau, rend délicat l'interprétation des variations de vitesse sanguine observées suite à l'injection de solutions d'hémoglobine. Nous nous proposons donc pour la suite de notre étude de disposer les sondes de mesure sur d'autres vaisseaux dont le choix sera détaillé plus loin dans la partie expérimentale de notre rapport (*"Adaptation du modèle à l'étude des effets cardiovasculaires induits par des solutions d'hémoglobine en situation d'hémodilution"*).

Sur l'artère carotide de cobaye, nous avons suivi l'évolution de la vitesse sanguine déterminée selon la formule de Doppler (voir partie bibliographique) :

$$\Delta f = 2f_0 \cdot V \cdot \cos\theta / C$$

Nous nous sommes heurtés, lors de l'analyse des enregistrements, à certaines difficultés venant du fait que la vitesse sanguine est dépendante de plusieurs facteurs dont notamment la viscosité du sang et le carré du rayon du vaisseau considéré. En effet, si l'on remplace dans la

formule de Poiseuille la résistance à l'écoulement R par le rapport $\Delta P/Q$ où ΔP est la différence de pression, Q , le débit, μ , la viscosité du sang, l et r , la longueur et le rayon du vaisseau, on aboutit à la relation suivante :

$$\Delta P/Q = \mu \cdot \frac{8.l}{\pi.r^4} \quad (\text{équation 1})$$

En remplaçant alors dans l'équation 1 le débit par le produit de la vitesse d'écoulement du sang et de la section du vaisseau ($Q = V.\pi.r^2$), on aboutit à la formule :

$$V = \mu.r^2 \cdot \frac{\Delta P}{8.l} \quad (\text{équation 2})$$

L'équation 2 indique que la vitesse d'écoulement du sang est proportionnelle à la différence de pression mais également à la viscosité du sang et au carré du rayon du vaisseau. La mesure simultanée du calibre vasculaire et de la vélocité sanguine permettrait donc de traiter les résultats en terme de débit sanguin absolu ($Q = V.\pi.r^2$) et ainsi de s'affranchir de certaines approximations nécessaires si l'on raisonne en terme de vélocité sanguine.

Pour la suite de notre travail, nous avons donc souhaité mettre au point un système ultrasonographique de mesure du diamètre vasculaire dont le principe sera développé plus loin. Il convient toutefois de noter que, du fait de la taille des cristaux de mesure commercialisés (1 mm² minimum), l'utilisation d'un tel matériel chez le cobaye a dû être écartée. Il a donc été nécessaire de transposer ce modèle expérimental préliminaire à un animal dont la taille permet de concilier ces impératifs techniques et une utilisation de solutions d'hémoglobine adaptée aux ressources du laboratoire ; le lapin néo-zélandais blanc a été choisi.

Enfin, le calcul de l'indice de résistance à partir de l'enregistrement de la vélocité sanguine carotidienne n'a permis qu'une évaluation approximative de l'état vasomoteur des vaisseaux dans leur ensemble. La valeur de ce paramètre est en effet influencée par les variations de la pression pulsée (Leftheriosis G. *et al.*, 1995). Ainsi, dans ce type d'étude, les variations de l'indice de résistance doivent être interprétées d'autant plus prudemment que l'administration d'hémoglobine en solution induit d'importantes modifications de la pression

artérielle. Une méthode de mesure des résistances plus adaptée à notre modèle sera donc proposée pour la suite de ce travail.

3.4 - Choix de l'anesthésique

La fragilité du cobaye rend son anesthésie délicate et limite les possibilités en matière de produits anesthésiants. Le choix de l'halothane comme anesthésique général s'est effectué dans la continuité des travaux précédemment effectués au laboratoire. Toutefois, l'effet hypotenseur de ce produit (Hart JL . *et al.*, 1993 ; Jing M. *et al.*, 1998) pourrait expliquer pour partie la baisse significative de PAM observée dans les groupes d'animaux témoins (sang et albumine) au-delà des 120 minutes suivant la restauration de la volémie. Il est donc apparu important de se tourner vers un anesthésique dont les effets sur la régulation des mécanismes cardiovasculaires seraient moindres que ceux de l'halothane.

Le passage à un autre modèle animal, le lapin pour les impératifs techniques évoqués plus haut, a permis de tester plusieurs anesthésiques par voie i.v. dont les effets sur les paramètres hémodynamiques sont moins marqués. Parmi ceux-ci, nous avons utilisé dans un premier temps la combinaison fentanyl/fluanisone (Hypnorm™, Janssen Animal Health, Grande-Bretagne) en injections régulières, puis la kétamine (Ketalar® , Parke-Davis, France) en perfusion continue, et finalement la combinaison kétamine pour l'induction et pentobarbital sodique (Sanofi Santé Animale, France) en injections horaires qui a été retenu comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

En résumé, cette étude préliminaire a permis de souligner les points à considérer pour l'élaboration d'un modèle expérimental adapté à notre objectif, l'analyse *in vivo* des effets vasoactifs induits par les transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons le modèle expérimental de base mis au point, puis nous décrirons comment il a été appliqué à l'étude des effets de trois substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine sur la circulation centrale et périphérique.

4 - Annexe 1

Les deux articles cités en référence dans ce chapitre sont proposés ci-après.

*Mesure par ultrasonographie Doppler pulsé,
des effets vasoactifs
de l'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracarboxylate,
substitut érythrocytaire potentiel*

A. CARON*, P. MENU*, B. FAIVRE*, P. LABRUDE*,
C. VIGNERON**

* *Laboratoire d'Hématologie et de Physiologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Université Henri-Poincaré-Nancy 1, Nancy*

** *Laboratoire de Biologie Transfusionnelle, Rétablissement de Transfusion Sanguine de
Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy*

Résumé

Les effets vasoactifs de l'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracarboxylate (Hb-Dex-BTC), transporteur d'oxygène potentiel à base d'hémoglobine modifiée chimiquement, ont été comparés à ceux de solutions de référence, le sang en autotransfusion et une solution d'albumine à 50 g/l, par des mesures de vitesse sanguine carotidienne, de pression artérielle moyenne et de fréquences cardiaque et respiratoire, dans un modèle de choc hémorragique chez le cobaye Hartley anesthésié.

L'hémoglobine libre provoque dès l'injection une hypertension de 40 % et une augmentation de la vitesse sanguine de 110 % par rapport aux valeurs initiales. Trois heures après l'injection, la vitesse sanguine reste encore de 38 % supérieure à sa valeur initiale. Le calcul des résistances vasculaires montre un accroissement du tonus carotidien.

L'Hb-Dex-BTC induit une hypertension transitoire de 35 %, sans modification significative de la vitesse sanguine et des résistances vasculaires. Ses effets vasoactifs sont comparables à ceux de la solution témoin d'albumine.

Ces résultats montrent que, contrairement à l'hémoglobine libre, l'Hb-Dex-BTC n'affecte pas significativement le tonus vasculaire. Ceci pourrait être expliqué par une moindre interaction de l'hémoglobine modifiée avec les différents facteurs de la régulation du tonus vasculaire.

Mots-clés : Hb-Dex-BTC, hémoglobine libre, vitesse sanguine, Doppler pulsé, choc hémorragique, transporteurs d'oxygène.

Correspondance : A. Caron, Laboratoire d'Hématologie et de Physiologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Henri-Poincaré-Nancy, 1, 7, rue Albert-Lebrun, BP 403, 54001 Nancy cedex, France.

Summary

Vasoactive effects of Dextran-Benzene-Tetracarboxylate-Hemoglobin, a potential red cell substitute, assessed by pulsed Doppler ultrasonography

The effects of Dextran-Benzene-Tetracarboxylate-Hemoglobin (Dex-BTC-Hb), a chemically-modified hemoglobin-based oxygen carrier, on the vascular tone were compared to those of standard solutions, i.e. the animal's own blood and a 50 g/l albumin solution, by measuring the carotid blood flow velocity, the mean arterial pressure, the heart rate and respiratory frequency, in anesthetized Hartley guinea pigs after a hemorrhagic shock. Stroma-free hemoglobin induced 40 % hypertension and a 110 % rise in blood flow velocity immediately after injection. The velocity was still increased 38 %, 3 hours after injection. The calculations of the vascular resistances showed an increase in carotid vascular tone.

Dex-BTC-Hb brought about 35 % hypertension for two hours with no significant modifications of the vascular tone. These effects are similar to those of the albumin solution. These results indicate that, unlike stroma-free hemoglobin, Dex-BTC-Hb does not significantly affect the vascular tone, probably because of its slight interaction with the factors that regulate vascular tone.

Keywords: Dex-BTC-Hb, stroma-free hemoglobin, blood flow velocity, pulsed Doppler, hemorrhagic shock, oxygen carriers.

Introduction

Les transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine ou HBOC (Hemoglobin-Based Oxygen Carriers) ont été développés dans le but de se substituer temporairement à la fonction oxyphorique des hématies dans les situations nécessitant une restauration de la masse globulaire. La mise au point de tels produits est devenue une priorité pour les transfuseurs et réanimateurs afin de pallier les problèmes de groupage, de risques infectieux et pour aboutir à une sécurité transfusionnelle satisfaisante. L'élaboration de solutions à base d'hémoglobine recombinante, ou d'hémoglobine chimiquement modifiée a permis la mise au point de produits de substitution potentiels capables de maintenir la volémie, et de transporter et céder correctement l'oxygène aux tissus [1].

Toutefois, la plupart de ces produits provoquent des modifications transitoires du tonus vasculaire, mises en évidence aussi bien *in vitro* sur des modèles d'artères isolées que *in vivo*, par des mesures de

pression artérielle et de débits sanguins locaux dans des modèles de chocs hémorragiques [2-6].

Afin d'analyser les différentes composantes de l'effet vasoconstricteur des HBOC, nous avons mis en œuvre la méthode de la vélocimétrie Doppler pulsé [7, 8]. Cette technique permet de mesurer la vitesse d'écoulement du sang dans les vaisseaux et d'en déduire d'éventuelles variations du diamètre vasculaire, c'est-à-dire de la section du vaisseau, sachant qu'à débit cardiaque constant la relation $\text{débit} = \text{vitesse} \times \text{section}$ s'applique. Ainsi, une augmentation de la vélocité sanguine traduit une vasoconstriction, tandis qu'une diminution traduit une vasodilatation.

Cette étude compare les modifications du tonus vasculaire induites par une solution de remplissage ou du sang autotransfusé à celles induites par deux solutions à base d'hémoglobine, l'une sous forme native, l'autre sous forme chimiquement modifiée, l'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracarboxylate

(Hb-Dex-BTC), un transporteur d'oxygène élaboré par notre équipe dont les caractéristiques pharmacologiques sont très satisfaisantes [9-11].

Matériels et méthodes

Animaux et protocole opératoire

Des cobayes Hartley mâles de 417 ± 27 g (Charles River, France) anesthésiés, ont été utilisés et manipulés selon les lois de l'expérimentation animale [12]. La dose d'anesthésique (Halothane, Belamont, France) et le débit de carbogène (95 % O₂/5 % CO₂) sont modulés respectivement par un Fluotec 3 (Cyprane, G.B.) et un débitmètre (système Gaultier, France). Sur l'animal placé en décubitus dorsal sur une table chauffante, l'artère carotide gauche et la veine jugulaire droite sont cathétérisées (cathéters Biotrol, France, de diamètre interne respectifs 0,58 mm et 0,30 mm) en vue respectivement d'un prélèvement et d'une injection. Sur l'artère carotide droite, une sonde Doppler pulsé 20 MHz (DBF-120A-CP, Crystal Biotech, USA) est mise en place. L'ensemble des cathéters et des fils de la sonde, glissés sous la peau de l'animal, émergent au niveau de la nuque où ils sont maintenus par une ligature.

Choc hémorragique de 50 % du volume sanguin et traitement isovolémique

La quantité de sang à extraire est calculée comme suit : volume de sang (ml) = (poids corporel (g) \times 6,5/100) \times 0,5 [13].

Le choc hémorragique contrôlé est réalisé stérilement par prélèvements artériels réguliers de 1 ml toutes les deux minutes au moyen de seringues. Cette période d'extraction du sang a une durée moyenne de 30 minutes au terme desquelles 50 % du volume sanguin de l'animal a été extrait. L'animal est alors laissé en hypovolémie durant encore 15 minutes afin d'obtenir une phase hémorragique d'une durée totale moyenne de 45 minutes. Ensuite, débute la phase de simulation thérapeutique qui consiste en l'injection IV, sous un débit de 2 ml/min, des solutions de substitution à tester :

- autotransfusion du sang de l'animal recueilli sur héparine, (n = 5) ;

- solution d'albumine sérique humaine à 50 g/l (Pasteur-Mérieux sérums & vaccins, France) (n = 5) ;
- solution d'hémoglobine humaine native purifiée (lot expérimental PH 80, Laboratoire d'Hématologie-Physiologie, Faculté de Pharmacie de Nancy en collaboration avec Pasteur-Mérieux sérums & vaccins, France) (n = 5) ;
- solution d'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracarboxylate (lot expérimental FS 46, Laboratoire d'Hématologie-Physiologie, Faculté de Pharmacie de Nancy en collaboration avec Pasteur-Mérieux sérums & vaccins, France) (n = 5).

Ces solutions diluées en Tyrode (pH 7,80 ; glucose : 1,20 g/l ; Na⁺ : 141,0 mM ; K⁺ : 5,0 mM ; Ca⁺⁺ : 2,5 mM ; Mg⁺⁺ : 1,1 mM ; Cl⁻ : 115,8 mM ; phosphates : 0,8 mM ; hydrogénocarbonates : 30,0 mM) sont isoconotiques et isoosmotiques. Leurs propres caractéristiques physico-chimiques et physiologiques sont précisées dans le tableau 1.

Paramètres mesurés et calculés

Sur ce modèle expérimental, différents paramètres sont enregistrés en continu au moyen d'un système informatique d'acquisition des données (UIM 100, MP 100 et logiciel Acqknowledge, Biopac System, USA) :

La vélocité sanguine

La sonde Doppler carotidienne est branchée à un module Doppler pulsé de 20 MHz (PD-20, Crystal Biotech, USA) alimenté par un module principal (CBI-8000, Crystal Biotech, USA) permettant de mesurer la vitesse d'écoulement du sang. A partir de ce paramètre, l'indice de résistance, témoin du tonus vasculaire, est calculé ponctuellement selon la formule de Pourcelot [14] : $I_R = (S - D)/S$ où S est la vitesse sanguine systolique maximale et D la vitesse sanguine télédiastolique.

La pression artérielle moyenne

Le cathéter carotidien est relié à un capteur de pression (P-1000A, Narco Bio-Systems Inc., USA) qui, branché à un enregistreur (Physiograph Desk Model, Narco Bio-Systems Inc., USA) permet de mesurer la pression artérielle moyenne (PAM).

Tableau 1
Caractéristiques physico-chimiques et physiologiques des différentes solutions injectées

	Concentration (g/l)		Viscosité		Osmolalité (mosm/kg)	Pression oncotique (kPa)	MetHb (%)	P ₅₀ (Torr)
	Hb	Protéines plasmatiques	(cSt)	(cPa)				
Sang	144	56	1,9-2,3	—	290-310	3,2-3,7	< 1	29
Albumine	—	50	—	1,10	300	2	—	—
Hémoglobine native (lot exp. PH 80)	79	—	—	0,85	305	3,1	2,3	17
Hb-Dex-BTC (lot exp. FS 46)	83	—	—	2,11	279	4,4	9,1	21

L'électrocardiogramme et le rythme respiratoire

Ces paramètres sont fournis par trois électrodes implantées sous la peau de l'animal selon la dévia-

tion D_{II} d'Einthoven et connectées à l'enregistreur.

L'enregistrement des paramètres et le traitement des données s'effectuent suivant le protocole décrit en figure 1.

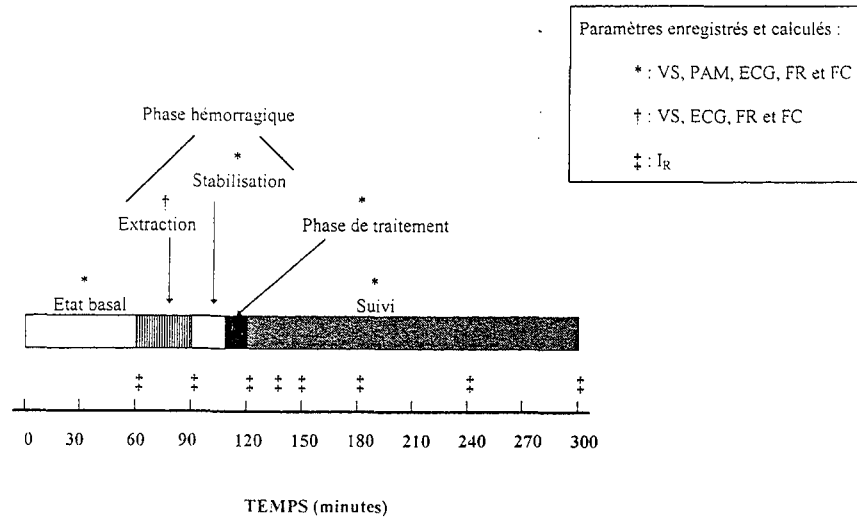


Figure 1
Représentation schématique du protocole expérimental.
VS : vitesse sanguine ; PAM : pression artérielle moyenne ; ECG : électrocardiogramme ; FR : fréquence respiratoire ; FC : fréquence cardiaque ; IR : indice de résistance.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± 1 écart sur la moyenne (m ± sem). Ils sont soumis au test t de Student pour lequel une valeur de p < 0,05 est considérée comme significative.

Résultats

Aucune modification des fréquences cardiaque et respiratoire n'a été mise en évidence après traitement du choc hémorragique, et ce quelle que soit la solution injectée.

Une évolution des paramètres hémodynamiques est observée au cours du temps pour chacune des quatre solutions testées.

Sang

A l'issue de la réinjection du sang en autotransfusion, une augmentation transitoire [30 minutes] de la vitesse sanguine et de la PAM est observée. Par la suite, il est constaté le retour de la PAM et de la vitesse aux valeurs normales puis une diminution de la vitesse pour atteindre après deux heures une valeur de 30 % inférieure à celle d'avant le choc (Figures 2 et 3).

L'indice de résistance subit une augmentation importante dès l'administration du sang. Au-delà de 3 heures, il retrouve sa valeur basale (Figure 4).

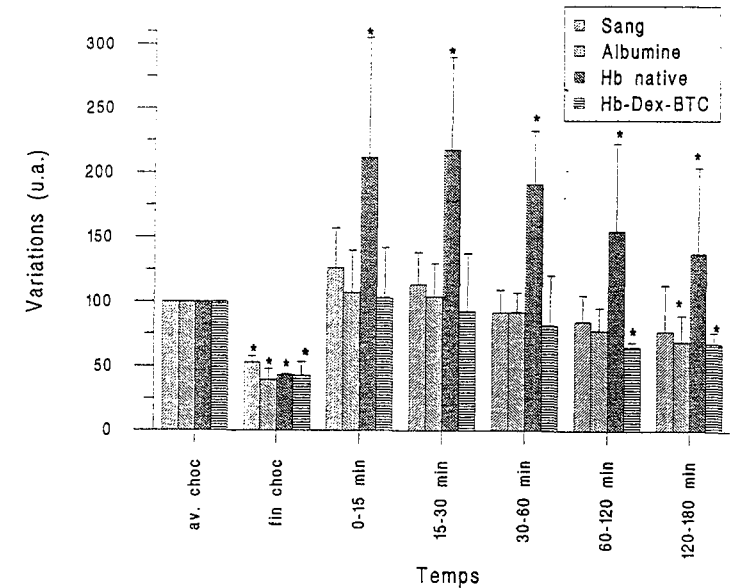


Figure 2
Variations de la vitesse sanguine par rapport aux valeurs initiales (indice 100) à différentes périodes du choc hémorragique et de son traitement. (n = 5, m ± sem pour chaque substitué).
* : valeur significativement différente de la valeur d'avant le choc, p < 0,05.

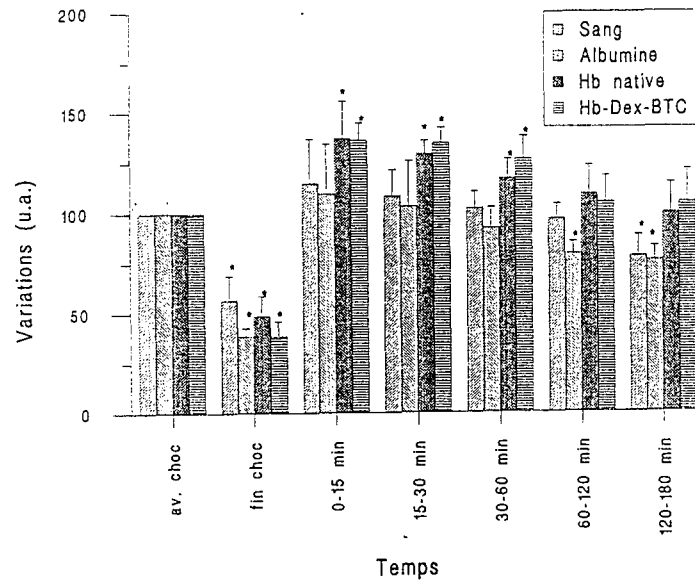


Figure 3 Variations de la pression artérielle moyenne par rapport aux valeurs initiales (indice 100) à différentes périodes du choc hémorragique et de son traitement. (n = 5, m ± sem pour chaque substitut). *: valeur significativement différente de la valeur d'avant le choc, p < 0,05.

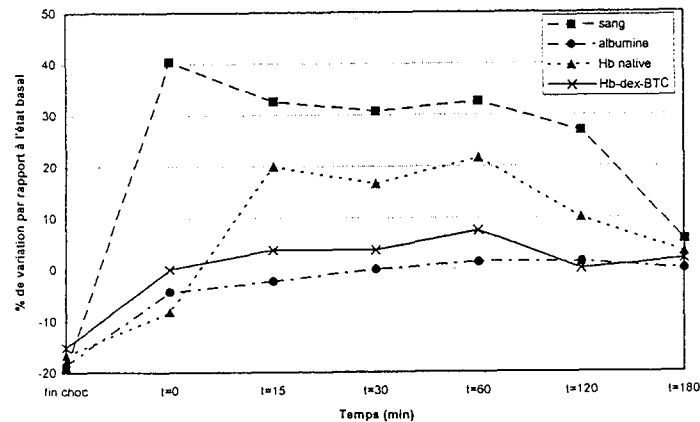


Figure 4 Variations de l'indice de résistance carotidien calculé à différents temps du choc hémorragique et de son traitement.

Albumine

Dès la fin de la phase de traitement, la vitesse sanguine (Figure 2), la PAM (Figure 3) et l'indice de résistance (Figure 4) retrouvent leurs valeurs initiales. On observe toutefois une légère diminution des valeurs de vitesse et de PAM après 2 heures.

Hémoglobine native purifiée

La vitesse sanguine (Figure 2), la PAM (Figure 3) et l'indice de résistance (Figure 4) subissent respectivement une augmentation de 110 %, 40 % et 40 % par rapport aux valeurs d'avant le choc, et ce dès la fin de l'injection de la solution de substitution. Au bout de 3 heures, la PAM et l'indice de résistance sont revenus aux valeurs initiales alors que la vitesse sanguine est encore de 38 % supérieure.

Hémoglobine-dexrane 10-benzène-tétracarboxylate

L'injection d'Hb-Dex-BTC est suivie d'une hypertension transitoire de 2 heures avec un maximum de 35 % dès la fin du choc (Figure 3) alors que la vitesse sanguine (Figure 2) et l'indice de résistance (Figure 3) restent stables. Il est à noter toutefois que la vitesse sanguine tend à diminuer 2 heures après l'adjonction du substitut.

Discussion

Dans les conditions expérimentales retenues, la réinjection de son sang à l'animal (autotransfusion), ou l'injection de la solution d'albumine, ne provoquent pas, dès la fin du choc, de modifications notables de la pression artérielle moyenne et de la vitesse sanguine. Cependant, il apparaît une différence importante quant à la valeur de l'indice de résistance qui est considérablement augmenté pour le sang et pratiquement inchangé avec l'albumine. Cette forte perturbation de l'indice induite par le sang non hémodilué pourrait s'expliquer par sa viscosité élevée qui ne permet pas, compte tenu de l'état de choc dans lequel se trouve l'organisme, de lever et de traiter les ischémies provoquées par cet état. Du fait de cette viscosité trop élevée et également de l'hématocrite qui, en fin de choc, est le double de celui des autres groupes, les animaux autotransfusés ne peuvent donc pas constituer le groupe contrôle. De plus, dans un

tel état de choc, cet hémocrite et cette viscosité inadaptés pourraient être à l'origine d'une augmentation importante des contraintes de cisaillement stimulant l'endothélium et induisant une réponse vasoactive. Comme l'étude fréquentielle atteste que le débit cardiaque reste constant, le travail à fournir pour lever l'ischémie dans les tissus pourrait être alors assuré par vasoconstriction. L'augmentation très importante de l'indice de résistance avec le sang met en évidence un accroissement très net du tonus vasculaire tendant donc à confirmer cette vasoactivité.

Pour sa part, l'albumine humaine à 50 g/l, substitut plasmatique classiquement utilisé pour restaurer et maintenir la volémie en situation hémorragique grave, apparaît comme une solution témoin adéquate puisqu'elle ne modifie ni le tonus vasculaire, ni la vitesse sanguine.

Toutefois, il est à noter une baisse de la pression artérielle moyenne, conséquence possible d'un effet hypotenseur dose-dépendante de l'Halothane.

Les solutions d'hémoglobine native ou modifiée induisent une augmentation importante de la pression artérielle moyenne durant les deux heures qui suivent la fin du choc, mais cette hypertension est transitoire et diminue au cours du temps. Ceci peut s'expliquer différemment pour chacune des deux solutions :

- l'hémoglobine native, en se dimérisant, quitte rapidement le compartiment vasculaire (demi-vie de 1 à 2 heures) [15], ce qui explique la diminution de l'hypertension et de l'effet vasoactif au cours du temps.
- l'Hb-Dex-BTC, dont la demi-vie plasmatique est de 10-12 heures [16], provoque une hypertension de même ordre que l'hémoglobine native mais de durée beaucoup plus brève. Cette différence de comportement dans la durée s'explique par le maintien prolongé de l'Hb-Dex-BTC dans le lit vasculaire. Son champ d'action serait alors limité à la barrière endothéliale, ceci contrairement à l'hémoglobine native qui pourrait avec le temps pénétrer dans la paroi vasculaire et induire un effet nouveau, additionnel et tardif au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. Pour étayer cette hypothèse, nous avons mis en œuvre des études histologiques préliminaires qui montrent, dans la média des vaisseaux, la présence d'hémoglobine native ce qui n'est pas le cas de l'Hb-Dex-BTC (résultats non publiés).

Cependant, l'effet hypertenseur d'environ deux heures provoqué par l'Hb-Dex-BTC alors qu'elle persiste en grande quantité et pendant de nombreuses heures encore dans le lit vasculaire reste actuellement inexplicé.

Il faut enfin souligner l'importance des modifications chimiques subies par l'hémoglobine dans les réponses vasculaires détectées au niveau de la circulation centrale. En effet, la vitesse sanguine et l'indice de résistance au niveau de la carotide ne sont respectivement pas ou seulement très peu perturbés lors du traitement du choc par l'Hb-Dex-BTC à la différence de l'hémoglobine native.

L'évolution de la vitesse sanguine peut être expliquée par la constriction ou la dilatation de vaisseaux plus périphériques et par les modifications de viscosité plasmatique induites par l'injection des solutions dans la circulation sanguine. Ainsi l'augmentation légère de la vitesse en présence d'Hb-Dex-BTC peut être due à la nature de sa viscosité [17], qui reste proche de celle obtenue avec l'albumine humaine, et à une augmentation modérée du tonus vasculaire comme sem-

blent le confirmer les valeurs de l'indice de résistance. A l'inverse, l'hémoglobine native, par diminution nette de la viscosité [17] et par un tonus vasculaire renforcé, provoquerait une accélération de la vitesse sanguine.

Pour parvenir à mieux comprendre les phénomènes vasoactifs observés en réponse à l'administration de solutions d'hémoglobine, il apparaît indispensable de poursuivre ce travail en y ajoutant des mesures directes du diamètre de vaisseaux centraux (artère carotide) et périphériques (artères fémorale et iliaque).

Conclusions

Cette étude montre l'existence réelle d'un effet hypertenseur de deux HBOC avec participation directe du tonus vasculaire. D'après la littérature, celui-ci serait dû à une vasoconstriction [18, 19] qui pourrait s'expliquer selon trois voies distinctes susceptibles d'agir seules ou conjointement.

L'hémoglobine peut interagir avec un ou plusieurs facteurs responsables de la régulation du tonus vas-

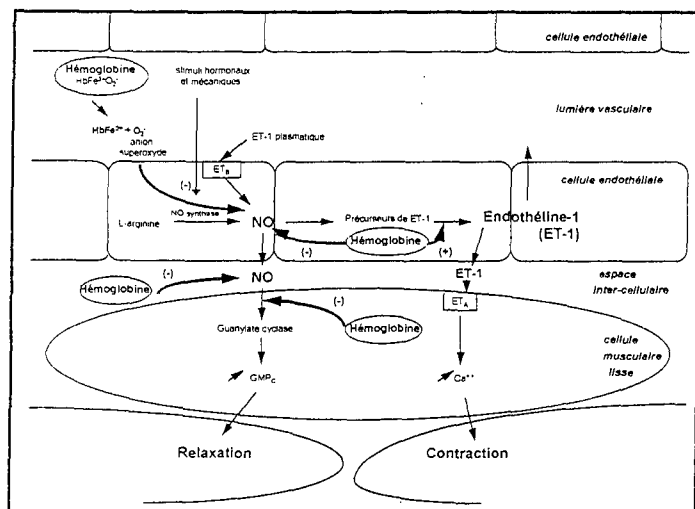


Figure 3 Schéma montrant les interactions possibles de l'hémoglobine avec différents facteurs impliqués dans la régulation du tonus vasculaire.

culaire [20, 21]. Elle peut inhiber la relaxation EDRF-dépendante soit en interagissant avec l'EDRF ou oxyde nitrique (NO), facteur d'origine endothéliale [22, 23], avant sa fixation au niveau de la guanylate cyclase des muscles lisses des vaisseaux [24, 25], soit en bloquant la synthèse intra-endothéliale de celui-ci. Elle peut également favoriser la contraction endothéline-1-dépendante en stimulant la synthèse de ce peptide [2], et/ou encore elle peut, au cours de l'auto-oxydation dont elle est l'objet, générer l'anion superoxyde qui, en réagissant avec NO pour former l'anion peroxydrite, se comporte alors comme un puissant vasoconstricteur [26]. Ces différentes hypothèses sont résumées par la figure 5.

Cependant, pour être en mesure de préciser la ou les voies réellement responsables de ces effets, il sera nécessaire de mener des études complémentaires sur un plan histologique, biochimique et physiologique où la technique d'ultrasonographie Doppler pulsé constitue une des approches possibles en offrant les mêmes avantages, sans en supporter les inconvénients, que les techniques *in vitro* et *in vivo* développées par d'autres auteurs pour étudier la vasoactivité [5, 27].

Remerciements

Ce travail a été réalisé, pour la partie du traitement des signaux, en collaboration avec M. Fabien Belloir du Laboratoire d'Application de la Microélectronique (Pr G. Villerman-Lécolier) de la Faculté des Sciences de Reims.

Références

- [1] Dracker R.A. (1995) The development and use of oxygen-carrying blood substitutes. *Immunol. Invest.*, 24, 403-410.
- [2] Gulati A., Singh G., Rebelo S., Sharma A.C. (1995) Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci.*, 56, 1433-1442.
- [3] Frears W., Llave R., Jing M., Hart J., Mc Quillan P., Muldoon S. (1995) Contractile effects of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on isolated porcine blood vessels. *J. Lab. Clin. Med.*, 125, 762-767.
- [4] Ulatowski J.A., Koehler R.C., Nishikawa T. et al. (1995) Role of nitric oxide scavenging in peripheral vasoconstrictor response to $\beta\beta$ cross-linked hemoglobin. *Art. Cells, Blood Subs. Immob. Biotech.*, 23, 263-269.
- [5] Greenburg A.G., Kim H.W. (1995) Hemoglobin mediated vasoactivity in isolated vascular rings. *Art. Cells, Blood Subs. Immob. Biotech.*, 23, 303-309.
- [6] Rioux F., Petitclerc E., Audet R., Drapeau G., Fielding R.M., Marceau F. (1995) Recombinant human hemoglobin inhibits both constitutive and cytokine-induced nitric oxide-mediated relaxation of rabbit isolated aortic rings. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 24, 229-237.
- [7] Hartley C.J., Cole J.S. (1974) An ultrasonic pulsed Doppler system for measuring blood flow in small vessels. *J. Appl. Physiol.*, 37, 626-629.
- [8] Haywood J.R., Shaffer R.A., Fastenow C., Fink G.D., Brody M.J. (1981) Regional blood flow measurement with pulsed Doppler flowmeter in conscious rat. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 10, 241, H273-H278.
- [9] Prouchayret F., Fasan G., Grandgeorge M., Vigneron C., Menu P., Delachérie E. (1992) A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. I. Preparation, purification and characterization. *Biomat. Art. Cells Immob. Biotech.*, 20, 319-322.
- [10] Faivre B., Menu P., Labrude P., Grandgeorge M., Vigneron C., Delachérie E. (1992) A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. II. Physicochemical and physiological assessments. Preliminary results on guinea pig. *Biomat. Art. Cells Immob. Biotech.*, 20, 597-600.
- [11] Menu P., Faivre B., Labrude P., Riffard P., Grandgeorge M., Vigneron C. (1994) Human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran as a potential red blood cell substitute. II. Pharmacotoxicological evaluation. *Biomat. Art. Cells Immob. Biotech.*, 22, 551-558.
- [12] Brugère H., Laurent J., Le Bars D. et al. (1992) Expérimentation animale : mode d'emploi. INSERM éd., *Chimie et Écologie*, 153 p.
- [13] Mitruka B.M., Rawnsley H.M. (1977) In : *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals. Section II - Sample Collection, Preparation, and Preservation*. Masson Publishing USA Inc., 21-39.
- [14] Daurat M. (sous la direction de) (1986). In : *Pratique de l'ultrasonographie vasculaire (Doppler-Échographie). Chapitre 2 : Principes d'utilisation de l'ultrasonographie vasculaire*. Vigot éd., 63-117.
- [15] Bleeker W.K., Berbers G.A.M., Den Boer P.J., Agterberg J., Riger G., Bakker J.C. (1992) Effect of polymerization on clearance and degradation of free hemoglobin. *Biomat. Art. Cells Immob. Biotech.*, 20, 747-750.
- [16] Delachérie E., Vigneron C. (1991) Hemoglobin-based artificial blood : new polymeric derivatives of hemoglobin with low oxygen affinity. *Int. J. Art. Org.*, 14, 28-32.
- [17] Menu P., Donner M., Faivre B., Labrude P., Vigneron C. (1995) *In vitro* effects of dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin on human rheological properties. *Art. Cells, Blood Subs. Immob. Biotech.*, 22, 551-558.
- [18] Vogel W.M., Dennis R.C., Cassidy G., Apstein C.S., Valeri C.R. (1986) Coronary constrictor effect of stroma-free hemoglobin solutions. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 251, H413-H420.
- [19] Motterlini R., MacDonald V.W. (1993) Cell-free hemoglobin potentiates acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in rabbit hearts. *J. Appl. Physiol.*, 75, 2224-2233.
- [20] Cabrera C., Bohr D. (1995) The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206, 77-81.
- [21] Lu M., Reid J.J. (1995) Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 22, 315-323.
- [22] Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288 [5789] 373-375.

- [23] Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.
- [24] Kosaka H., Uozumi M., Tyuma I. (1989) The interaction between nitrogen oxides and hemoglobin and endothelium-relaxing factor. *Free Radic. Biol. Med.*, 7, 653-658.
- [25] Tsai A.L. (1994) How does NO activate hemoproteins? *FEBS Lett.*, 341 141-145.
- [26] Myers S., Hernandez R., Castaneda A. (1995) A possible role for oxygen free radicals in the regulation of renal nitric oxide synthesis and blood flow. *Am. J. Surg.*, 169, 604-608.
- [27] Heymann M.A., Payne B.D., Hoffmann J.I.E., Rudolph A.M. (1977) Blood flow measurements with radionuclide-labelled particles. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 20, 55-79.

**THE EFFECTS OF STROMA-FREE AND
DEXTRAN-CONJUGATED HEMOGLOBIN ON
HEMODYNAMICS AND CAROTID BLOOD FLOW IN
HEMORRHAGED GUINEA PIGS**

A. Caron, P. Menu, B. Faivre-Fiorina, P. Labrude, and C. Vigneron
Laboratoire d'Hématologie & Physiologie
Faculté de Pharmacie
Université Henri Poincaré
Rue Albert Lebrun, 54001 Nancy, France.

ABSTRACT

Hemoglobin solutions are potential resuscitative fluids with volume expanding and oxygen delivery abilities developed to reduce the use of blood transfusion. Most hemoglobin solutions in clinical trials increase transiently arterial pressure by inhibiting nitric oxide-dependent vasodilation. Our objective was to compare the effects on central hemodynamics and carotid blood flow of two hemoglobin solutions after resuscitation from hemorrhage in anesthetized guinea pigs. After anesthesia and instrumentation, severe hemorrhage was induced by withdrawing 50% of the blood volume. Resuscitation was performed after 15 min of hypovolemia with 5% albumin,

stroma-free hemoglobin, or hemoglobin conjugated to dextran-benzene-tetracarboxylate (Dex-BTC-Hb). The mean arterial pressure (MAP), carotid blood flow (CBF), vascular resistance index and heart rate (HR) were monitored for 3 hours after resuscitation. After hemorrhage, MAP and CBF dropped to $57.6 \pm 4.4\%$ and $58.9 \pm 3.7\%$ of control values respectively. Albumin failed to maintain hemodynamics in the decompensatory phase of shock. Both hemoglobin solutions gave rise to a transient increase in MAP (35%); stroma-free hemoglobin increased the CBF (150%) and resistance index (24%) whereas Dex-BTC-Hb had no effect on CBF and vascular resistances. None of the solutions affected the HR. Modified hemoglobin has attenuated effects on CBF and resistance index compared to stroma-free hemoglobin. This may be due to a balance between the stimulation of nitric oxide synthesis by shear-stress and the inhibition of vasodilation by nitric oxide trapping.

INTRODUCTION

Severe hemorrhage results in a decrease in cardiac output and blood pressure. This is followed by a compensatory phase in which blood pressure is maintained by sympathetic stimulation and release of vasoconstrictive mediators. Blood is preferentially distributed to vital organs as a result of peripheral vasoconstriction. These are temporary mechanisms, and if the hypovolemia is not corrected, a delayed decompensatory phase occurs, leading to gradual irreversible vasodilation, necrosis of various organs and finally to death (1). In clinical practice, blood volume is restored by injecting solutions of hydroxyethyl starch, modified fluid gelatin or human albumin.

Nevertheless, when the hemoglobin level falls below a given threshold, red blood cells must be transfused in order to provide adequate oxygen supply (2). Chemically and genetically modified human or animal hemoglobins have been developed to minimize the risks of donor-recipient incompatibility and infectious disease transmission due to red blood cells transfusion, and to create a blood substitute easy to store and to transport. These hemoglobin-based oxygen carriers provide safe and stable solutions with appropriate vascular lifespans, oncotic pressures and oxygen transport and delivery abilities (3,4). Several hemoglobin solutions are presently undergoing clinical trials, and the studies revealed their vasoconstrictor effect (3,4). Previous studies of isolated vascular rings demonstrated the potent vasoconstrictor effect of hemoglobin in different vessels and species (5,6). There are several possible reasons for this vasoactive action of hemoglobin. One explanation is massive trapping of endothelium-derived nitric oxide. Hemoglobin has a strong affinity for nitric oxide and this interaction results in the inhibition of nitric oxide-dependent relaxation (7-9). Hemoglobin can also stimulate the synthesis of the vasoconstrictor factor endothelin-1 by cultured endothelial cells (10). Gulati *et al.* have reported that stroma-free hemoglobin and dapsirin cross-linked hemoglobin increased the plasma endothelin-1 concentration in vivo (11,12). Thus hemoglobin could influence the vascular tone via several mechanisms.

Dex-BTC-Hb is a promising resuscitative fluid developed in our laboratory and prepared from human erythrocytes by a protocol involving the conjugation of oxyhemoglobin to an effector polymer, dextran-benzene-tetracarboxylate (13). Its pharmacological and toxicological properties are good, it has a long vascular half-life, a high level of oxygen saturation (P_{50}) and a high lethal dose (14,15). The solution of Dex-BTC-Hb is safe, pure and pasteurized, and can be stored frozen for over a year. Its main potential application is the restoration of blood volume and oxygen supply in emergency situations and perioperative periods. Studies in guinea pigs indicated that Dex-BTC-Hb was suitable to treat hypovolemia and could improve the survival of animals after a 75% blood volume loss (14). Like most hemoglobin solutions, Dex-BTC-Hb increased blood pressure in guinea pigs, but the mechanism of this pressor effect remains unclear.

The present study was designed to compare the effects of a purified stroma-free hemoglobin solution (SFHb) and Dex-BTC-Hb on hemodynamics and carotid blood flow (CBF) in anesthetized guinea pigs resuscitated from severe hemorrhage. The mean arterial pressure (MAP), heart rate, CBF and resistance index (RI, a non-dimensional estimator of vascular resistances) were measured for 3 hours after resuscitation. Our results demonstrate that the chemically-modified hemoglobin solution has diminished effects on CBF and

RI as compared to stroma-free hemoglobin and was able to maintain adequate blood pressure, HR and CBF. Several potential mechanisms explaining these differences are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Animals and surgical procedure.

Male Hartley guinea pigs weighing 350-400 g (Charles River, France) were anesthetized with 1% halothane (Belamont, France) in a mixture of 95% O₂ with 5% CO₂. Penicillin (200,000 U/kg i.v., Diamant, France) was given prior to the start of the operative procedure as prophylaxis against infections. The left common carotid artery was cannulated with a polyethylene catheter (Biotrol, France) for MAP measurements and blood withdrawal. The right jugular vein was cannulated with a polyethylene catheter (Biotrol, France) for infusion of solutions. A directional pulsed Doppler flow probe (DBF-120A, Crystal Biotech, USA), with a 0.9 mm lumen, and a 20 MHz ultrasonic frequency was placed around the right common carotid artery. The instrumented animals were allowed to equilibrate for one hour before hemorrhage. The study protocol was approved by the Animal Protection Bureau of the French Ministry for Fishing, Agriculture and Food, and the experiments were conducted in accordance with the national instructions for laboratory animal use.

Hemorrhage and resuscitation.

Severe hemorrhage was induced by removing 50% of the total blood volume (calculated as 6.5% of the body weight) via the arterial catheter, at a flow rate of 1 mL/min. Blood was collected in a sterile heparinized reservoir. After hemorrhage, animals were maintained in hypovolemia for 15 min. Animals were randomly allocated to one of the following groups for isovolemic resuscitation:

- group I: animals received a human albumin solution (Pasteur-Mérieux Sérums & vaccins, France, 50 g/L; n=5);
- group II: animals received a purified stroma-free hemoglobin (SFHb) solution (80 g/L; n=5);
- group III: animals received a chemically modified hemoglobin solution, Dex-BTC-Hb, (80 g/L; n=5).

The solutions were infused continuously at a flow rate of 2 mL/min. The experimental protocol is summarized in figure 1.

Hemoglobin solutions preparation.

SFHb was prepared from venous blood according to the protocol described by Menu et al. (15,16). Dex-BTC-Hb was prepared as described by

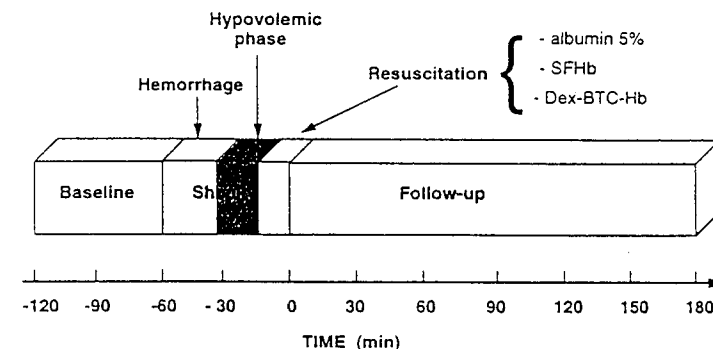


FIGURE 1: Description of the experimental protocol.

SFHb: stroma-free hemoglobin; Dex-BTC-Hb: dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin.

Prouchayret *et al.* (13). The solutions were dissolved in Tyrode (glucose: 1.20 g/L; Na⁺: 141.0 mM; K⁺: 5.0 mM; Ca⁺⁺: 2.5 mM; Mg⁺⁺: 1.1 mM; Cl⁻: 115.8 mM; phosphates: 0.8 mM; carbonates: 30.0 mM) and were isoosmotic and isoconcentric with plasma. The physicochemical properties of the hemoglobin solutions are presented in the Table I.

Measurements and calculations.

The arterial catheter was connected to a pressure transducer (P-1000A, Narco Bio-Systems, USA) for measurements of the MAP. Because the arterial catheter was used for blood withdrawal, measurement of blood pressure was discontinued during the hemorrhage, and was restarted as soon as it ended. The blood flow probe was connected to a pulsed Doppler flowmeter (PD-20 module and CBI-8000 mainframe, Crystal Biotech, USA) for blood flow measurements (17,18). The resistance index is a non-dimensional estimator of the vascular resistance calculated from the CBF signal with Pourcelot's formula: $RI = S-D/S$, where RI is the resistive index, S is the maximal systolic blood flow velocity and D is the telediastolic blood flow velocity. The resistance index is directly proportional to the vascular resistance provided a sufficient pulsatile blood pressure is maintained (19). For this reason, the RI was not calculated during the hemorrhagic phase. The HR was calculated from the CBF signal as the reciprocal of the interval between two consecutive systolic peaks. Data were recorded with an analog multi-channel acquisition system (Acqknowledge software and MP100, Biopac System, USA).

Table I. Physicochemical properties of hemoglobin solutions

	Stroma-free Hb	Dex-BTC-Hb
Total Hemoglobin (g/L)	80	80
Methemoglobin (%)	4.3	4.6
Free Hemoglobin (%)	100	<5
Free Dex-BTC (g/L)	-	<4.8
P ₅₀ (torr)	17	25
Osmolality (mOsm/kg)	305	290

Data analysis.

HR values are means \pm 1 SEM. The other parameters are expressed as percent changes from baseline values and are means \pm 1 SEM. Values at each postresuscitative time for each group were compared with baseline values by repeated-measures ANOVA. The difference between the four groups at each postresuscitative time were compared by ANOVA. A *p* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS**Effects of hemorrhage on hemodynamics**

After hemorrhage the MAP dropped to $57.6 \pm 4.4\%$ (figure 2) and the CBFV dropped to $58.9 \pm 3.7\%$ (figure 3) from baseline values. The shock index, a non-dimensional estimator of physiological state and calculated as pulse rate/systolic blood pressure (20), increased after hemorrhage to 10.4 ± 0.9 vs. 4.2 ± 0.5 , 9.9 ± 4.0 vs. 4.5 ± 0.9 , 9.4 ± 1.9 vs. 4.1 ± 1.0 , in albumin, SFHb and Dex-BTC-Hb groups respectively. A non significant increase in HR was observed (figure 5). The values were similar between the four groups.

Effects of resuscitation on hemodynamics

Albumin: MAP was not modified in the first hour after infusion of albumin, and a decrease in MAP was observed after this period (figure 2). CBF did not

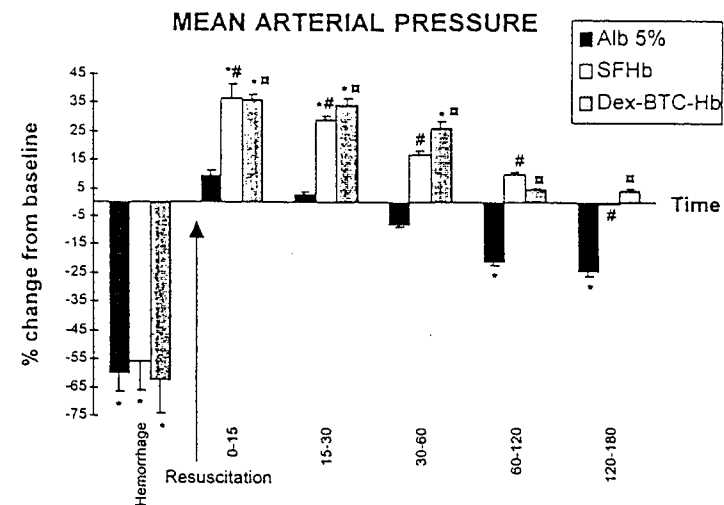


FIGURE 2 Changes in mean arterial pressure after hemorrhage and resuscitation, expressed as percents from baseline value. Time is expressed in min.

Alb 5%: albumin; SFHb: stroma-free hemoglobin; Dex-BTC-Hb: dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin.

*: *p*<0.05 compared to baseline within groups.

: *p*<0.05 SFHb versus Alb 5%; □: *p*<0.05 Dex-BTC-Hb versus Alb 5%.

No difference between SFHb and Dex-BTC-Hb.

change after resuscitation (figure 3) and the RI increased in the first minutes following resuscitation (figure 4). The HR was not affected by albumin infusion (figure 5).

SFHb: SFHb increased MAP during the first 30 min following infusion (figure 2). A large and sustained increase in CBF was observed (figure 3) and RI increased immediately after infusion of SFHb (figure 4). HR was not affected by SFHb infusion (figure 5).

Dex-BTC-Hb: Dex-BTC-Hb increased transiently MAP in the first hour after infusion (figure 2). CBF did not change immediately after infusion of Dex-BTC-Hb, but a slight decrease was observed after one hour. CBF values were

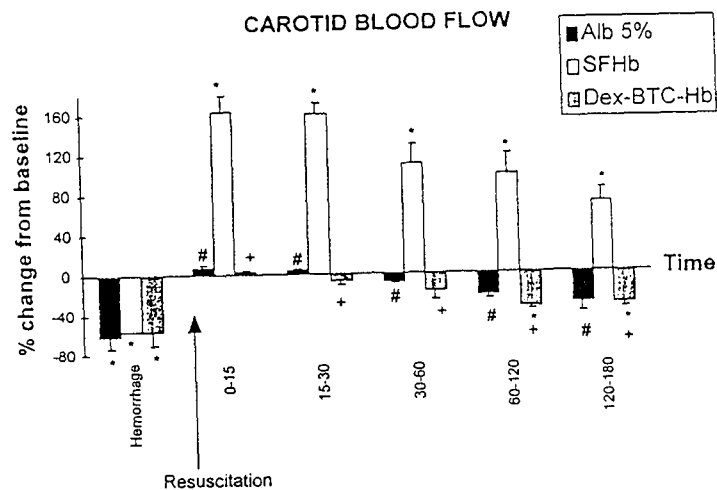


FIGURE 3: Changes in carotid blood flow velocity after hemorrhage and resuscitation, expressed as percents from baseline value. Time is expressed in min. Alb 5%: albumin; SFHb: stroma-free hemoglobin; Dex-BTC-Hb: dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin.
 * : $p < 0.05$ compared to baseline within groups.
 # : $p < 0.05$ SFHb versus Alb 5%; + : $p < 0.05$ Dex-BTC-Hb versus SFHb.
 No difference between Alb 5% and Dex-BTC-Hb.

different from those of SFHb group at each time (figure 3). RI was unmodified by Dex-BTC-Hb compared to baseline. The resistance index values of Dex-BTC-Hb-treated animals were different from those of SFHb-treated animals (figure 4). No difference in HR was observed after infusion of Dex-BTC-Hb (figure 5).

DISCUSSION

The influence of two hemoglobin-based solutions with identical hemoglobin concentration on hemodynamics and vascular resistances was evaluated in an anesthetized fixed volume bleed-out model of hemorrhage. The mean drawback of our model is that the effects observed following

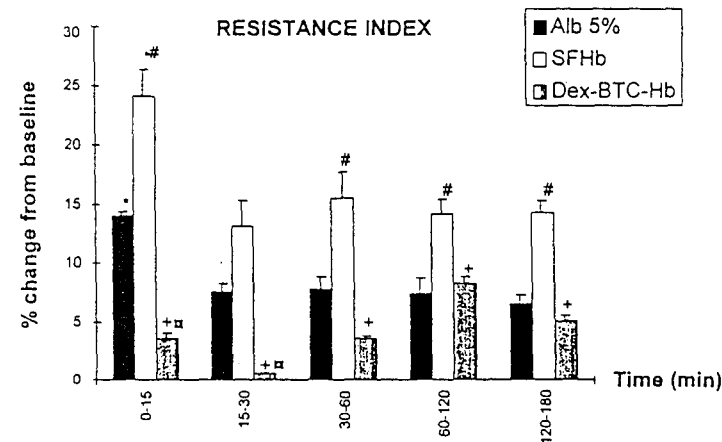


FIGURE 4: Changes in resistance index after resuscitation from hemorrhage, expressed as percents from baseline value. Alb 5%: albumin; SFHb: stroma-free hemoglobin; Dex-BTC-Hb: dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin.
 * : $p < 0.05$ compared to baseline within groups.
 # : $p < 0.05$ SFHb versus Alb 5%; α : $p < 0.05$ Dex-BTC-Hb versus Alb 5%; + : $p < 0.05$ Dex-BTC-Hb versus SFHb.

hemorrhage may not solely be due to blood loss but could be due to the combined effects of anesthesia and hemorrhage.

A resuscitative fluid (albumin) known to be without an active effect on blood pressure was used as a control solution (21). Albumin solution is devoided oxygen delivery capacity but has a molecular mass and an oncotic pressure similar to those of hemoglobin. In the first hour following the injection, albumin maintained MAP and CBF close to basal values. RI increased significantly in the first 15 minutes following resuscitation. These findings reflect the compensatory phase following hemorrhage in which the sympathetic stimulation and systemic vasoconstriction contribute to maintain blood pressure and tissue perfusion. This first phase is followed by a fall in MAP and a return of the RI to basal values. These results indicate that blood volume restoration with albumin failed to maintain hemodynamics and to

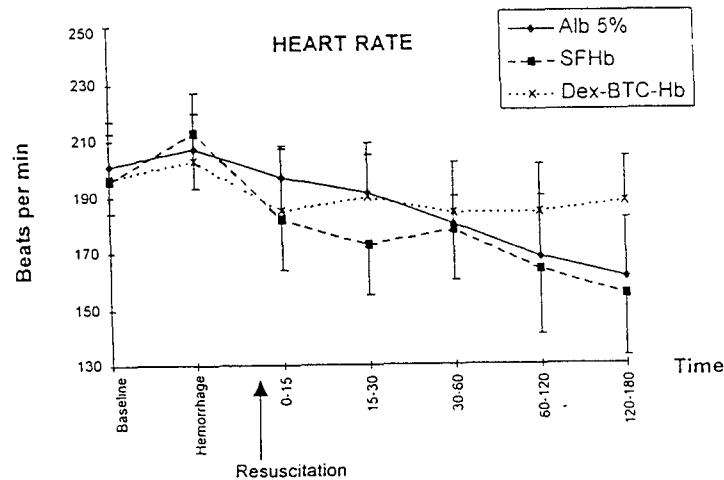


FIGURE 5: Changes in HR after hemorrhage and resuscitation. Time is expressed in min. Alb 5%: albumin; SFHb: stroma-free hemoglobin; Dex-BTC-Hb: dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin. *: $p < 0.05$ compared to baseline within groups. No difference between groups.

reverse the delayed irreversible decompensatory phase of hemorrhagic shock probably related, but not limited, to nitric oxide synthase activation (22). Unlike the albumin solution, the two hemoglobin-based solutions had marked pressor effects. Both stroma-free and chemically-modified hemoglobin gave rise to a transient and similar increase in MAP and hence prevented the secondary decline in blood pressure which occurs between 60 and 120 minutes after hemorrhaged animals have been resuscitated. In specific pathologies including hemorrhagic shock and sepsis, this pressor effect could be of great interest since hemoglobin could be used as a nitric oxide scavenger to reverse the vasodilatory phase. It is possible that the increased catecholamine release characterizing the compensatory phase of hemorrhagic shock may be contributing to the increase in MAP since catecholamine sensitivity would be increased after administration of a nitric oxide scavenger (23).

The pressor action of the hemoglobin-based solutions has been reported to be due to the interaction of hemoglobin with one or more factors that contribute to the regulation of the vascular tone. Nitric oxide-dependent smooth muscle relaxation is inhibited by a massive trapping of nitric oxide by the ferrous iron atom of the heme. This inhibition can be reversed by nitric oxide donors in vitro (5) and by the nitric oxide precursor L-arginine in vivo (24,25). Schultz *et al.* demonstrated that L-arginine (200 mg/kg) reduced the increase in blood pressure elicited by diaspirin cross-linked hemoglobin in rats (24). Other endothelial or plasmatic vasoactive factors including the vasoconstrictor superoxide anions generated from hemoglobin auto-oxidation in vivo (26) may also contribute to the pressor action of hemoglobin. It has been also demonstrated that both stroma-free and cross-linked forms of hemoglobin increased the production of the vasoconstrictive factor endothelin in rats (11,12). More recently, Gulati *et al.* proposed in a model of hemorrhaged rats that the action of endothelin was more important in the beneficial effect of diaspirin cross-linked hemoglobin than the NO mechanism (27).

The differences in the hemodynamic changes between SFHb and Dex-BTC-Hb solutions may be attributed to their chemical forms (Table I). SFHb is an acellular unmodified hemoglobin solution with a high oxygen affinity. The preparation of SFHb solution included a purification phase in order to reduce the vasoactive effects due to stroma components (28,29). The solution has a short vascular half-life (1-2 hours) because it is quickly removed from the circulation by renal filtration and vascular leaks (30). The removal of SFHb from the blood stream is illustrated by the gradual fall in the increased MAP, CBF and RI (figures 2-4). The return of the MAP to normal values 30 min after infusion may be due to a reduced circulating volume of SFHb, leading to a decrease in its pressor action. The data demonstrate clearly that in our experiments the constrictor effect of SFHb is maximal in the first minutes following infusion (figure 4). Nevertheless, the large rise in CBF cannot be explained solely by the constrictor action of SFHb, but also by the low viscosity and antisludge properties of this solution that tend to reduce the blood viscosity and so facilitate its circulation within blood vessels (31). Another explanation is that the high oxygen affinity of SFHb impaired tissue oxygenation, and led to an increase in CBF by activation of the chemoreceptors.

Dex-BTC-Hb is a purified hemoglobin solution prepared from outdated human blood according to a process designed to improve the oxygen delivery to tissues and the vascular half-life (13-15). Studies in conscious guinea pigs have shown that Dex-BTC-Hb had a half-life of 9.5 hours (4-5 times longer than that of SFHb) and elevated MAP after resuscitation from severe

hemorrhage (14). In the present study, Dex-BTC-Hb induced a 35% increase in MAP in the 60 min following infusion and maintained a correct blood pressure and CBF in the decompensatory phase of shock. The modifications of CBF and resistances were significantly different between SFHb and Dex-BTC-Hb groups, indicating that Dex-BTC-Hb has attenuated hemodynamic effects compared to unmodified hemoglobin. At least two major differences between SFHb and Dex-BTC-Hb formulation could contribute to these differential macrohemodynamic effects. First, the conjugation of free hemoglobin to macromolecules of Dex-BTC provide a solution with a viscosity close to that of red blood cells in plasma and with red blood cells aggregation capacity in vitro. Red blood cells aggregation would thus be stimulated in our experimental model of hemodilution with Dex-BTC-Hb, and lead to an increase in the shear-stress-induced synthesis of nitric oxide contrary to SFHb. This would improve the endothelium-dependent vasodilation and hence limit the vasoconstriction elicited by nitric oxide scavenging by hemoglobin. Secondly, the slight hemodynamic effects of Dex-BTC-Hb could be explained by a possible attenuation of the nitric oxide-trapping action of the heme by steric encumbrance of the ferrous iron atom due to the conjugation of hemoglobin to dextran-benzene-tetracarboxylate. Accessibility of nitric oxide to the heme could also be impaired by a deformation of the heme pocket structure. The modification of hemoglobin may also have reduced the binding of nitric oxide to the thiol groups of hemoglobin (cysteine β 93) which has been demonstrated by Jia *et al.* (9) to inhibit the nitric oxide vasodilatory function. Moreover, the large size of the Dex-BTC-Hb may prevent it from penetrating into the vascular wall. Consequently, the inhibition of nitric oxide-dependent relaxation by Dex-BTC-Hb would be restricted to the vascular lumen, whereas unmodified hemoglobin could interact with nitric oxide both in the lumen and the vascular wall. This hypothesis is supported by recent findings indicating that in rabbit aortic strips high molecular mass hemoglobin derivatives are less potent inhibitors of endothelium-dependent relaxation than low molecular mass hemoglobin derivatives (6). Complementary studies are required to determine precisely the action of Dex-BTC-Hb on the vascular tone.

In conclusion, this study underlines the macrohemodynamic differences between unmodified and chemically-modified hemoglobin solutions and suggests that Dex-BTC-Hb has attenuated short-term hemodynamic effects compared to stroma-free hemoglobin. This may be due to a balance between the stimulation of nitric oxide synthesis by shear-stress and the inhibition of vasodilation by nitric oxide trapping.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. D Longrois (Department of Anesthesiology, Hospital of Nancy-Brabois, France) for his advice. This research was supported by the Association Recherche et Transfusion (Paris, France).

REFERENCES

1. Kreimeier U, Messmer K: Blood flow distribution during shock. In: Winslow R, Vandegriff KD, Intaglietta M (eds): *Blood substitutes. New challenges*. Birkhäuser, pp.34-59 (1996).
2. Carson JL, Willet LR: Is a hemoglobin of 10 g/dL required for surgery? *Med Clin North Am*. 77:335-347 (1993).
3. Dietz N, Joyner MJ, Warner M: Blood substitutes: Fluids, drugs, or miracle solutions? *Anesth Analg* 82:390-405 (1996).
4. Viele MK, Weiskopf RB, Fischer D: Recombinant human hemoglobin does not affect renal function in humans: analysis of safety and pharmacokinetics. *Anesthesiology* 86:848-858 (1997).
5. Kim HW, Greenburg AG: Hemoglobin mediated vasoactivity in isolated vascular rings. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 23:303-309 (1995).
6. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, 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).
7. Kosaka H, Uozumi M, Tyuma I: The interaction between nitrogen oxides and hemoglobin and endothelium-relaxing factor. *Free Radic Biol Med* 7:653-658 (1989).
8. Collins P, Burman J, Chung HI, Fox K: Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries in vivo. *Circulation* 87:80-85 (1993).
9. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS: S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380:221-226 (1996).

10. Ohlstein EH, Storer BL: Oxyhemoglobin stimulation of endothelin production in cultured endothelial cells. *J Neurosurg* 77:274-278 (1992).
11. Gulati A, Singh G., Rebello S, Sharma AC: Effect of diaspirin crosslinked hemoglobin and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci* 56:1433-1442 (1995).
12. Gulati A, Sharma AC, Singh G: Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med* 24:137-147 (1996).
13. Prouchayret F, Fasan G, Grandgeorge M, Vigneron C, Menu P, Dellacherie E: A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. I. Preparation, purification and characterisation. In: Chang TMS (ed): *Blood substitutes and oxygen carriers*. Marcel Dekker, Inc.; pp 144-147 (1993).
14. Faivre B, Menu P, Labrude P, Grandgeorge M, Vigneron C, Dellacherie E: A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. II. Physicochemical and physiological assessments. Preliminary results on guinea pig. In: Chang TMS (ed): *Blood substitutes and oxygen carriers*. Marcel Dekker, Inc.; pp 392-395 (1993).
15. Menu P, Faivre B, Labrude P, Riffard P, Grandgeorge M, Vigneron C: Human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran as a potential red blood cell substitute. II. Pharmacotoxicological evaluation. *Biomater Art Cells Immob Biotech* 22:551-558 (1994).
16. Menu P, Labrude P, Grandgeorge M, Vigneron C: Importance of purification on transfusional efficacy of haemoglobin solution. *Int J Artif Organs* 14:672-675 (1991).
17. Hartley CJ, Cole JS: An ultrasonic pulsed Doppler system for measuring blood flow in small vessels. *J Appl Physiol* 37:626-629 (1974).
18. Haywood JR, Shaffer RA, Fastenow C, Fink GD, Brody MJ: Regional blood flow measurement with pulsed Doppler flowmeter in conscious rat. *Am J Physiol* 241:H273-H278 (1981).
19. Leftheriotis G, Geraud JM, Preckel MP, Saumet JL: Cerebral blood flow and resistances during hypotensive haemorrhage in the rabbit: Transcranial Doppler and laser-Doppler flowmetry. *Clin Physiol* 15:537-545 (1995).

20. Little RA, Gorman D, Allgöwer M: The shock index revisited. In: Vincent JL (ed): *Update in intensive care and emergency medicine, vol 10*. Springer, Berlin Heidelberg New York: pp 505-513 (1990).
21. Chang TMS, Varma R: Effect of a single replacement of one of ringer lactate, hypertonic saline/dextran, 7% albumin, stroma-free hemoglobin, o-raffinose polyhemoglobin or whole blood on the long term survival of unanesthetized rats with lethal hemorrhagic shock after 67% acute blood loss. *Biomater Art Cells Immob Biotech* 20:503-510 (1992).
22. Thiemermann C, Szabo C, Mitchell JA, Vane JR: Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:267-271 (1993).
23. Kvetnansky R, Pacak K, Tokarev D, Jelokova J, Jezova D, Rusnak M: Chronic blockade of nitric oxide synthesis elevates plasma levels of catecholamines and their metabolites at rest and during stress in rats. *Neurochem.Res.* 22:995-1001 (1997).
24. Schultz SC, Grady B, Cole F, Hamilton I, Burhop K, Malcolm DS: A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 122:301-308 (1993).
25. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142 (1991).
26. Alayash AI, Cashon RE: Hemoglobin and free radicals: Implications for the development of a safe blood substitute. *Mol Med Today* 1:122-127 (1995).
27. Gulati A, Sen AP, Sharma AC, Singh G. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am.J.Physiol.* H827-H836 (1997).
28. Biro GP, Taichmann GC, Lada B, Keon WJ, Rosen AL, Sehgal LR: Coronary vascular actions of stroma-free hemoglobin preparations. *Art Organs* 12:40-50 (1988).
29. Vogel WM, Dennis RC, Cassidy G, Apstein CS, Valeri CR: Coronary constrictor effect of stroma-free hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 251:H413-H420 (1986).

30. Bunn HF, Esham WT, Bull RW: The renal handling of hemoglobin. I: Glomerular filtration. *J Exp Med* 129:909-922 (1969).

31. Menu P, Donner M, Faivre B, Labrude P, Vigneron C: In vitro effect of dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin on human blood rheological properties. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 23:319-330 (1995).

DESCRIPTION DU MODELE EXPERIMENTAL DE BASE

1 - Animaux

Des lapins mâles néo-zélandais blancs de 2,3 à 3,5 kg (élevage La Garenne, Villey-Saint-Etienne) ont été utilisés pour les expérimentations. Avant les manipulations, les lapins ont séjourné en animalerie avec accès à la boisson et à la nourriture *ad libitum*. A la fin des expérimentations, les lapins ont été euthanasiés par injection i.v. de pentobarbital sodique (Sanofi Santé Animale, France) en excès, conformément aux recommandations publiées par la Commission Européenne (Close B. *et al.*, 1996).

2 - Anesthésie et préparation des animaux

L'induction de l'anesthésie a été réalisée par injection intramusculaire d'une dose de kétamine (Kétalar[®], Parke-Davis, France) de 50 mg/kg de poids corporel. Après environ cinq minutes, le lapin a été placé en décubitus dorsal et chauffé au moyen de lampes pour maintenir sa température corporelle. Une dose de 40 mg/kg de pentobarbital sodique (Sanofi Santé Animale, France) dilué au quart dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%, Meram, France) a été injectée très lentement par la veine marginale externe de l'oreille au moyen d'un cathéter intraveineux (nécessaire épicanien Salva, Coopération Pharmaceutique Française, France) relié à un robinet à trois voies (Discofix[®]-3, Braun Melsungen, Allemagne). Pour éviter tout phénomène de coagulation, une faible quantité d'héparine (150 UI/kg, Sanofi Choay, France) a été administrée par cette voie. Le maintien de l'anesthésie a été réalisé par des injections horaires de pentobarbital sodique par la même voie.

Une anesthésie locale a été pratiquée avant toute incision en complément de l'anesthésie générale, par des injections en sous-cutané de lidocaïne adrénaline à 2% (Xylocaïne[®] 2%, Astra, France).

Afin d'éviter l'encombrement des voies aériennes supérieures, la trachée a été intubée grâce à une canule pédiatrique de 2,5 mm de diamètre. Sur la durée des expérimentations, le lapin a respiré spontanément l'air ambiant.

3 - Procédure opératoire et appareillage des animaux

Une incision a été pratiquée dans la région de l'aîne du côté droit sur environ 3 cm. L'artère fémorale a été isolée du trajet du nerf et de la veine (figure 34) puis dégagée et incisée afin d'y introduire un cathéter en polyéthylène (diamètre interne 0,76 mm et diamètre externe 1,22 mm, Merck-Clévenot Diagnostic, France) rempli de sérum physiologique hépariné. Le cathéter a été avancé lentement sur une longueur d'environ 5 cm de manière à émerger dans la partie distale de l'aorte abdominale.

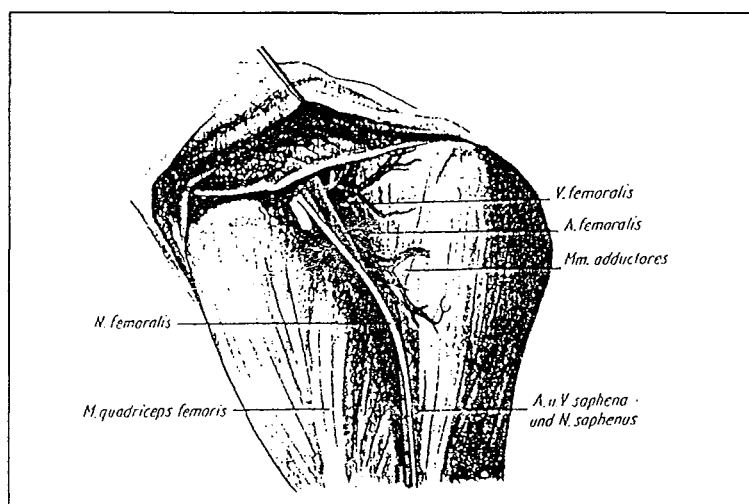


Figure 34. Trajet des nerfs et des vaisseaux sanguins dans l'espace crural de la cuisse droite chez le lapin. D'après Hoffmann G. Les animaux de laboratoire (Précis), Ed. Vigot Frères, 1963, p 138.

Une laparotomie longitudinale a été pratiquée du cartilage xyphoïde au pubis, puis les viscères ont été extraits de l'abdomen et placés entre des compresses stériles imbibées de sérum physiologique à 37°C. Les viscères ont ensuite été régulièrement arrosés de sérum physiologique à 37°C. Une portion de l'aorte abdominale sous-rénale a été isolée du tissu conjonctif sur une longueur d'environ 2 cm, à distance de deux ramifications lombaires consécutives. Sur cette portion de vaisseau, une sonde de vélocimétrie Doppler à gaine rigide de diamètre interne 2 mm (HDP-20-2.0, Crystal Biotech, USA) a été positionnée et maintenue en place au moyen de fils. Sur cette même portion et du côté céphalique, un cristal de mesure de dimension, de 1 mm (DMT-20-1.0, Crystal Biotech, USA) a été positionné et maintenu dans une "gaine" souple aménagée au moyen de Parafilm®.

Pour compenser les pertes hydriques par évaporation consécutives à l'ouverture du péritoine, un soluté de remplissage (NaCl 0,9%, Meram, France) a été perfusé en continu par la veine marginale de l'oreille au moyen d'un pousse-seringue (SE 400, Vial médical, France)

avec un débit de $10 \text{ mL} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. La valeur du débit de perfusion a été ajustée de manière à maintenir la volémie tout au long des expérimentations. Pour ce faire, l'évolution de l'hématocrite (exprimé pour des raisons de simplicité en %, plutôt qu'en L/L, unité officielle) dans le temps a été examinée chez des animaux témoins ($n=8$) selon le protocole décrit dans la figure 38. Pour chaque mesure, le volume de sang prélevé (environ $500 \mu\text{L}$) au moyen du cathéter artériel a été remplacé par un volume équivalent de sérum physiologique. Les résultats de la figure 35 indiquent que l'hématocrite augmente de manière non significative au cours des 4,5 heures suivant la fin de la période opératoire.

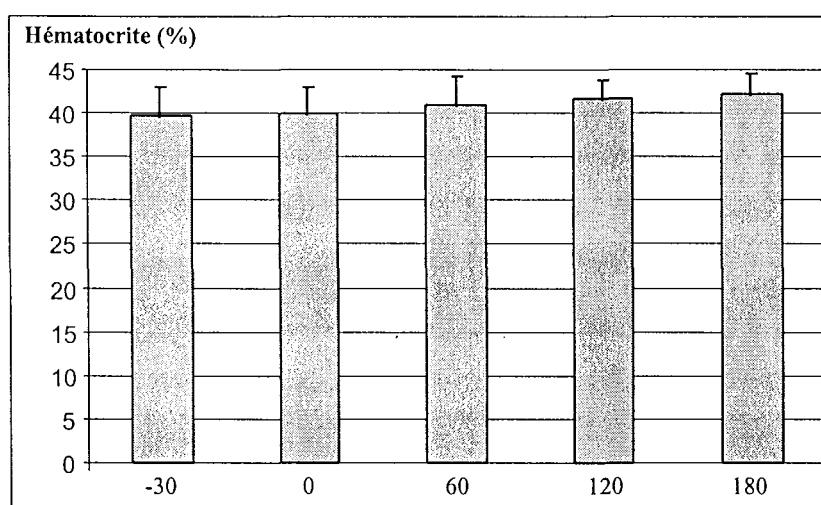


Figure 35. Evolution de l'hématocrite au cours du temps chez des lapins instrumentés anesthésiés ($n=8$). Les temps sont exprimés en minutes.

4 - Mesure des paramètres et acquisition des données

4.1 - Pression artérielle

La pression artérielle a été recueillie sous forme pulsatile au moyen du cathéter artériel fémoral relié à un capteur de pression (Viggo-Spectramed, France), lui-même connecté à un transducteur de pression (DA-100, Biopac system, USA).

4.2 - Vitesse sanguine aortique

La vitesse sanguine a été mesurée au niveau de l'aorte abdominale au moyen de la sonde décrite précédemment connectée à un module de vélocimétrie à effet Doppler pulsé (PD-20, Crystal Biotech, USA) alimenté par un module principal (CBI-8000, Crystal Biotech, USA). Le vélocimètre fonctionne avec une fréquence d'émission ultrasonore de 20 MHz et

une fréquence de répétition de 125 kHz, valeurs classiquement utilisées pour l'étude des vaisseaux de petite taille (Hartley CJ. *et al.*, 1974 ; Haywood JR. *et al.*, 1981). La distance optimale d'émission de l'onde ultrasonore a été ajustée grâce au dispositif audio de l'appareil de manière à obtenir la vitesse sanguine maximale (au centre du vaisseau). Cette distance fixée n'a plus varié au cours de l'expérience.

4.3 - Diamètre aortique et coefficient de distensibilité

Les mesures de diamètre aortique et de distensibilité ont été réalisées au moyen du cristal piézoélectrique de mesure de dimension connecté à un module de poursuite d'écho ultrasonore de 20 MHz (Wall Tracker, WT-20, Crystal Biotech, USA) alimenté par le module principal. Ce module permet de mesurer le diamètre de vaisseaux d'une taille de 1 à 32 mm avec une précision de 0,01 mm. Le principe de détermination du diamètre vasculaire est le suivant : le cristal positionné au contact du vaisseau (paroi proximale) émet des ultrasons en direction de la lumière vasculaire et perpendiculairement à la direction d'écoulement du sang. L'expérimentateur doit focaliser le faisceau ultrasonore sur la paroi opposée du vaisseau (paroi distale), de manière à recueillir l'écho qu'elle réfléchit. L'écho de la paroi distale est visualisé grâce à un oscilloscope (HM 303-4, Hameg, Allemagne) comme le montre la figure 36 et est repéré auditivement par un signal caractéristique. On procède alors à la calibration de l'appareil, puis le module est passé en mode poursuite d'écho de manière à suivre en continu le diamètre vasculaire. Pour permettre la synchronisation de l'écho de la paroi avec la fréquence cardiaque et ainsi empêcher la dérive du signal au cours du temps, le signal de la sonde Doppler est transmis au module Wall Tracker et utilisé comme déclencheur interne de remise en position initiale de l'écho à chaque battement cardiaque. Cette manipulation permet d'utiliser les données recueillies pour procéder ultérieurement au calcul du coefficient de distensibilité (DC) exprimé par la formule suivante :

$$DC = (2\Delta d/d)/\Delta P$$

avec Δd , la différence entre diamètre systolique et diamètre diastolique, d , le diamètre moyen et ΔP , la pression pulsée (Lehmann ED. *et al.*, 1993 ; Marchais SJ. *et al.*, 1993). L'intérêt de ce coefficient dans notre problématique sera détaillé dans la partie intitulée "*Etude comparative des effets cardiovasculaires induits par trois solutions d'hémoglobine humaine modifiée chimiquement*".

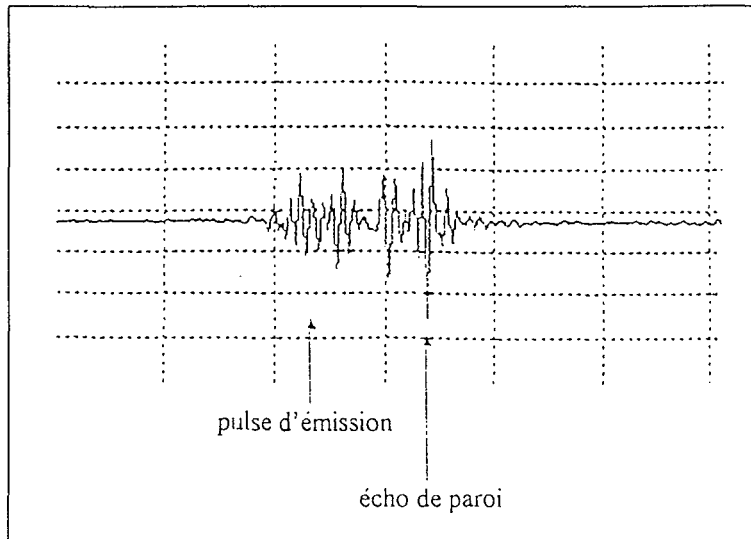


Figure 36. Exemple d'échos recueillis sur l'aorte abdominale d'un lapin anesthésié par le module de poursuite d'écho (Wall Tracker) et visualisés au moyen d'un oscilloscope.

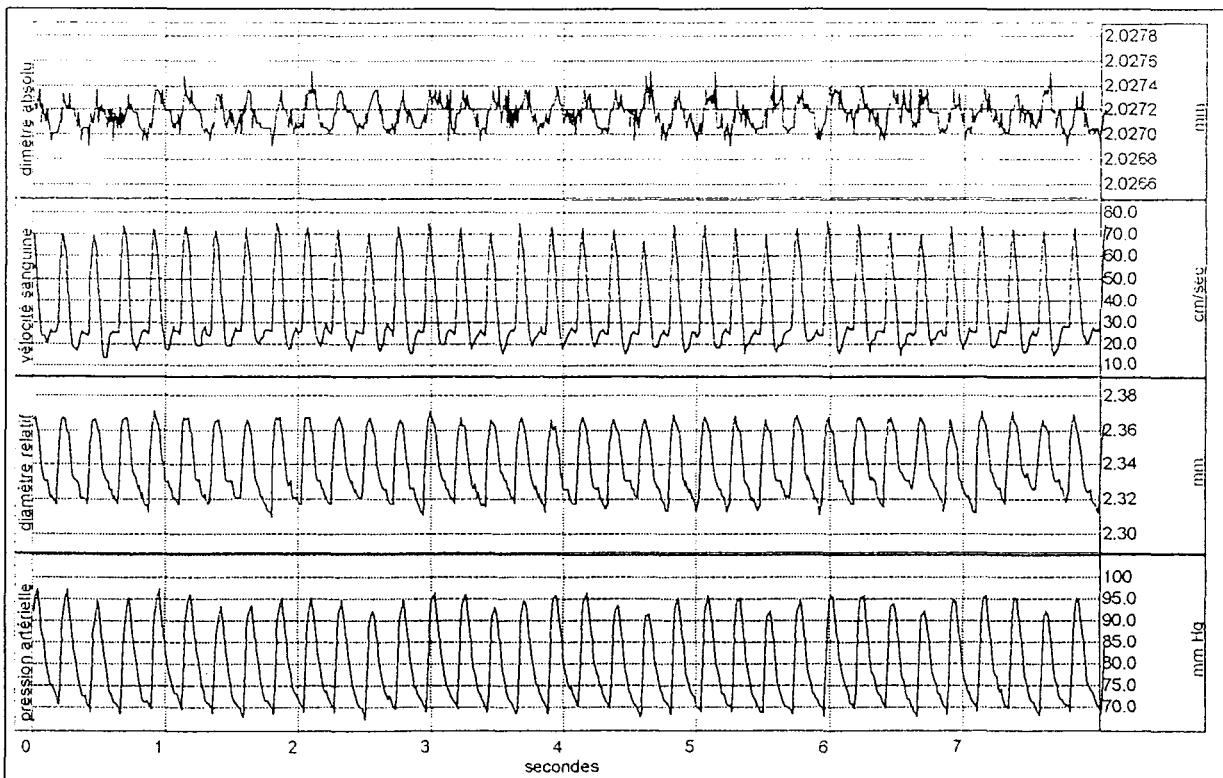


Figure 37. Exemple de tracés de pression artérielle, de diamètre aortique relatif, de vélocité sanguine aortique et de diamètre aortique absolu recueillis sur un lapin contrôle anesthésié.

4.4 - Acquisition des données

Le transducteur de pression, les modules Doppler et Wall Tracker ont été connectés à un convertisseur analogue-digital (Biopac system, USA). Les signaux numérisés de pression artérielle (en mm Hg), de vélocité sanguine aortique (en cm/s) et de diamètre aortique (en

artérielle (en mm Hg), de vitesse sanguine aortique (en cm/s) et de diamètre aortique (en mm) ont été recueillis en continu par un système d'acquisition (MP100, carte d'acquisition et logiciel Acqknowledge[®], Biopac system, USA) fonctionnant sur micro-ordinateur de type PC. Le taux d'échantillonnage a été fixé à 100 Hz afin de respecter le théorème de Shannon. Un exemple de tracé polygraphique regroupant la pression artérielle, la vitesse sanguine aortique et le diamètre aortique moyen et pulsatile est proposé dans la figure 37.

L'interprétation des données recueillies a nécessité un traitement *a posteriori* afin de calculer des paramètres complémentaires de ceux fournis par le logiciel d'acquisition.

5 - Caractérisation du modèle expérimental

Afin de caractériser le modèle que nous nous proposons d'utiliser, nous avons suivi l'évolution au cours du temps de différents paramètres hémodynamiques, à savoir la pression artérielle moyenne, la fréquence cardiaque, la vitesse sanguine aortique moyenne et la résistance périphérique en aval de l'aorte abdominale (estimée par le rapport pression artérielle/vitesse sanguine aortique) chez des animaux témoins (n=8). Ces paramètres ont été enregistrés en continu durant 4,5 heures à partir de la fin du protocole opératoire. Le traitement des données a été réalisé à des périodes prédéfinies sur des fenêtres d'analyse de 5 minutes comme décrit dans la figure 38.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 39. Pour chaque paramètre, la comparaison statistique des valeurs recueillies à chaque temps par rapport à la valeur de référence (t = -30) a été réalisée par ANOVA avec mesures répétées (logiciel Statview[®], Abacus Concepts, USA). On observe une diminution progressive mais non significative de la PAM et de la vitesse sanguine aortique. La fréquence cardiaque reste inchangée au cours du temps. Le calcul de la résistance périphérique montre une augmentation non significative de ce paramètre au cours du temps, qui semble être due à une modification progressive de la répartition des débits sanguins probablement à la faveur des organes vitaux.

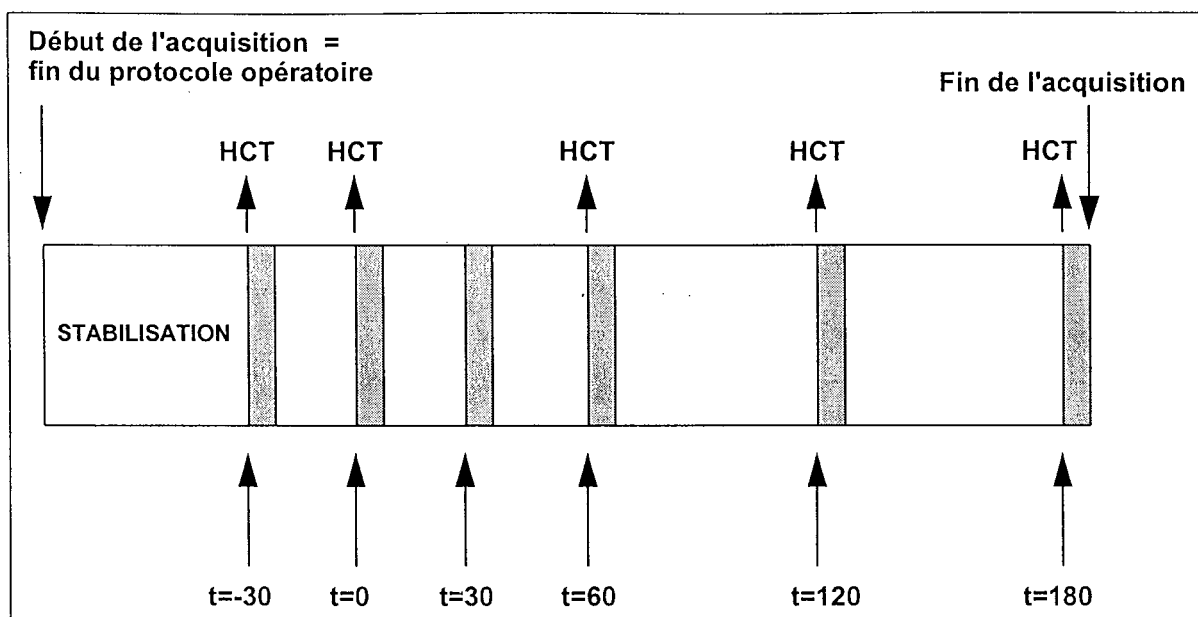


Figure 38. Diagramme schématisant les différentes phases d'analyse des paramètres hémodynamiques chez des lapins témoins instrumentés. Les fenêtres d'analyse sont représentées en gris et les temps sont exprimés en minutes.

HCT : hémocrite.

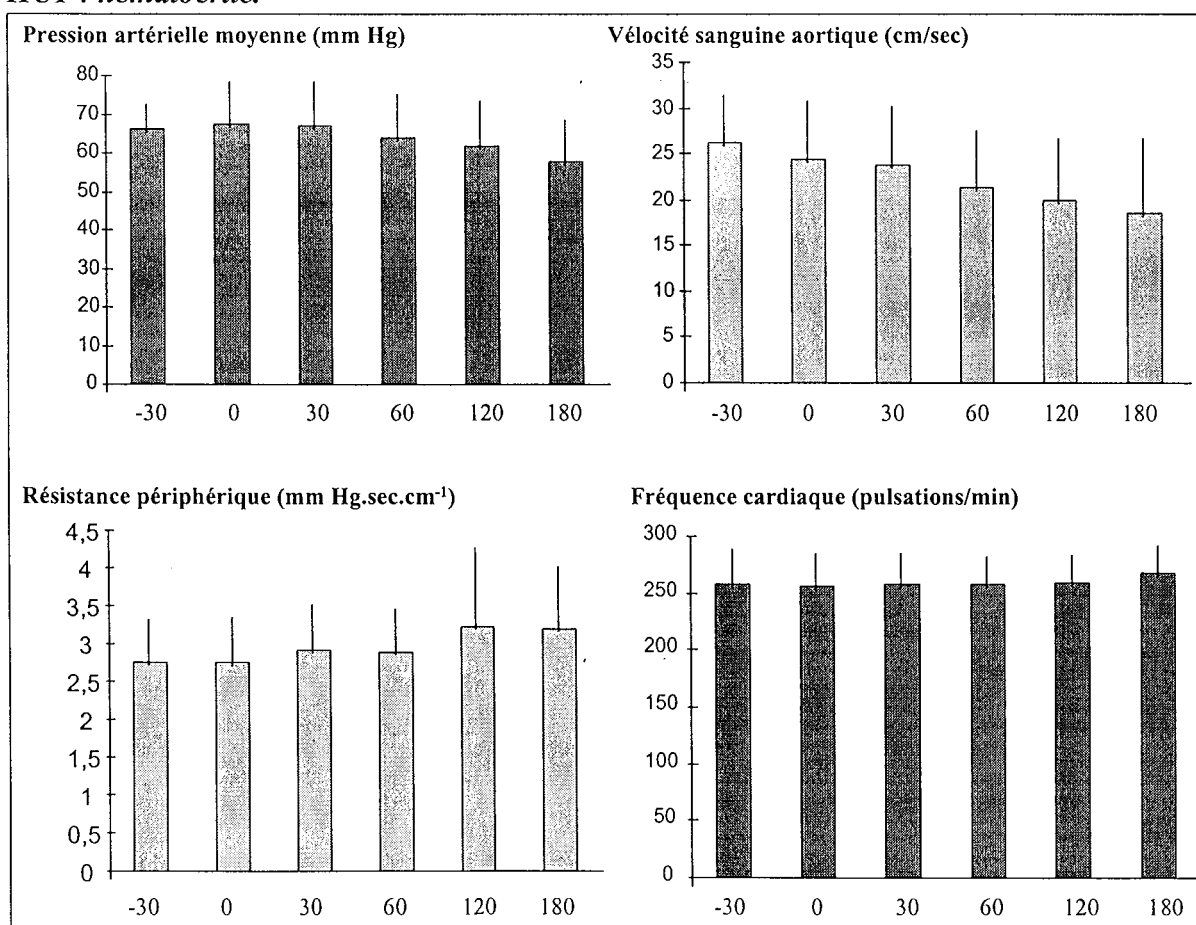


Figure 39. Evolution de la pression artérielle moyenne, de la vitesse sanguine aortique, de la résistance périphérique et de la fréquence cardiaque au cours du temps (exprimé en min.) chez des lapins témoins anesthésiés (n=8). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

Les paramètres hémodynamiques évoluent donc peu durant les 4,5 heures suivant la fin du protocole opératoire, ce qui indique une reproductibilité et une stabilité des valeurs recueillies durant cette période.

6 - Application du modèle à l'étude des effets d'un agent vasoconstricteur, le L-NAME

Avant d'envisager l'adaptation de ce modèle expérimental à l'étude des effets cardiovasculaires de solutions d'hémoglobine, nous avons comparé l'évolution des différents paramètres hémodynamiques au cours du temps, entre des groupes d'animaux contrôles ou traités par un agent vasoconstricteur classiquement utilisé en pharmacologie expérimentale, le L-NAME (N_ω-nitro-L-arginine méthyl ester, figure 40), analogue stérique de la L-arginine et inhibiteur de l'activité NO synthase (Bennett MA. *et al.*, 1992).

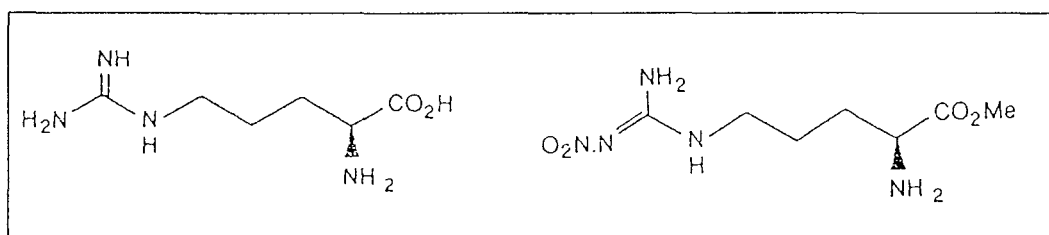


Figure 40 : Structures de la L-arginine (à gauche) et d'un de ses analogues stériques, le L-NAME (N_ω-nitro-L-arginine méthyl ester) (à droite).

Pour ce faire, les animaux ont été instrumentés selon le protocole décrit précédemment et répartis de façon aléatoire dans l'un des trois groupes expérimentaux suivants :

- un groupe "contrôle" dans lequel les animaux n'ont subi aucun traitement (n=8) ;
- un groupe dans lequel les animaux ont été traités par le L-NAME, à la dose de 2 mg/kg de poids corporel (n=5) ;
- un groupe dans lequel les animaux ont été traités par le L-NAME, à la dose de 10 mg/kg de poids corporel (n=6).

Dans chacun des groupes, la PAM, la fréquence cardiaque, la vitesse sanguine aortique, le diamètre aortique moyen et la distension aortique (différence entre les diamètres systoliques et diastoliques) ont été suivis durant quatre heures à partir de la fin de la phase opératoire. Le L-NAME (Fluka Chemika, Suisse), dissous extemporanément dans un faible volume de sérum physiologique (2 mL) afin de ne pas modifier sensiblement la volémie, a été injecté en bolus

par la veine marginale de l'oreille après une période de stabilisation de 60 min. Les résultats de cette étude sont proposés dans la figure 3 et le tableau II de la publication jointe en annexe 2. En bolus et à la dose de 10 mg/kg (décrite dans la littérature comme efficace durant plusieurs heures), nous avons observé une hypertension durable de l'ordre de 20% de la PAM initiale, accompagnée d'une chute de la fréquence cardiaque. La vélocité sanguine aortique moyenne est diminuée d'environ 50%, sans modification du diamètre aortique moyen. Ceci traduit donc une réduction du débit sanguin aortique consécutive à une vasoconstriction systémique engendrée par l'inhibition de la relaxation NO-dépendante. Les essais réalisés avec le L-NAME à 2 mg/kg ont permis de mettre en évidence une hypertension de moindre durée, sans modification significative du débit sanguin aortique.

Notre modèle d'étude permet donc de mettre en évidence des modifications hémodynamiques suite à l'administration d'un agent vasoconstricteur tel que le L-NAME, conformément à ce qui est décrit dans la littérature. Nous nous proposons maintenant d'appliquer ce modèle à l'étude des effets cardiovasculaires d'autres agents vasoconstricteurs potentiels que sont les solutions d'hémoglobine.

7 - Annexe 2

L'article cité en référence dans le présent chapitre est proposé ci-après.

PROPOSITION OF A TECHNIQUE TO ASSESS THE VASOACTIVE EFFECTS OF
HEMOGLOBIN-BASED OXYGEN CARRYING SOLUTIONS IN VIVO : PRELIMINARY
RESULTS IN THE RABBIT AORTA

Alexis Caron, Patrick Menu, Pierre Labrude and Claude Vigneron
Departments of Hematology and Physiology, Henri Poincaré University, Faculty of Pharmacy,
Nancy, France.

ABSTRACT

Most of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) increase the blood pressure after injection in the blood stream by a mechanism involving one or more factors that contribute to the regulation of the vascular tone. Many techniques make it possible to study the vascular effects of HBOCs both in vivo and in vitro. The in vivo methods assess the blood pressure and some estimated regional blood flows (use of radioactive or colored microspheres). Measurements of the real vessel diameter and blood flow would be useful to understand hemoglobin-mediated vasoconstriction mechanism. Our purpose was to elaborate an experimental model in anesthetized rabbits to monitor the diameter and the blood flow velocity in the same vessel in order to calculate the absolute blood flow. The blood flow velocity (in cm/s) was assessed by pulsed Doppler velocimetry and the diameter (in mm) was assessed by a technique of Wall Tracking. The first results indicate that the method is well adapted to study the effects of resuscitative fluids (plasma and blood substitutes) on the aorta vascular tone after hemodilution or resuscitation from severe hemorrhage.

INTRODUCTION

Hemoglobin-based oxygen carrying solutions (HBOCs) are a possible alternative to blood transfusion for the treatment of large hemorrhages and for pre-operative or per-operative hemodilution (1). Most of these solutions increase the blood pressure, by a mechanism involving one or more factors that contribute to the regulation of the vascular

tone. The strong affinity of hemoglobin for endothelium-derived nitric oxide results in an inhibition of the vascular relaxation as demonstrated *in vitro* (2) and *in vivo* (3). Other factors such as endothelin-1 or the superoxide anions generated in large amounts by hemoglobin autooxidation could take part to the pressor effect of the hemoglobin solutions by eliciting a constriction in different vascular beds (4,5).

Perfusion of isolated artery rings is the basic model of investigation to measure the modifications of vascular tone elicited by hemoglobin (6,7). In whole animal models, the vasoactivity of HBOCs has been assessed by blood pressure and regional blood flow measurements (8,9). These measurements underline hemoglobin-mediated macrohemodynamic alterations but the contribution of specific vascular beds remains unclear. Indeed, the size of the vessels is the main limitation to direct *in situ* measurements of absolute vascular diameter in small animals.

We propose here an experimental model based on ultrasonography technology designed to assess the short-term effects of HBOCs on the rabbit aorta tone. The model was applied to three potential clinical situations requiring the use of hemoglobin solutions: bolus injection, resuscitation from severe hemorrhage and hemodilution.

MATERIALS AND METHODS

Animals and anesthesia

Male New Zealand White rabbits weighing 2.5-3.0 kg (La Garenne, Villey-Saint-Etienne, France) were anesthetized with ketamine (25 mg/kg *i.m.*; Ketalar, Parke-Davies, France) and sodium pentobarbital (40 mg/kg *i.v.*; Sanofi Santé Animale, France). The anesthesia was maintained by infusion of sodium pentobarbital into the right marginal ear vein when required. The animal temperature was maintained at 37°C all through the experiment. Penicillin (200,000 UI/kg *i.v.*, Diamant, France) was given prior to the start of the operative procedure. The protocol was approved by the Animal Protection Bureau of the French Ministry for Fishing, Agriculture and Food, and the experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles for Research Involving Animals.

Surgical procedure

The right femoral artery was cannulated with a heparin-filled polyethylene catheter (0.58 mm ID, Biotrol, France) for measurements of blood pressure (P in mmHg) and for blood withdrawal. Laparotomy was performed and the abdominal aorta was approached. A

pulsed Doppler probe (Crystal Biotech, USA) and a Wall Tracker crystal (Crystal Biotech, USA) were placed at close distance on the vessel, to measure respectively the aorta blood flow (in cm/s) and absolute diameter (d in mm). After laparotomy, the animals were perfused continuously with 0.9% saline (Meram, France) at a rate of 10 mL/kg/h for fluid maintenance.

Parameters acquisition

The aorta blood flow was calculated by a 20 MHz pulsed Doppler velocimeter (PD-20, Crystal Biotech, USA) which operates with a single transducer crystal mounted on the vessel at 45 degrees (10). The aorta diameter was assessed by a 20 MHz Wall Tracking module (WT-20, Crystal Biotech, USA) which measures the absolute size of the arterial lumen from a single crystal transducer placed directly on the vessel surface, within a range of 1-12 mm and with a resolution of 0.01 mm. These two modules were alimented by a mainframe (CBI-8000, Crystal Biotech, USA) connected to a personal computer for continuous acquisition (Acqknowledge[®] software, Biopac Systems, USA). The aorta distensibility was calculated as the difference between the systolic and diastolic diameter for each heart beat. The blood pressure was measured by a pressure transducer (Viggo-Spectramed, France) connected to the computer and the mean arterial pressure (MAP) was calculated according to the formula:

$$\text{MAP} = (\text{systolic pressure} - \text{diastolic pressure})/3 + \text{diastolic pressure}.$$

The heart rate was derived as the reciprocal of the interval between two consecutive systolic peaks. Concurrent tracings of the parameters are presented in figure 1.

Drugs and solutions

The nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester) was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Dex-BTC-Hb (dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin) was prepared in our laboratory in collaboration with Pasteur-Mérieux sérums & vaccins (Marcy L'Etoile, France). Human hemoglobin was conjugated to macromolecules of dextran-benzene-tetracarboxylate to increase the plasmatic lifespan and to decrease the oxygen affinity of hemoglobin as needed for a use as a potential oxygen carrier. This hemoglobin solution was prepared according to the protocol described by Menu et al. (11). The physico chemical characteristics of Dex-BTC-Hb solution are presented in Table I. Human albumin solution (50 g/L) was purchased from Pasteur-Mérieux sérums & vaccins (Marcy L'Etoile, France).

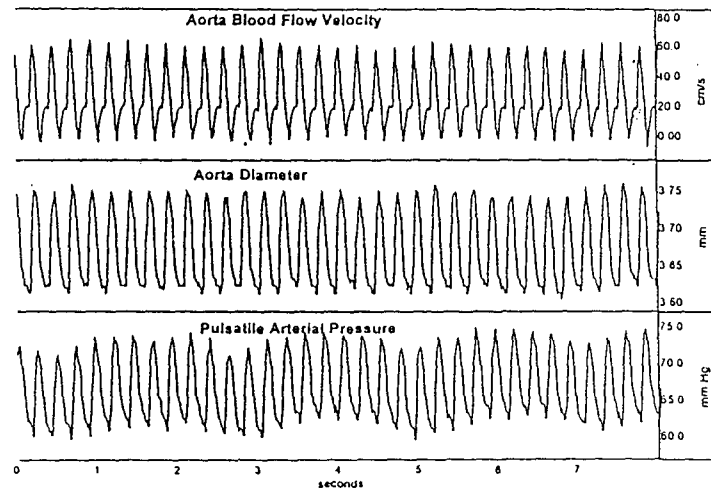


Figure 1. Simultaneous tracings of aorta blood flow velocity (top), aorta diameter (mid) and pulsatile arterial pressure (bottom) in a control anesthetized rabbit.

TABLE I: Physico-chemical characteristics of Dex-BTC-Hb.

Total Hemoglobin (g/L)	75
Methemoglobin (%)	4.6
Free Hemoglobin (%)	<5
Free Dex-BTC (g/L)	4.8
P_{50} (torr)	23
Osmolality (mOsm/kg)	290

Experimental protocols

The animals were randomly assigned to one of the groups described below. After instrumentation, the animals were allowed to equilibrate for 60 min before starting the experiments. In each protocol, blood pressure, heart rate, aorta blood flow velocity, aorta distensibility and diameter were recorded for 3 hours after the end of injection ($t = 0$).

1) Validation of the methodology

The accuracy of our methodology was checked by testing the reactivity of the abdominal aorta with vasoactive drugs. Control animals did not receive any drug ($n = 8$). In the second and third groups, animals ($n = 5$ and $n = 6$, respectively) received a bolus i.v. injection of L-NAME at the dose of 2 mg/kg and 10 mg/kg respectively (in 2 mL of 0.9% saline). Concurrent tracings of aorta blood flow velocity, blood pressure and aorta diameter before and after injection of L-NAME 10 mg/kg are presented in figure 2.

2) Bolus injection of Dex-BTC-Hb

The same protocol was applied to animals treated with 50 mg/kg of Dex-BTC-Hb ($n = 5$) given as a bolus i.v. injection (in 2 mL of 0.9% saline).

3) Model of hemorrhage and resuscitation

In this third set of experiments, our methodology was tested in a model of resuscitation from severe hemorrhage (30% of total blood volume, estimated as 6.5 % of body

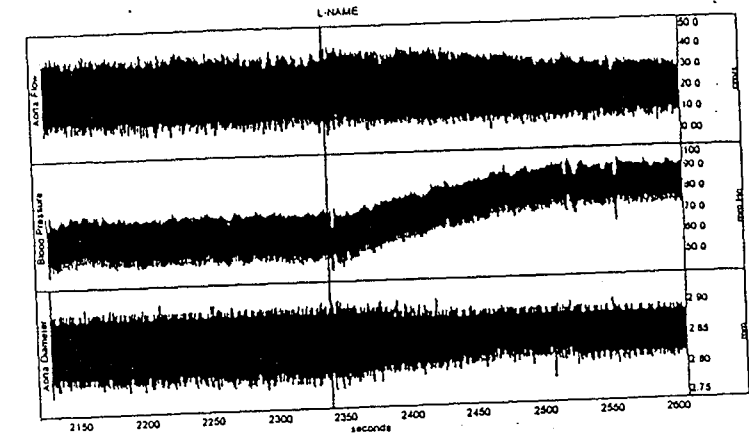


Figure 2. Simultaneous tracings of aorta blood flow velocity (top), pulsatile arterial pressure (mid) and aorta diameter (bottom) in an anesthetized rabbit treated with L-NAME (10 mg/kg).

weight). Animals were anesthetized by continuous infusion of ketamine (Ketalar, Parke-Davis). Hemorrhage was started by withdrawing 30% of blood volume by the femoral catheter. Because the arterial catheter was used for blood withdrawal, measurement of blood pressure was discontinued during the hemorrhage, and was restarted as soon as it ended. Animals were let in hypovolemia for 15 minutes and resuscitation was performed with a 50 g/L albumin solution (0.975 g/kg) or Dex-BTC-Hb (1.460 g/kg), injected in the right marginal ear vein at a constant flow rate of 2 mL/min.

4) Experimental protocol of hemodilution

This set of experiments consisted in a normovolemic hemodilution, another potential clinical situation requiring the use of hemoglobin solutions. Normovolemic hemodilution was performed by partial transfusion exchange (20% of total blood volume) with a 50 g/L albumin solution (0.650 g/kg) or Dex-BTC-Hb (0.975 g/kg). Blood was withdrawn by the femoral catheter and the solutions were infused in the right marginal ear vein.

RESULTS

1) Validation of the methodology

The results are presented in figure 3. In control animals, aorta distensibility and absolute diameter were stable all through the experiments. A slight decrease in mean arterial pressure and aorta blood flow velocity was observed.

Injection of L-NAME 2 mg/kg increased mean arterial pressure (71.0 ± 11.7 mm Hg vs 66.1 ± 9.9 mm Hg), decreased aorta blood flow velocity (20.8 ± 3.7 cm/s vs 26.9 ± 3.6 cm/s) and decreased aorta distensibility (0.08 ± 0.02 mm vs 0.11 ± 0.03 mm). The maximal effect on aorta distensibility was observed in the first 30 minutes following injection. Absolute aorta diameter was not modified. A decrease in heart rate was observed (Table II).

Injection of L-NAME 10 mg/kg increased mean arterial pressure (76.6 ± 2.7 mm Hg vs 63.0 ± 1.9 mm Hg), decreased aorta blood flow velocity (15.7 ± 4.4 cm/s vs 26.3 ± 5.4 cm/s) and decreased aorta distensibility (0.08 ± 0.02 mm vs 0.13 ± 0.01 mm). The maximal effect on aorta distensibility was observed in the first 30 minutes following injection. Absolute aorta diameter was not modified. A decrease in heart rate was observed (Table II).

2) Bolus Injection of Dex-BTC-Hb (figure 4)

Injection of Dex-BTC-Hb increased mean arterial pressure (75.6 ± 10.1 mm Hg vs 67.2 ± 13.4 mm Hg) and decreased slightly aorta distensibility (0.11 ± 0.03 mm vs $0.13 \pm$

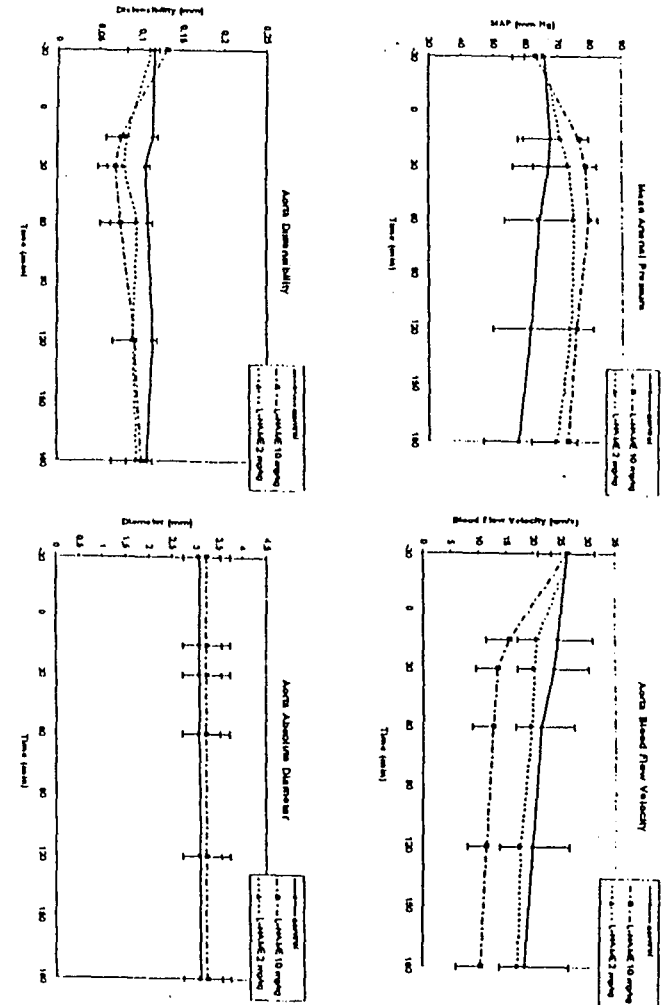


Figure 3. Changes in mean arterial pressure, aorta blood flow velocity, aorta distensibility and aorta absolute diameter in control animals ($n = 5$), and animals treated with L-NAME 2 mg/kg ($n = 5$) and L-NAME 10 mg/kg ($n = 6$). Bolus injection is represented by time $t = 0$. Values are mean \pm SEM.

TABLE II: Heart rate values (in beats/min) in control animals and after injection of L-NAME 2 mg/kg or L-NAME 10 mg/kg.

	Control (n = 8)	L-NAME 2 mg/kg (n = 5)	L-NAME 10 mg/kg (n = 6)
Baseline	258 ± 29	266 ± 15	273 ± 22
t = 0 min	257 ± 28	245 ± 9	249 ± 17
t = 30 min	258 ± 27	245 ± 21	238 ± 18
t = 60 min	258 ± 22	253 ± 21	236 ± 13
t = 120 min	260 ± 21	257 ± 27	234 ± 7
t = 180 min	268 ± 25	261 ± 27	238 ± 19

0.03 mm). Maximal decrease in aorta distensibility was observed 30 minutes after injection. Aorta blood flow was not altered in the first 60 minutes after injection. Absolute aorta diameter was not modified. A slight decrease in heart rate was observed (Table III).

Hemorrhage and resuscitation (figure 5)

Hemorrhage decreased mean arterial pressure and aorta blood flow velocity but had no effect on aorta absolute diameter and distensibility.

Resuscitation with albumin made it possible to maintain mean arterial pressure in basal values and increased aorta blood flow immediately (32.8 ± 13.4 cm/s vs 24.7 ± 9.2 cm/s). Thirty minutes later, aorta blood flow returned to basal values and decreased after 60 minutes. Aorta absolute diameter was not modified and aorta distensibility slightly increased after resuscitation with albumin. Heart rate decreased slightly after resuscitation (Table IV).

Resuscitation with Dex-BTC-Hb gave rise to an immediate and sustained increase in mean arterial pressure (84.9 ± 7.8 mm Hg vs 58.4 ± 3.9 mm Hg) and a transitory increase in aorta blood flow velocity (33.9 ± 11.7 cm/s vs 24.4 ± 6.4 cm/s). After 60 minutes, aorta blood flow decreased progressively. Aorta distensibility and absolute diameter were not modified after resuscitation with Dex-BTC-Hb. Heart rate decreased after injection (Table IV).

Normovolemic hemodilution (figure 6)

Hemodilution with 50 g/L albumin failed to maintain correct mean arterial pressure but maintained correct aorta blood flow velocity during 120 minutes. Aorta blood flow

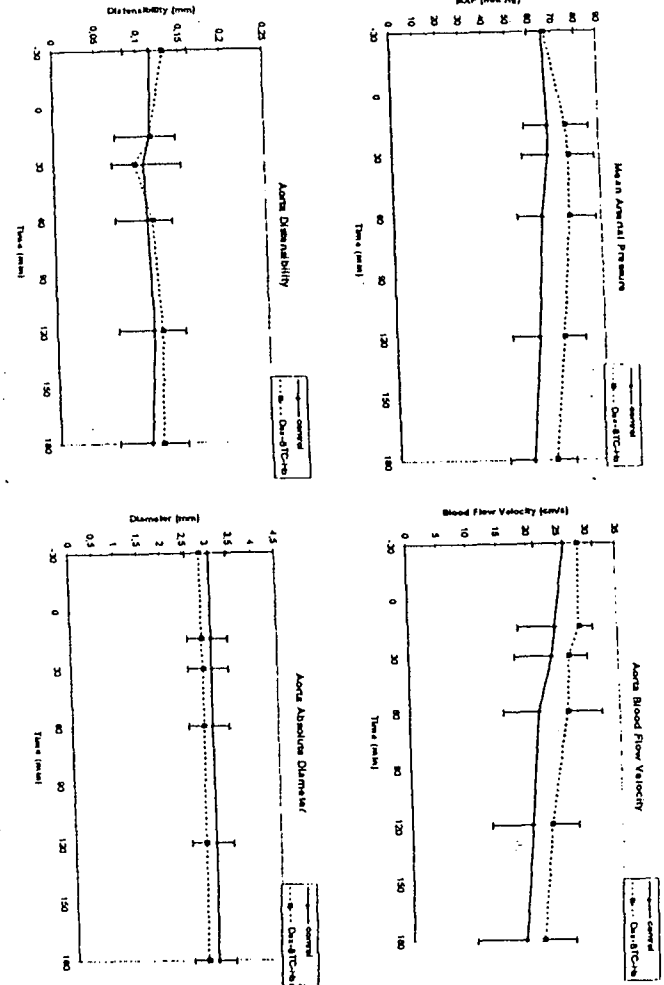


Figure 4. Changes in mean arterial pressure, aorta blood flow velocity, aorta distensibility and aorta absolute diameter in control animals (n = 8), and animals treated with Dex-BTC-Hb 50 mg/kg (n = 5). Bolus injection is represented by time t = 0. Values are mean ± s.e.m.

TABLE III: Heart rate values (in beats/min) in control animals and animals treated with a bolus injection of Dex-BTC-11b (50 mg/kg).

	Control (n = 8)	Dex-BTC-11b (n = 5)
Baseline	258 ± 29	262 ± 16
t = 0 min	257 ± 28	253 ± 19
t = 30 min	258 ± 27	251 ± 21
t = 60 min	258 ± 22	258 ± 9
t = 120 min	260 ± 21	263 ± 20
t = 180 min	268 ± 25	256 ± 26

decreased after 120 minutes. Aorta absolute diameter was unchanged after hemodilution and aorta distensibility slightly increased in the first hour (0.12 ± 0.03 mm vs 0.10 ± 0.03 mm). Aorta distensibility returned progressively to basal values after 60 minutes. Heart rate was not altered by hemodilution with albumin (Table V).

Hemodilution with Dex-BTC-11b gave rise to a sustained increase in mean arterial pressure which was maximal in the first 30 minutes following transfusion exchange (85.4 ± 4.2 mm Hg vs 65.5 ± 9.4 mm Hg). Aorta blood flow velocity increased in the first 15 minutes following transfusion exchange (40.8 ± 8.3 cm/s vs 29.9 ± 2.2 cm/s) and decreased progressively after 30 minutes. Aorta absolute diameter was not modified after hemodilution and aorta distensibility slightly decreased (0.08 ± 0.03 m vs 0.10 ± 0.03 mm). Heart rate decreased after hemodilution with Dex-BTC-11b (Table V).

DISCUSSION

In vitro studies have demonstrated the vasoconstrictor action of hemoglobin in isolated arteries due to nitric oxide scavenging (2,7,9). In vivo, measurements of absolute diameter in arteries of small animals perfused with hemoglobin is limited by the size of the vessels. We proposed here an experimental model in anesthetized rabbits to monitor the diameter and blood flow velocity in the same vessel in order to calculate absolute blood flow values in real time. The first experimental procedures were performed in the abdominal aorta

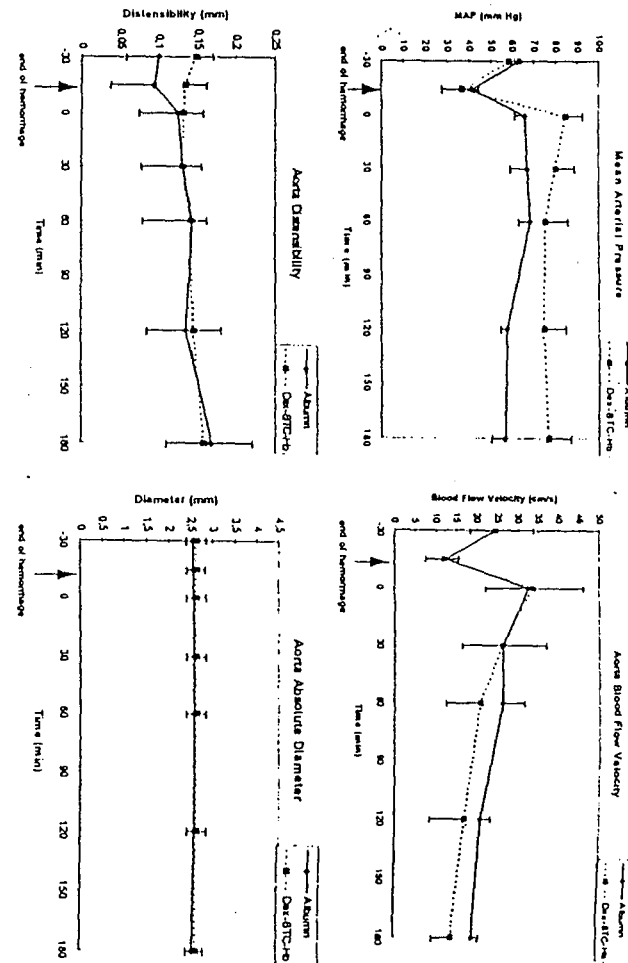


Figure 5. Changes in mean arterial pressure, aorta distensibility and aorta absolute diameter in animals resuscitated from severe hemorrhage with albumin (50 g/L; n = 5) or Dex-BTC-11b (75 g/L; n = 5). End of resuscitation is represented by time t = 0. Values are mean \pm s.e.m.

TABLE IV: Heart rate values (in beats/min) before and after hemorrhage and resuscitation with albumin (0.975 g/kg) and Dex-BTC-11b (1.460 g/kg).

	albumin (n = 5)	Dex-BTC-11b (n = 5)
Baseline	222 ± 18	191 ± 28
Hemorrhage	192 ± 8	176 ± 24
t = 0 min	200 ± 18	178 ± 22
t = 30 min	195 ± 21	165 ± 22
t = 60 min	205 ± 32	160 ± 19
t = 120 min	192 ± 29	155 ± 18
t = 180 min	198 ± 27	160 ± 21

and the use of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME made it possible to check out the ability of the methodology to study changes in mechanical properties of arteries. As expected, the absolute diameter of this conductance vessel was not affected, but the increase in mean arterial pressure elicited by L-NAME gave rise to a decrease in aorta distensibility (fig. 2 and 3). Simultaneous measurements of blood flow velocity indicated that L-NAME induced a dose-dependent decrease in aorta blood flow which may be attributed to peripheral vasoconstriction due to inhibition of nitric oxide-dependent relaxation.

The experimental protocol was applied to animals treated with a solution of chemically-modified hemoglobin, Dex-BTC-11b, in three different situations. As described previously, Dex-BTC-11b increased mean arterial pressure immediately after infusion in animals (10). In none of the three sets of experiments, absolute aorta diameter was modified after injection of Dex-BTC-11b, but differential alterations of aorta blood flow and distensibility were observed. Dex-BTC-11b infused as a bolus (0.05 g/kg) increased transitory mean arterial pressure and decrease aorta distensibility. Aorta blood flow was similar between control animals and hemoglobin-treated animals (fig. 4). The small amounts of hemoglobin could explain the weak changes in hemodynamics. Indeed, hemodilution by partial transfusion exchange and resuscitation from hemorrhage with hemoglobin gave rise to more marked modifications. Dex-BTC-11b (0.975 g/kg) increased mean arterial pressure and decreased aorta distensibility for the 3 hours of measurements (fig.6). In the protocol of

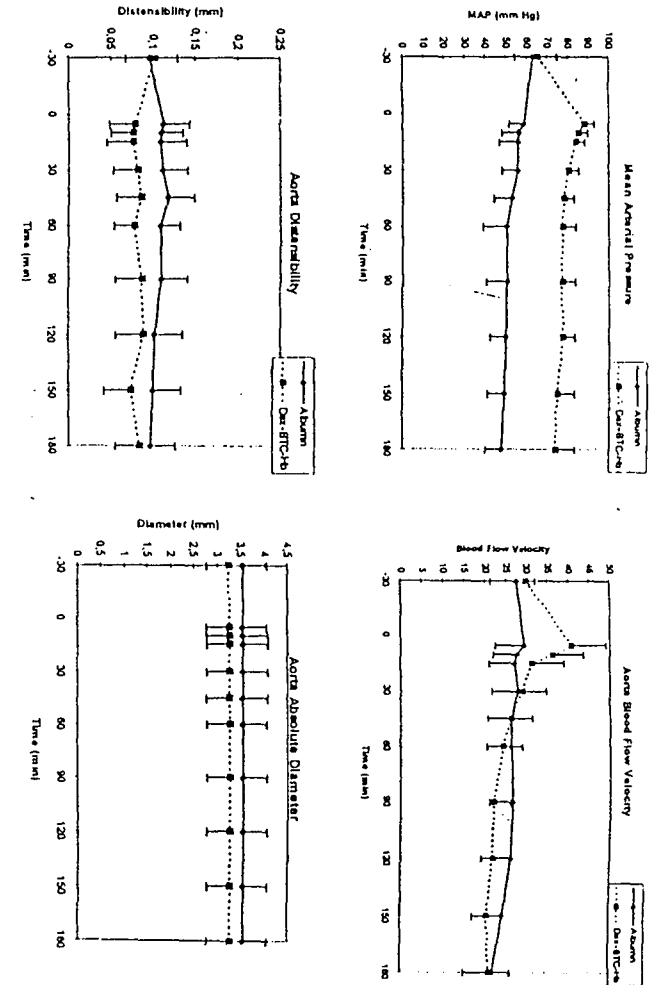


Figure 6. Changes in mean arterial pressure, aorta blood flow velocity, aorta distensibility and aorta absolute diameter in hemodiluted animals by partial transfusion exchange with albumin (50 g/L; n = 8) or Dex-BTC-11b (75 g/L; n = 8). End of partial transfusion exchange is represented by time t = 0. Values are mean ± s.e.m.

TABLE V: Heart rate values (in beats/min) before and at different times after hemodilution with albumin (0.650 g/kg) and Dex-BTC-Hb (0.975 g/kg).

	albumin (n = 8)	Dex-BTC-Hb (n = 8)
Baseline	255 ± 23	275 ± 23
t = 0 min	252 ± 30	240 ± 15
t = 30 min	259 ± 26	258 ± 29
t = 60 min	263 ± 29	259 ± 30
t = 120 min	264 ± 23	261 ± 22
t = 180 min	261 ± 21	264 ± 21

hemorrhage and resuscitation (fig. 5), the aorta distensibility was not affected, while a decrease was observed after partial transfusion exchange (fig. 6). This may be due to modifications of vascular tone by sympathetic stimulation after hemorrhage. Both after resuscitation from hemorrhage and partial transfusion exchange, a decrease in aorta blood flow was observed after 60 minutes, compared to albumin-treated animals. This could be explained by peripheral vasoconstriction leading to blood flow redistribution.

These results in abdominal aorta are being extended to peripheral vessels in order to compare the action of hemoglobin in central and peripheral vasculature. Hence, the specific influence of hemoglobin on muscular and elastic arterial walls could be examined and the interaction of hemoglobin with endothelial relaxing and contracting factors could be understood better. Preliminary results indicated that the size of the crystals and probes is suitable to study the vascular tone of superior mesenteric artery in anesthetized rabbits.

Our methodology has several advantages compared to common techniques assessing regional blood flows in small animals described in the literature about HBOCs. Simultaneous measurements of absolute vessel diameter and blood flow velocity provide absolute blood flow, contrary to single Doppler flowmetry in which blood flow values are estimated since vessel lumen size is fixed (10). Moreover, implantation of Doppler probe and crystal in the same animal makes it possible to reduce the number of animals, since the parameters can be acquired in real time and continuously for several hours. The experimental procedures we described were tested in acute investigations, but long-term implantation of the Doppler

probes are also possible for chronic investigations (12). Fixing of the Wall Tracker crystal is a limitation to chronic measurements of absolute vessel diameter, and several alternatives are presently being tested to obtain optimal implantation for chronic investigations.

In conclusion, we propose a whole animal model based on ultrasonography to evaluate the effects of vasoactive drugs. Changes in aorta distensibility and blood flow were observed with both a nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME, and a nitric oxide scavenger, hemoglobin. This model could be applied to the evaluation and/or comparison of the vasoconstrictor effects of HBOCs in development, both in central and peripheral vessels.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the *Association Recherche et Transfusion* (Paris, France) and the *Délégation à la Recherche et à la Technologie en Lorraine*.

REFERENCES

- Rabinovici R, Neville LF, Rudolph AS, Feuerstein G. Hemoglobin-based oxygen-carrying resuscitation fluids. *Crit.Care Med.* 1995;23:801-804.
- Greenburg AG, Kim HW. Hemoglobin mediated vasoactivity in isolated vascular rings. *Art.Cells,Blood Subs.,and Immob.Biotech.* 1995;23:303-309.
- Collins P, Burman J, Chung H-I, Fox K. Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries in vivo. *Circulation* 1993;87:80-85.
- Alayash AI, Cashon R. Reactions of nitric oxide and hydrogen peroxide with hemoglobin-based blood substitutes. *Ann.NY.Acad.Sci.* 1994; 738:378-381.
- Gulati A, Sharma AC, Singh G. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit.Care Med.* 1996;24:137-147.
- Hart JL, Ledvina MA, Muldoon SM. Actions of diaspirin cross-linked hemoglobin on isolated rat and dog vessels. *J.Lab.Clin.Med.* 1997;129:356-363.
- Rioux F, Drapeau G, Marceau F. Recombinant human hemoglobin (rhb1.1) selectively inhibits vasorelaxation elicited by nitric oxide donors in rabbit isolated aortic rings. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1995;25:587-594.
- Gulati A, Sharma AC, Burhop KE. Effect of stroma-free hemoglobin and diaspirin cross-linked hemoglobin on the regional circulation and systemic hemodynamics. *Life Sci.* 1994;55:827-837.
- Cases A, Stulak JM, Katusic Z, Villa E, Romero JC. Hemodynamic and renal effects of cross-linked hemoglobin infusion. *Am.J.Physiol.* 1997;272:R793-R799.

10. Haywood JR, Schaffer RA, Fastenow C, Fink GD, Brody MJ. Regional blood flow measurement with pulsed Doppler flowmeter in conscious rat. *Am.J.Physiol.* 1981;241:H273-H278.
11. Menu P, Faivre B, Labrude P, Riffard P, Grandgeorge M, Vigneron C. Human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran as a potential red blood cell substitute. II. Pharmacotoxicological evaluation. *Biomat. Art. Cells Immob. Biotech.* 1994;22:551-558.
12. Yu Y-H, Zhu B-S, Blessing WW. Continuous measurements of changes in internal carotid and vertebral arterial blood flow with chronically implanted ultrasonic Doppler probes in anesthetized and conscious rabbits. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1996;16:1058-1067.

ADAPTATION DU MODELE A L'ETUDE DES EFFETS CARDIOVASCULAIRES INDUITS PAR DES SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE EN SITUATION D'HEMODILUTION

Dans le domaine des applications potentielles des substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine, l'hémodilution intentionnelle représente une part importante des travaux de recherche préclinique et clinique menés actuellement. Néanmoins, la variabilité des modèles d'étude envisagés (dose injectée, état physio-pathologique, paramètres mesurés, etc.) rend délicate une comparaison des effets cardiovasculaires des différents substituts testés.

Dans le but d'étudier de manière objective l'action de trois solutions d'hémoglobine humaine modifiée chimiquement (dont deux font actuellement l'objet d'essais cliniques) sur les paramètres hémodynamiques, nous avons voulu adapter le modèle animal présenté au chapitre précédent à une situation d'hémodilution. Le choix du protocole d'hémodilution a été arrêté en fonction des critères énoncés dans l'introduction à la partie expérimentale. Nous avons souhaité mettre au point un modèle permettant de suivre les effets sur l'hémodynamique à court terme d'une hémodilution isovolémique, par échange transfusionnel partiel, avec différents succédanés du plasma, à la fois au niveau central et périphérique. Le choix d'un vaisseau de la circulation périphérique de taille compatible avec la dimension des sondes de vélocimétrie et des cristaux de mesure de diamètre vasculaire a été le premier point à considérer dans l'adaptation du modèle.

1 - Mise au point des techniques de mesure de vitesse sanguine et de diamètre vasculaire au niveau périphérique

Si la gamme des sondes de vélocimétrie disponibles permet de satisfaire au critère de taille, la dimension minimale des cristaux de mesure de diamètre commercialisés étant de 1 mm, le choix d'un vaisseau périphérique accessible sans trop alourdir le protocole chirurgical et satisfaisant à ce critère est restreint. Nous avons donc étudié la faisabilité des mesures sur l'artère mésentérique supérieure, l'artère rénale et l'artère fémorale.

1.1 - L'artère mésentérique supérieure

L'artère mésentérique supérieure est accessible après laparotomie longitudinale, sans intervention chirurgicale supplémentaire que celle décrite dans le modèle de base. Le vaisseau a été dégagé sur environ 2 cm, à distance de sa naissance de l'aorte et avant sa ramification en artères pancréatico-duodénales. Cette zone est particulièrement riche en vaisseaux lymphatiques de gros calibre dont l'intégrité doit être respectée lors de l'approche de l'artère pour éviter tout épanchement de fluide perturbant la qualité du signal recueilli par le cristal de mesure de diamètre et susceptible de modifier l'homéostasie.

La mesure de la vitesse sanguine a été réalisée au moyen d'une sonde Doppler à gaine rigide de diamètre interne 1,5 mm (HDP-20-1.5, Crystal Biotech, USA) maintenue en place par des fils et connectée à un module de mesure de hautes vitesses à effet Doppler pulsé (HVPD-20, Crystal Biotech, USA). Ce type de module a été choisi en raison des vitesses sanguines élevées régnant dans l'artère qui ne peuvent être déterminées par un module classique tel que celui utilisé au niveau aortique. En effet, si la fréquence Doppler (ou Δf) est supérieure à la moitié de la fréquence de répétition (dans notre cas, 125 kHz), le signal ne peut être correctement mesuré (équation de Nyquist). On observe alors le phénomène d'inversion de pic ou "*aliasing*" : la partie haute du profil de vitesse est inversée et le signal recueilli a la forme d'un "M" (figure 41A). La qualité du signal de vitesse sanguine obtenu par correction de cet artefact au moyen du module de vélocimétrie adapté aux hautes vitesses circulatoires s'est avérée satisfaisante et parfaitement reproductible (figure 41B).

La mesure du diamètre mésentérique a été effectuée au moyen d'un cristal de 1 mm de diamètre (DMT-20-1.0, Crystal Biotech, USA) positionné du côté céphalique par rapport à la sonde et maintenu dans une "gaine" souple aménagée au moyen de Parafilm[®]. Le cristal est connecté au module de poursuite d'écho ultrasonore de 20 MHz (Wall Tracker, WT-20, Crystal Biotech, USA) précédemment décrit. La qualité des signaux recueillis sur l'artère mésentérique supérieure s'est révélée très variable, aussi bien sur un même animal au cours du temps que d'un animal à l'autre. En effet, le calibre de l'artère mésentérique, plus faible que celui de l'aorte abdominale, ne permet d'obtenir que difficilement une surface de contact suffisante entre le cristal de mesure et le vaisseau lui-même. De plus, la stabilité du signal est perturbée par la fréquence ventilatoire du fait de la proximité des muscles respiratoires, comme en témoigne la figure 42. Pour tenter de remédier à la limitation de taille, nous avons testé un prototype de cristal de 0,5 mm (Crystal Biotech, USA) afin d'améliorer le contact avec le vaisseau, mais le problème de perturbation du signal par la ventilation n'a pu être

résolu de manière définitive. Nous ne sommes donc pas parvenus à obtenir une méthode de mesure du diamètre vasculaire suffisamment reproductible sur ce type de vaisseau.

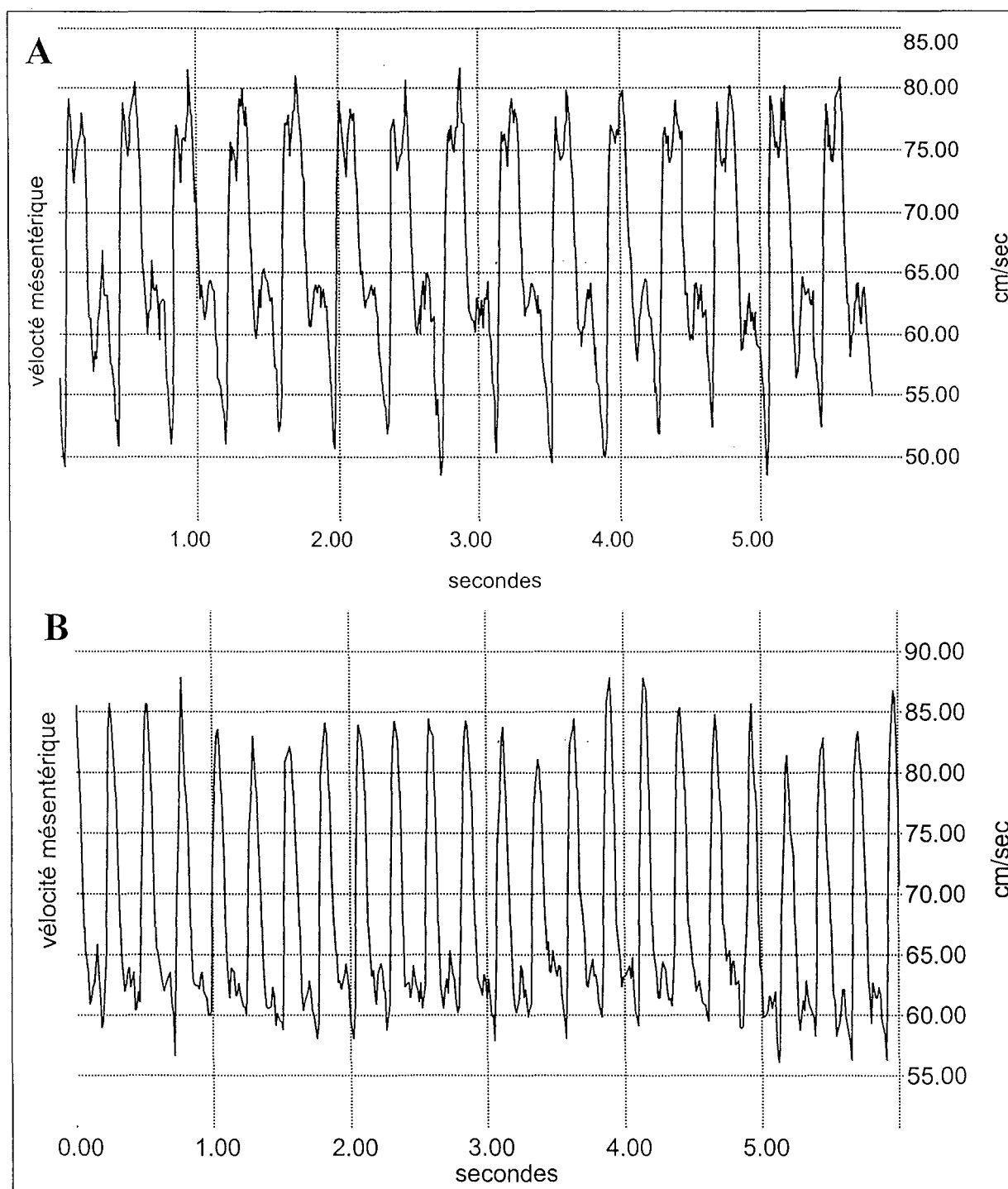


Figure 41. Le phénomène d'"aliasing".

A : Signaux de vélocité sanguine recueillis sur une artère mésentérique supérieure de lapin anesthésié mettant en évidence le phénomène d'"aliasing".

B : Signaux de vélocité sanguine recueillis sur une artère mésentérique supérieure de lapin anesthésié avec correction du phénomène grâce à un module de mesure des hautes vélocités.

Fréquence d'acquisition : 100 Hz

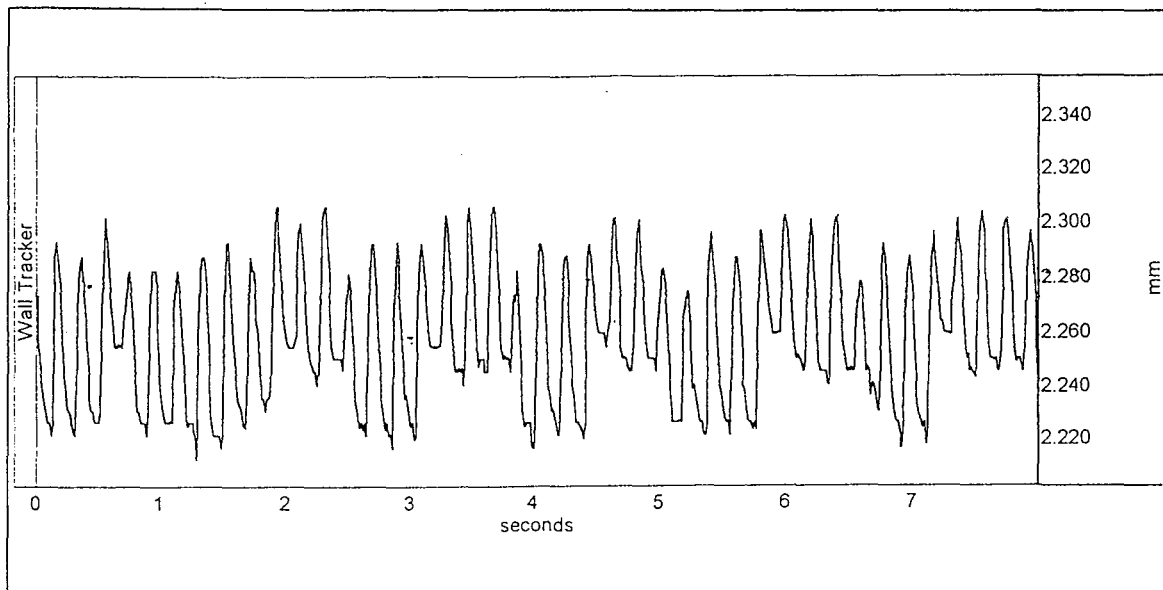


Figure 42. Enregistrement des variations de diamètre de l'artère mésentérique supérieure chez le lapin anesthésié, mettant en évidence l'influence du cycle respiratoire sur la qualité du signal (fréquence d'acquisition : 100 Hz).

1.2 - L'artère fémorale

De la même manière que pour la pose du cathéter artériel, une incision a été pratiquée dans la région de l'aîne du côté gauche puis l'artère fémorale a été dégagée. Une sonde Doppler à gaine rigide de diamètre interne 1,0 mm (HDP-20-1.0, Crystal Biotech, USA) maintenue en place par des fils et connectée au module de mesure de hautes vitesses (HVPD-20, Crystal Biotech, USA) a été positionnée. La qualité des signaux recueillis a permis d'étudier l'évolution de la vitesse sanguine artérielle fémorale au cours du temps (figure 43).

Les essais de mesure de diamètre vasculaire pratiqués sur l'artère fémorale se sont avérés infructueux du fait du calibre trop faible de ce vaisseau.

1.3 - L'artère rénale

Pour des raisons d'accessibilité, les viscères étant exposés sur le côté gauche de l'animal, nous avons abordé l'artère rénale droite. L'artère a été isolée de la veine rénale puis dégagée afin d'y poser une sonde identique à celle employée sur l'artère fémorale. Le signal de vitesse artérielle rénale obtenu a permis d'envisager une analyse de ce paramètre pour la suite de notre étude (figure 43).

Les essais de mesure de diamètre vasculaire pratiqués sur l'artère rénale se sont également avérés infructueux du fait du calibre trop faible de ce vaisseau.

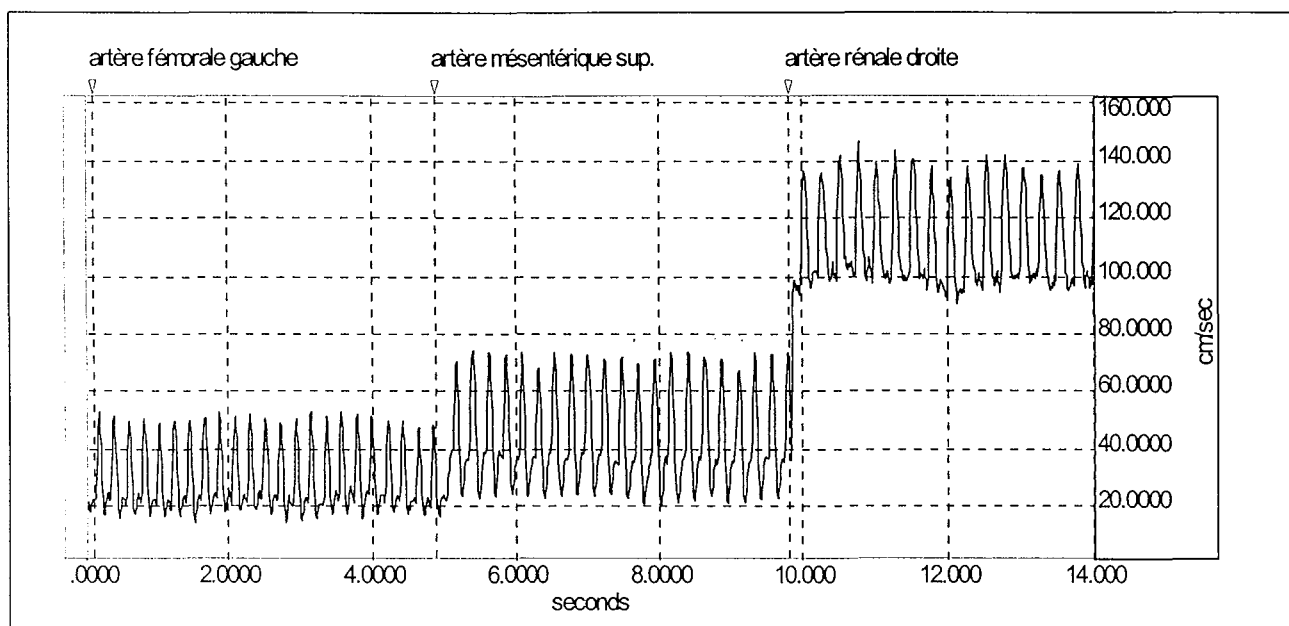


Figure 43. Exemples de profils caractéristiques de vitesse sanguine recueillis sur les artères fémorale gauche, mésentérique supérieure et rénale droite de lapins anesthésiés (fréquence d'acquisition : 100 Hz).

En conclusion, trois artères de type périphérique ont été retenues dans notre modèle expérimental pour étudier les effets de solutions d'hémoglobine. Toutefois, du fait de la trop faible reproductibilité du signal de diamètre vasculaire, seules des mesures de vitesse sanguine seront réalisées sur ces vaisseaux.

2 - Principe de l'hémodilution isovolémique par échange transfusionnel partiel

Le choix du protocole d'hémodilution a été conduit en tenant compte des chiffres de bonne tolérance à l'hémodilution le plus souvent admis, ceux de la règle des 10/30, soit 10 g d'hémoglobine pour 100 mL et 30% d'hématocrite (Janvier G. *et al.*, 1995). En d'autres termes, nous avons fixé le volume sanguin à échanger à 20% du volume sanguin total, lui-même estimé à 6,5% du poids corporel (Mitruka BM. *et al.*, 1977). Le volume sanguin à échanger a donc été calculé d'après la formule suivante :

$$\text{volume (en mL)} = \text{poids corporel (en g)} \times 6,5/100 \times 20/100$$

Ce volume a été substitué par un volume identique de la solution étudiée, en trois étapes successives de manière à ne pas induire de modifications drastiques de la volémie,

susceptibles de provoquer des changements hémodynamiques importants. Nous avons considéré qu'en dessous d'un seuil défini à environ 8% de la volémie, les perturbations hémodynamiques engendrées demeurent modestes (Ovadia Z. *et al.*, 1995). Les prélèvements sanguins ont été effectués via le cathéter artériel fémoral au moyen d'une seringue stérile entraînée par un pousse-seringue modifié (SE 400, Vial médical, France) à un débit de 100 mL/hr. Les injections ont été réalisées via le cathéter disposé dans la veine marginale externe de l'oreille au moyen d'un second pousse-seringue (SE 200B, Vial médical, France) et à un débit identique. La fin de l'échange transfusionnel partiel a été atteinte lorsque la troisième injection a été achevée ; le suivi des différents paramètres biochimiques et hémodynamiques (figure 44) a alors débuté, comme décrit au paragraphe suivant.

3 - Acquisition en temps réel et analyse *a posteriori* des paramètres biochimiques et hémodynamiques

3.1 - Paramètres biochimiques

Les prélèvements sanguins artériels ont été réalisés via le cathéter fémoral, aux temps définis dans la figure 45 (les mesures de pression artérielle ont été interrompues durant ces manipulations). Chaque échantillon sanguin (750 μ L) recueilli au moyen de seringues stériles a été utilisé pour déterminer les paramètres décrits dans la figure 44. Le volume sanguin prélevé a été remplacé par un volume identique de sérum physiologique (NaCl 0,9%).

3.1.1 - Mesure des gaz du sang artériel

Une fraction du prélèvement (environ 200 μ L) a été injectée immédiatement dans un microanalyseur de pH et gaz du sang automatisé (ABL 330, Radiometer, Danemark). Pour empêcher tout échange de gaz avec l'atmosphère lors du transfert du prélèvement vers le microanalyseur, la sang a été maintenu dans une seringue hermétiquement fermée. L'appareil utilise trois électrodes pour la mesure quantitative du pH, et des pressions partielles en oxygène (PO_2) et en dioxyde de carbone (PCO_2) en mm Hg.

3.1.2 - Mesure des concentrations des différentes formes d'hémoglobine sanguine et plasmatique

Une fraction du prélèvement (65 μ L) a été utilisée pour déterminer au moyen d'un Co-Oxymètre 682™ (Instrumentation Laboratory, USA) les valeurs suivantes :

- hémoglobine totale ou tHb (en g/L),
- oxyhémoglobine ou HbO₂ (en % de tHb),
- méthémoglobine ou metHb (en % de tHb),
- désoxyhémoglobine ou rHb (en % de tHb).

La détermination de ces paramètres s'effectue, après hémolyse de l'échantillon sanguin, par calcul matriciel des absorbances des différentes formes d'hémoglobine. Une lumière monochromatique à six longueurs d'onde spécifiques traverse l'échantillon pour atteindre un photodétecteur dont le signal est utilisé pour calculer les concentrations partielles des différentes formes d'hémoglobine présentes dans l'échantillon. L'appareil calcule également la saturation en oxygène (% sO₂m), la capacité en oxygène (CapO₂) et la teneur en oxygène (CtO₂).

L'autre partie de l'échantillon a été centrifugée à 4°C, à 2500 g pendant 10 minutes (centrifugeuse Jouan CR 4 22, France), puis la fraction plasmatique a été utilisée pour réaliser la détermination des paramètres précédemment décrits.

3.1.3 - Mesure de l'hématocrite artériel

Une partie de l'échantillon sanguin a été répartie dans deux capillaires pour hématocrite (75 mm/75 µL, diamètre interne : 1,5-1,6 mm). L'hématocrite artériel a été lu après centrifugation pendant dix minutes (Cellokrit 2, AB Lars Ljungberg & Co, Suède).

3.2 - Paramètres hémodynamiques

Comme nous l'avons décrit précédemment, les paramètres hémodynamiques enregistrés en temps réel ont été :

- la pression artérielle,
- la vitesse sanguine aortique,
- la vitesse sanguine périphérique,
- le diamètre aortique absolu (moyen) et relatif (pulsatile) (figure 37).

Afin d'analyser en temps différé les signaux enregistrés et d'en extraire différents paramètres, nous avons développé un outil informatique de traitement des données. Le logiciel élaboré avec M. Dubuit (Centre Interuniversitaire de Ressources Informatiques de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy) a permis de calculer sur une même fenêtre de longueur modulable :

- la pression artérielle moyenne (PAM) ;

- la pression pulsée (ΔP) égale à la différence entre les pressions systolique et diastolique ;
- la vélocité sanguine aortique moyenne (V) ;
- la section aortique (S) ;
- le débit aortique moyen selon la formule : $Q = V \times S$

N.B. : cette formule implique l'assimilation de la vélocité sanguine au point de mesure du diamètre à la valeur de V mesurée par la sonde Doppler ;

- la résistance périphérique en aval de l'aorte (RP) selon la formule : $RP = PAM/Q$;

N.B. : ce mode de calcul ne permet pas de déterminer la résistance périphérique totale (rapport de la PAM et du débit cardiaque) mais seulement une estimation de ce paramètre ;

- la fréquence cardiaque (FC) obtenue à partir du signal de vélocité sanguine comme étant l'inverse de l'intervalle de temps séparant 2 pics systoliques.

Les opérations ont été effectuées après sélection d'une fenêtre d'intérêt par l'expérimentateur dans le logiciel AcqKnowledge® puis importation des données (préalablement converties sous format .TXT) dans le logiciel de calculs.

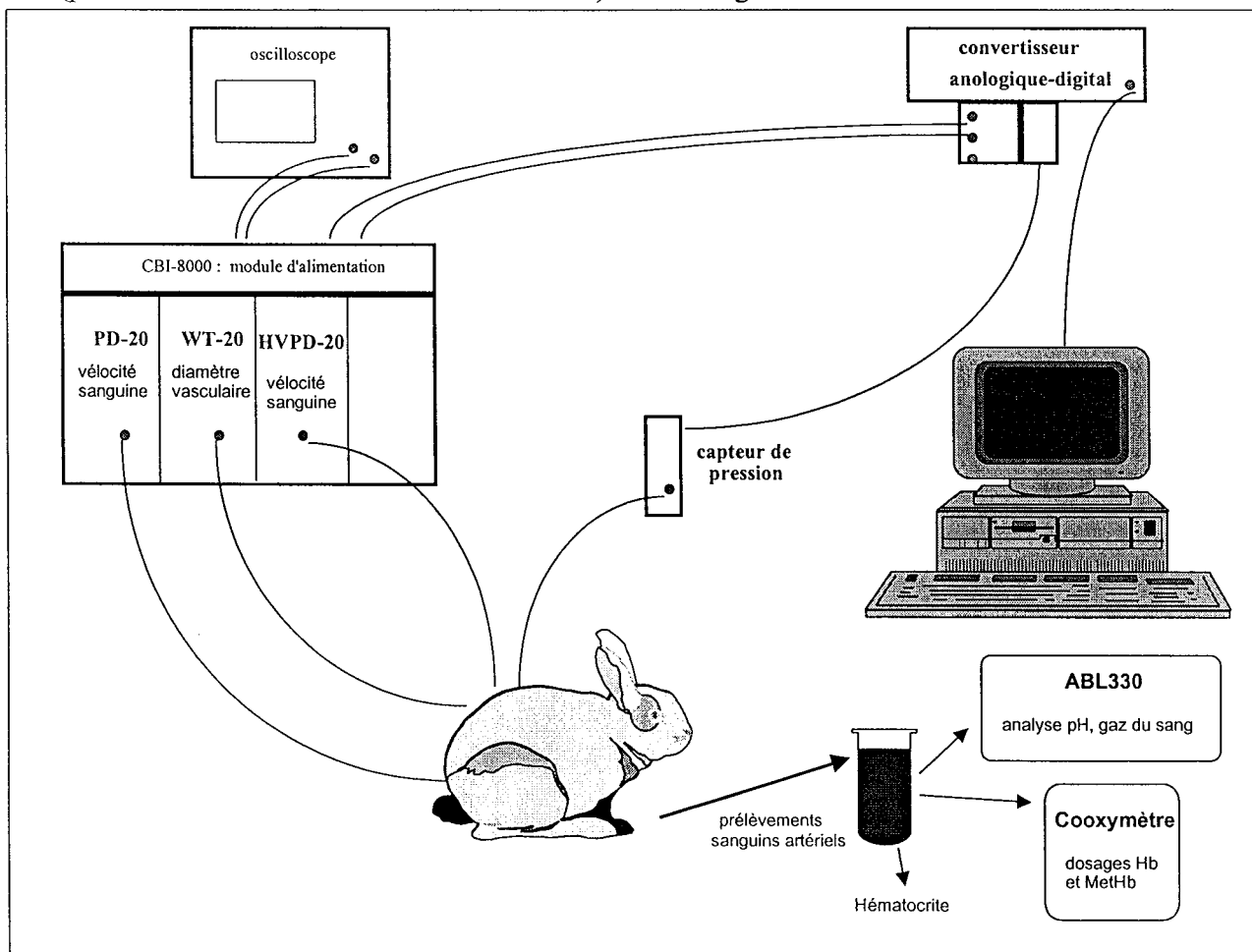


Figure 44. Le dispositif expérimental et les différents paramètres mesurés.

3.3 - Découpage du protocole expérimental

L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées à différentes périodes selon le protocole décrit par la figure 45. Après une période de stabilisation post-opératoire de 60 minutes servant à recueillir les valeurs de base biochimiques et hémodynamiques, on a procédé à l'échange transfusionnel partiel (environ 50 minutes), puis les paramètres hémodynamiques ont été enregistrés en continu et les échantillons sanguins ont été prélevés séquentiellement durant 180 minutes.

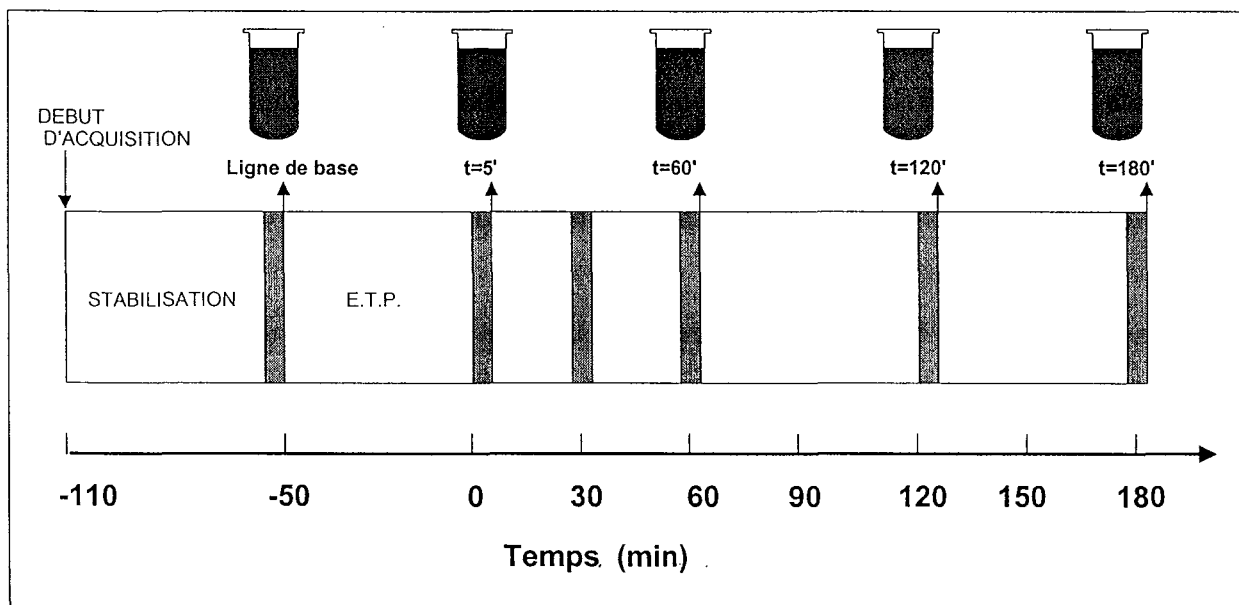


Figure 45. Diagramme représentant les différentes phases d'analyse des paramètres biochimiques et hémodynamiques. Les fenêtres d'analyse des paramètres hémodynamiques sont représentées en gris.



: prélèvement sanguin de 750 μ L ; E.T.P. : échange transfusionnel partiel

4 - Application du modèle à l'étude des effets induits par une solution d'hémoglobine

Avant de procéder à la comparaison des effets cardiovasculaires induits par plusieurs solutions d'hémoglobine en situation d'hémodilution, nous avons appliqué le modèle proposé ci-dessus à l'étude de l'influence d'une solution d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC) et d'une solution témoin d'albumine sérique humaine. Les caractéristiques physico-chimiques des deux solutions seront présentées au chapitre suivant (Tableau IV, page 114). Les animaux ont été répartis de manière aléatoire dans deux groupes expérimentaux (n=6 pour Hb-Dex-BTC et n=4 pour le groupe albumine) et le vaisseau périphérique étudié a été l'artère mésentérique

supérieure. Pour les deux groupes, les valeurs des paramètres hématologiques (hématocrite artériel, hémoglobine et méthémoglobine totales circulantes) et hémodynamiques aux temps post-hémodilution (t=5, 30, 60, 120 et 180 min) ont été comparées aux valeurs pré-hémodilution (t=-50 min) par ANOVA avec mesures répétées (logiciel Statview[®], Abacus Concepts, USA). Pour chaque temps post-hémodilution, la comparaison des valeurs entre les deux groupes a été réalisée par ANOVA avec mesures répétées suivie de la correction de Bonferroni. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

4.1 - Evolution des paramètres biochimiques

Dans ce modèle, l'échange transfusionnel partiel a conduit à une hémodilution avec réduction conjointe de l'hématocrite (figure 46 A) et de l'hémoglobine totale circulante (figure 46 B) d'environ 30%. Les paramètres hématologiques mesurés se sont révélés similaires entre les deux groupes (pas de différence significative) et stables au cours des 3 heures de suivi.

L'injection de la solution d'Hb-Dex-BTC contenant environ 5% de méthémoglobine (figure 46 E) a provoqué une augmentation immédiate du taux de méthémoglobine totale circulante comme le montre la figure 46 C. On a observé ensuite une diminution de la méthémoglobine totale circulante qui est maximale durant la première heure suivant l'échange transfusionnel (-36%) et qui semble être principalement le fait de la réduction de la méthémoglobine par les systèmes enzymatiques. On a observé parallèlement une chute de 45% de la méthémoglobine plasmatique durant la première heure (figure 46 E). Au delà de 60 minutes, la diminution du taux de méthémoglobine totale circulante semble être due à la fois à l'élimination de l'hémoglobine circulante, dont on peut estimer la demi-vie plasmatique à 6 heures dans ce modèle (figure 46 D), et à la réduction enzymatique de la méthémoglobine.

Tableau III. Evolution du pH et des gaz du sang artériel au cours des 3 heures suivant l'échange transfusionnel partiel avec une solution d'albumine (n=4) ou d'Hb-Dex-BTC (n=6).

	pH sang artériel		PCO ₂ sang artériel (mm Hg)		PO ₂ sang artériel (mm Hg)	
	ALBUMINE	Hb-Dex-BTC	ALBUMINE	Hb-Dex-BTC	ALBUMINE	Hb-Dex-BTC
-50 min	7,34 ± 0,03	7,35 ± 0,03	44,12 ± 5,26	41,21 ± 5,61	89,98 ± 7,15	95,96 ± 9,24
5 min	7,35 ± 0,04	7,36 ± 0,02	43,18 ± 5,15	37,16 ± 5,35	93,52 ± 8,01	108,94 ± 12,88
60 min	7,35 ± 0,04	7,36 ± 0,04	42,67 ± 5,10	35,14 ± 3,44	90,03 ± 6,32	105,11 ± 9,35
120 min	7,32 ± 0,05	7,32 ± 0,04	43,13 ± 6,14	36,77 ± 2,46	93,20 ± 5,97	100,97 ± 7,14
180 min	7,32 ± 0,05	7,29 ± 0,04	41,38 ± 5,98	36,41 ± 2,09	97,30 ± 8,93	106,33 ± 8,67

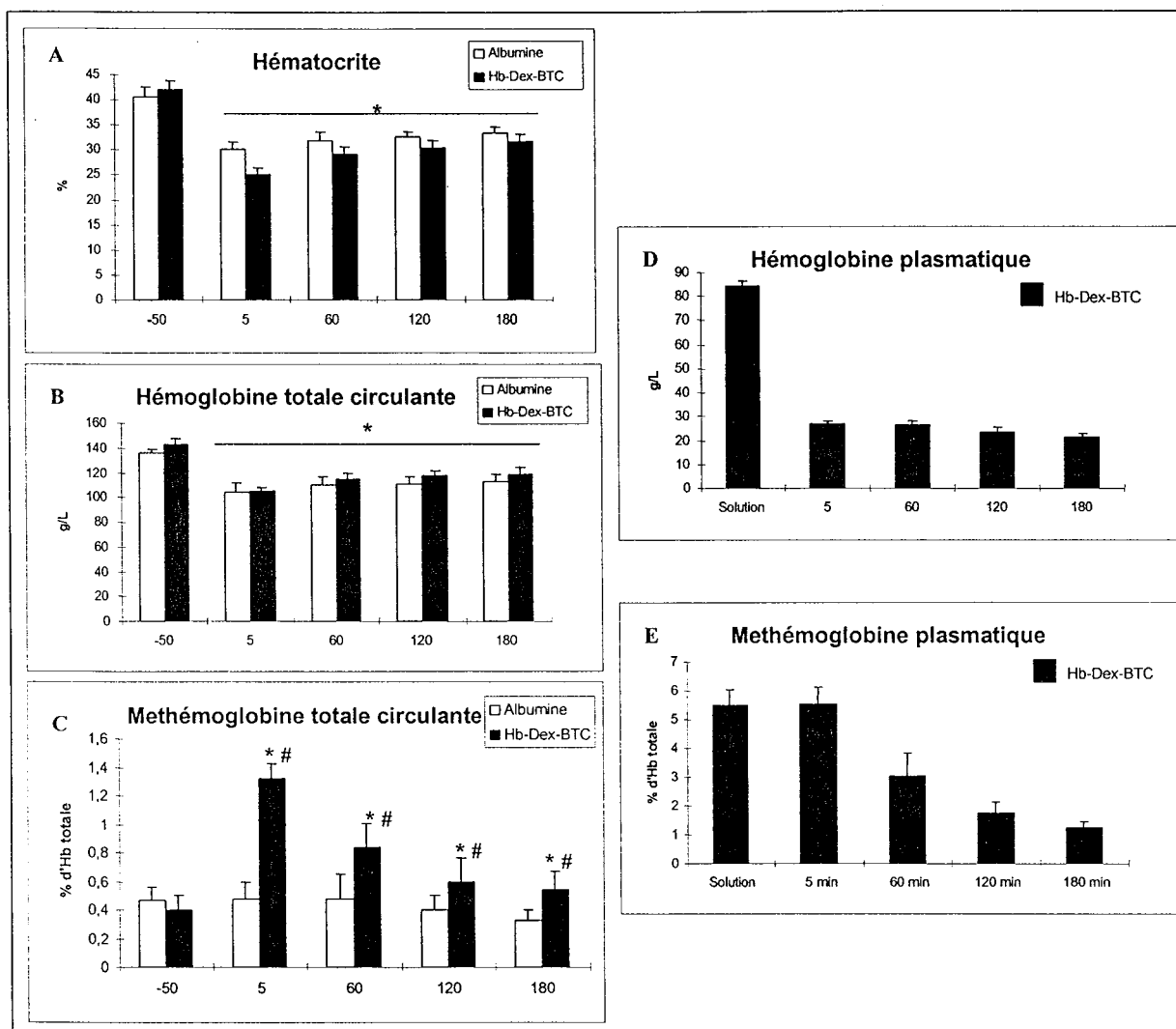


Figure 46. Evolution des paramètres biochimiques sanguins (A, B et C) et plasmatiques (D et E) au cours des 3 heures suivant l'échange transfusionnel partiel avec une solution d'albumine (n=4) ou Hb-Dex-BTC (n=6). Les temps sont exprimés en minutes.

* : $P < 0,05$ pré-hémodilution vs. post-hémodilution

: $P < 0,05$ Hb-Dex-BTC vs. albumine

Les mesures du pH et des gaz du sang artériel n'ont montré aucune différence significative entre les deux groupes expérimentaux après hémodilution (tableau III).

4.2 - Evolution des paramètres hémodynamiques

L'hémodilution avec la solution d'albumine n'a pas provoqué de modification des paramètres hémodynamiques durant les 3 heures de suivi, hormis une diminution de débit sanguin aortique à partir de 120 minutes (figure 47). Toutefois, cette tendance a été observée également chez les animaux traités avec Hb-Dex-BTC et le débit aortique n'est pas apparu

différent entre les deux groupes d'étude. Il semble donc que cette diminution de débit soit imputable au modèle expérimental lui-même plutôt qu'à l'effet propre des solutions. Lors de la mise au point du protocole, nous avons en effet observé chez des animaux témoins, une diminution semblable de la vélocité sanguine aortique (assimilable au débit puisque les variations de diamètre sont nulles) au cours du temps (figure 39). L'administration d'Hb-Dex-BTC a induit une augmentation transitoire de la pression moyenne corrigée par une diminution de la fréquence cardiaque (figure 47 A et B). Les débits sanguins aortique et mésentérique ont diminué après 60 minutes (figure 47 C et E). La résistance périphérique correspondant à la résistance en aval de l'aorte abdominale et la résistance mésentérique (rapport pression/débit mésentérique) ont augmenté progressivement au cours du temps (figure 47 D et F).

L'analyse statistique a permis, malgré la taille limitée des groupes, de tirer une tendance générale de cette étude : en comparaison avec la solution de référence d'albumine humaine à 5%, Hb-Dex-BTC provoque une augmentation de pression artérielle moyenne accompagnée d'une diminution transitoire de fréquence cardiaque. Cette élévation de la pression pourrait être la conséquence de l'accroissement de résistance périphérique observée en aval de l'aorte abdominale (figure 47D).

En conclusion, le modèle d'hémodilution décrit a révélé une bonne stabilité des paramètres hématologiques, du pH et des gaz du sang durant les 180 minutes suivant l'échange transfusionnel. Ainsi, on peut supposer que les mécanismes pH-dépendants susceptibles de modifier les paramètres cardiovasculaires tels que la pression artérielle (Alkjær C. *et al.*, 1996) interviennent peu dans ce modèle et que les changements hémodynamiques observés avec Hb-Dex-BTC sont effectivement dus aux propriétés de la solution elle-même. Toutefois, notre propos n'étant pas de reprendre ici les mécanismes à l'origine de ces modifications, ceux-ci seront envisagés dans la partie "*Discussion*" du travail. Au vu des résultats, le modèle d'hémodilution proposé apparaît donc adapté à la comparaison des effets d'autres solutions d'hémoglobine sur les paramètres cardiovasculaires, étude qui fera l'objet du chapitre suivant.

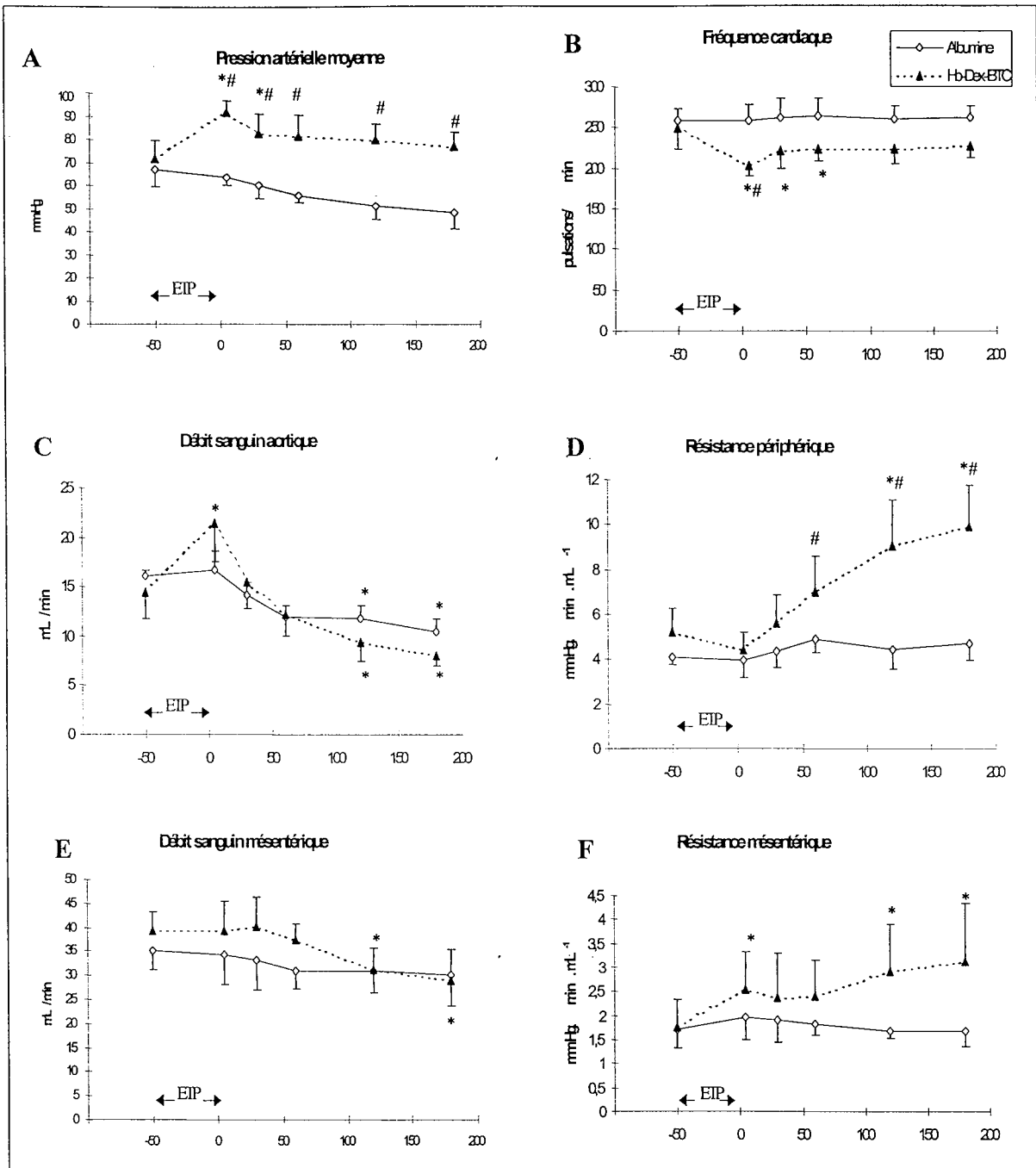


Figure 47. Evolution des paramètres hémodynamiques au cours des 3 heures suivant l'échange transfusionnel partiel (ETP) avec une solution d'albumine (n=4) ou Hb-Dex-BTC (n=6). Les temps sont exprimés en minutes.

* : $P < 0,05$ pré-hémodilution vs. post-hémodilution

: $P < 0,05$ Hb-Dex-BTC vs. albumine

ETUDE COMPARATIVE DES EFFETS CARDIOVASCULAIRES INDUITS PAR TROIS SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE HUMAINE MODIFIEE CHIMIQUEMENT

Sur la base du modèle expérimental d'hémodilution présenté précédemment, nous avons comparé l'influence de trois solutions d'hémoglobine modifiée chimiquement sur divers paramètres hémodynamiques et biochimiques. Bien que d'origine humaine, chacune des solutions présente des caractéristiques physico-chimiques propres qui dépendent du type de modification chimique apportée à l'hémoglobine et qu'il convient de considérer avant de discuter les résultats.

1 - Caractéristiques physico-chimiques des solutions d'hémoglobine perfusées

Afin de respecter l'intégrité des solutions d'hémoglobine mises à notre disposition pour ce travail, nous n'avons procédé à aucune modification de leurs caractéristiques physico-chimiques.

1.1 - L'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracarboxylate ou Hb-Dex-BTC

L'hémoglobine-dextrane 10-benzène tétracarboxylate (Hb-Dex-BTC) a été mise au point conjointement par les laboratoires d'Hématologie-Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, Pasteur-Mérieux sérums & vaccins (Marcy-L'Etoile, France) et de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC, Nancy, France) (Menu P. *et al.*, 1994 ; Prouchayret F. *et al.*, 1993). La préparation de la solution s'effectue en trois étapes principales résumées par la figure 48 :

- préparation de l'hémoglobine à partir des hématies issues de poches de sang humain arrivé à péremption, fournies par le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Nancy-Brabois.
- préparation du polymère de dextrane-benzène-tétracarboxylate (figure 10, partie bibliographique). Le dextrane-benzène-tétracarboxylate joue le rôle d'effecteur allostérique en se substituant à la fonction du 2,3-DPG. De plus, la masse moléculaire élevée de ce polymère permet d'accroître la demi-vie plasmatique de l'hémoglobine en réduisant notamment le phénomène d'extravasation.
- préparation du conjugué Hb-Dex-BTC (figure 10, partie bibliographique). Le conjugué d'Hb-Dex-BTC est isotonsé dans une solution de Tyrode (glucose : 6,7 mM ; Na⁺ : 141,0

mM ; K⁺ : 5,0 mM ; Ca⁺⁺ : 2,5 mM ; Mg⁺⁺ : 1,1 mM ; Cl⁻ : 115,8 mM ; phosphate : 0,8 mM ; hydrogénocarbonate : 30,0 mM) et présente une courbe de dissociation assez proche de celle de l'hémoglobine érythrocytaire.

Les principales caractéristiques du produit sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV. Principales caractéristiques physico-chimiques des solutions d'hémoglobine. Exemple de 3 lots.

	Hb-Dex-BTC (lot 94PS235)	αα-Hb (lot 950404-00-X)	HemoLink™ (lot 95HM0404)
Concentration en hémoglobine (g/dL)	8,5 * 8,37 ± 0,09 **	8,2 * 8,24 ± 0,90 **	10,0 * 10,11 ± 0,22 **
Hémoglobine libre * (%)	4,87	< 5	4,2
Oxyhémoglobine (%)	ND 92,69 ± 0,85**	ND 90,31 ± 0,66**	78 * 74,93 ± 1,43**
Méthémoglobine (%)	< 5* 4,88 ± 0,46**	< 5* 7,62 ± 0,52**	< 10* 10,97 ± 0,67**
Désoxyhémoglobine (%)	ND 1,31 ± 0,19**	ND 2,43 ± 0,41**	8,7 * 7,62 ± 0,52**
Masse moléculaire *			
32 kDa	-	< 5%	< 5%
64 kDa	< 5%	> 95%	32 ± 6%
> 64 kDa	> 90%	-	64 ± 7%
> 500 kDa	< 5%	-	< 1%
P₅₀ * (mm Hg)	23	29,5	34
Viscosité □ (cSt)	2,11	0,97	1,24
Pression oncotique* (mmHg)	40	34,5	26
Osmolarité * (mOsm/L)	280	280	280-300
Endotoxines * (UE/mL)	< 0,5	0,25	<0,06
pH *	7,24	7,52	7,30

* : valeurs données par le fournisseur ; ND : valeur non déterminée

** : valeurs moyennes ± 1 e.s.m. mesurées au Co-oxygène 682 (Instrumentation Laboratory) avant injection; Hb-Dex-BTC : n=18 ; αα-Hb : n=10 ; HemoLink™ : n=11

□ : viscosité cinématique mesurée à 37°C par viscosimètre automatique (Viscomatic VCD, Amtec, France), n=5 pour chaque solution (voir partie "Approches expérimentales des mécanismes responsables de la vasoactivité induite par les solutions d'hémoglobine")

1.2 - L'hémoglobine αα-pontée ou αα-Hb

La préparation de cette solution d'hémoglobine est réalisée par pontage entre les deux sous-unités α au moyen d'un agent bifonctionnel permettant de maintenir la structure tétramérique et de réduire l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. L'agent utilisé est le

3,5-dibromosalicyl bisfumarate (DBBF ou diaspirine) qui permet un pontage entre les résidus $\alpha^{99}\text{Lys}$ des deux sous-unités α d'hémoglobine humaine sous forme désoxygénée extraite de poches de sang périmé (figure 49) (Winslow RM. *et al.*, 1994). Le produit final est oxygéné et isotonisé dans une solution de Ringer-lactate (Na^+ : 123,9-137,0 mM ; K^+ : 3,6-4,4 mM ; Ca^{++} : 1,2-1,5 mM ; Cl^- : 103,9-115,2 mM; lactate : 25,7-29,0 mM). Ce produit initialement élaboré par l'US Army (Washington, D.C., USA) est encore appelé DCLHbTM (diaspirin cross-linked hemoglobin) ; il est actuellement développé sous le nom d'HemeAssistTM par Baxter Healthcare Corporation (Round Lake, IL., USA).

La solution d' $\alpha\alpha$ -Hb dont les caractéristiques chimiques sont présentées dans le tableau IV nous a été gracieusement fournie par le Docteur AI. Alayash (Center for Biologics Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, Bethesda, MD., USA).

1.3 - L'hémoglobine pontée polymérisée ou HemoLinkTM

La solution HemoLinkTM est élaborée par stabilisation d'hémoglobine humaine A₀ purifiée, provenant de globules rouges issus de poches de sang périmé, au moyen d'un trisaccharide naturel, le β -D-fructofuranosyl-*O*- α -D-galactopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranoside ou raffinose (Adamson JG. *et al.*, 1998 ; figure 12). Cet agent possède de multiples groupements réactifs, permettant de réaliser le pontage et la polymérisation de l'hémoglobine. La molécule d'hémoglobine sous forme désoxygénée est tout d'abord pontée intra-moléculairement par le raffinose, puis différentes molécules d'hémoglobine pontée sont reliées par le raffinose pour former des oligomères de tailles limitées. Le produit final, *o*-raffinose poly-hémoglobine, est oxygéné et isotonisé dans une solution de Ringer-lactate. Les étapes de la synthèse d'HemolinkTM sont résumées dans la figure 50. Les caractéristiques physico-chimiques de la solution sont regroupées dans le tableau IV. Les lots d'HemoLinkTM utilisés pour cette étude nous ont été généreusement fournis par la société Hemosol Inc. (Etobicoke, Canada).

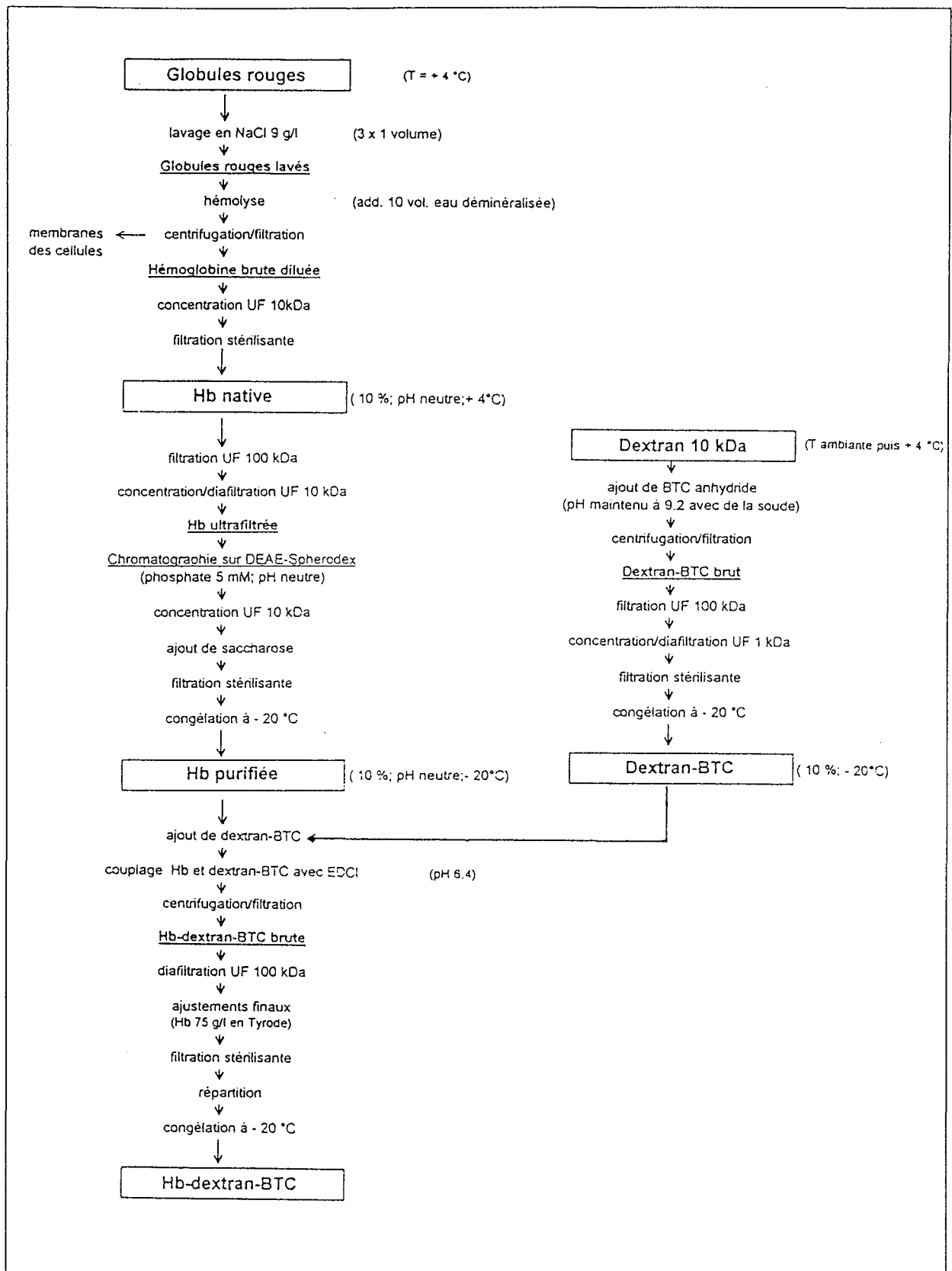


Figure 48. Etapes de la préparation du conjugué d'hémoglobine humaine purifiée Hb-Dex-BTC. D'après Prouchayret F. *et al.*, 1993.

UF : ultrafiltration ; EDCI : 3-éthyl-1-(3 diméthylaminopropyl)-carbodiimide ; BTC : benzène-tétracarboxylate

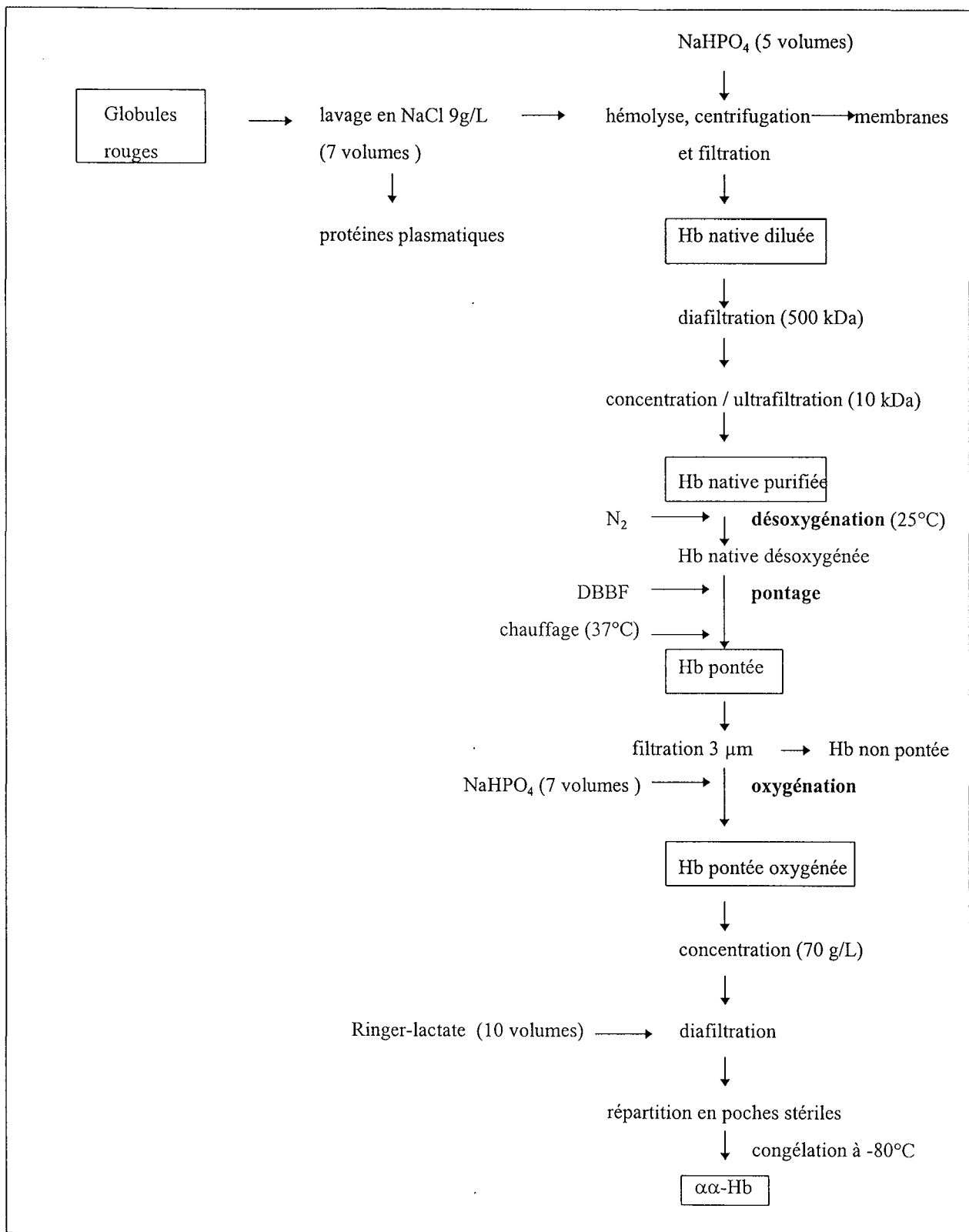


Figure 49. Schéma de la préparation d'hémoglobine $\alpha\alpha$ -pontée ($\alpha\alpha$ -Hb) entre les résidus α^{99} Lys à partir de globules rouges. D'après Winslow RM. *et al.*, 1994.

DBBF : 3,5-dibromosalicyl bisfumarate ; *Hb* : hémoglobine

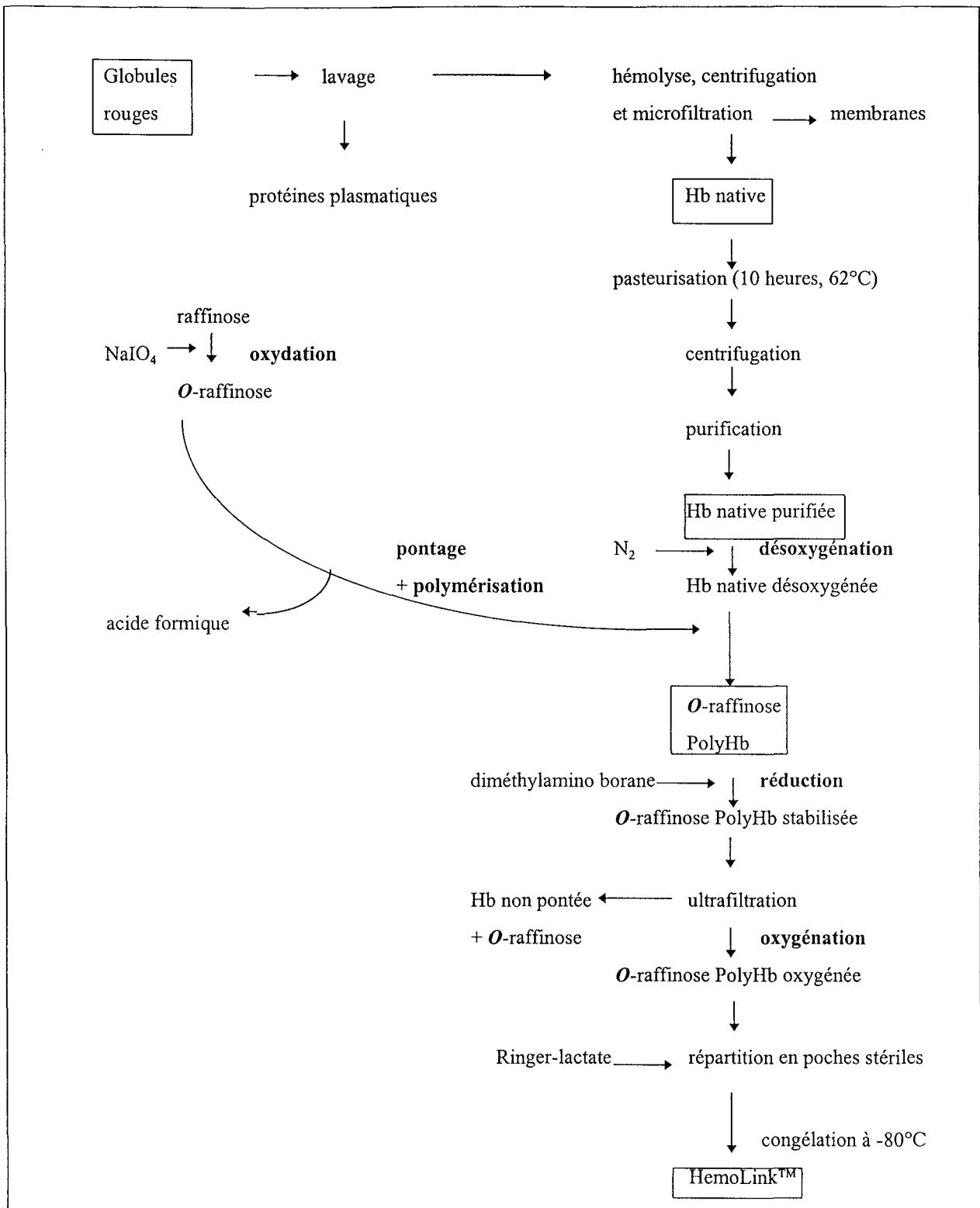


Figure 50. Schéma de la préparation d'HemoLink™ à partir de globules rouges. D'après Adamson JG. *et al.*, 1998.
PolyHb : polyhémoglobine

2 - Analyse chromatographique des solutions d'hémoglobine perfusées

Afin de comparer la distribution massique des espèces chimiques constituant les trois solutions perfusées dans des conditions identiques, une analyse qualitative a été effectuée par chromatographie d'exclusion stérique haute pression à l'aide d'une colonne TSK G3000 SW (Touzart & Matignon, Vitry-sur-Seine, France) par détection UV à 580 nm (longueur d'onde d'absorption maximale de l'hémoglobine sous forme oxygénée, figure 51). Le tampon phosphate 0,05 M, pH 7,2 a été utilisé comme éluant à un débit de 0,7 mL/min. Le volume de la boucle d'injection est de 100 μ L et les solutions injectées ont été diluées 40 fois. Le système de détection utilisé a consisté en une pompe Varian LC 5020 et un détecteur UV100 à longueur d'onde variable (Spectra Physics Analytical). Les caractéristiques de la colonne (volume mort et volume total) et les chromatogrammes des solutions Hb-Dex-BTC, $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™ et d'une solution d'hémoglobine humaine native dissoute en Tyrode (lot FS 43, Pasteur-Mérieux sérums & vaccins, Marcy-L'Etoile, France) sont reportés dans la figure 52.

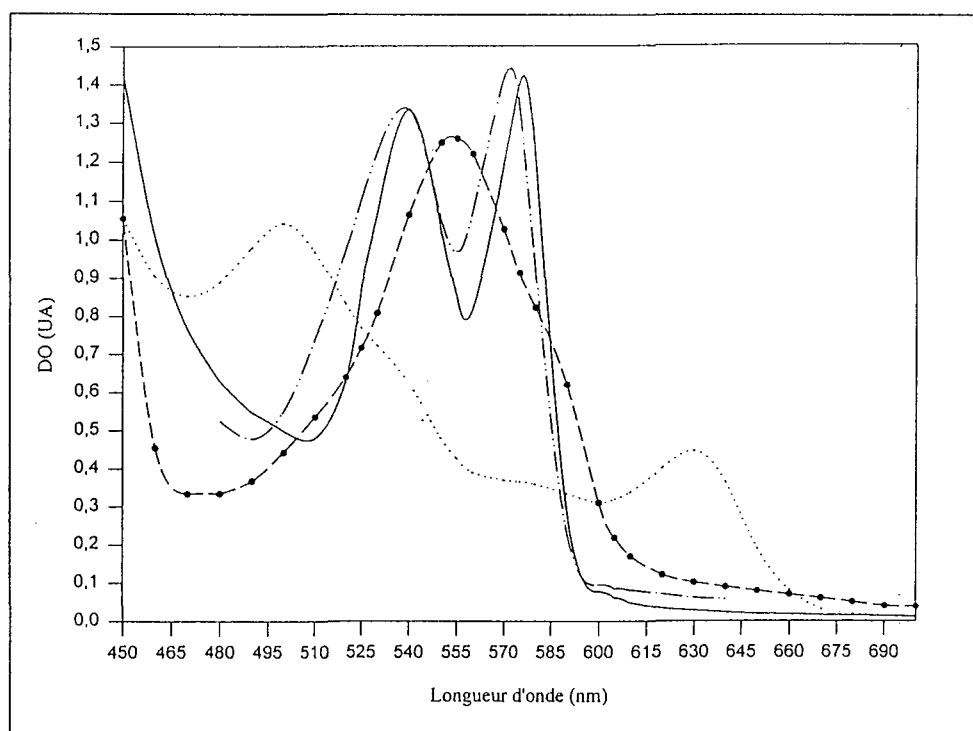


Figure 51. Spectres d'absorption des principales formes de l'hémoglobine humaine contenue dans les globules rouges.

- oxyhémoglobine ($\lambda_1 = 540 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 580 \text{ nm}$)
- - - désoxyhémoglobine ($\lambda = 560 \text{ nm}$)
- méthémoglobine ($\lambda = 630 \text{ nm}$)
- . - . carbomonoxyhémoglobine ($\lambda = 530 \text{ nm}$)

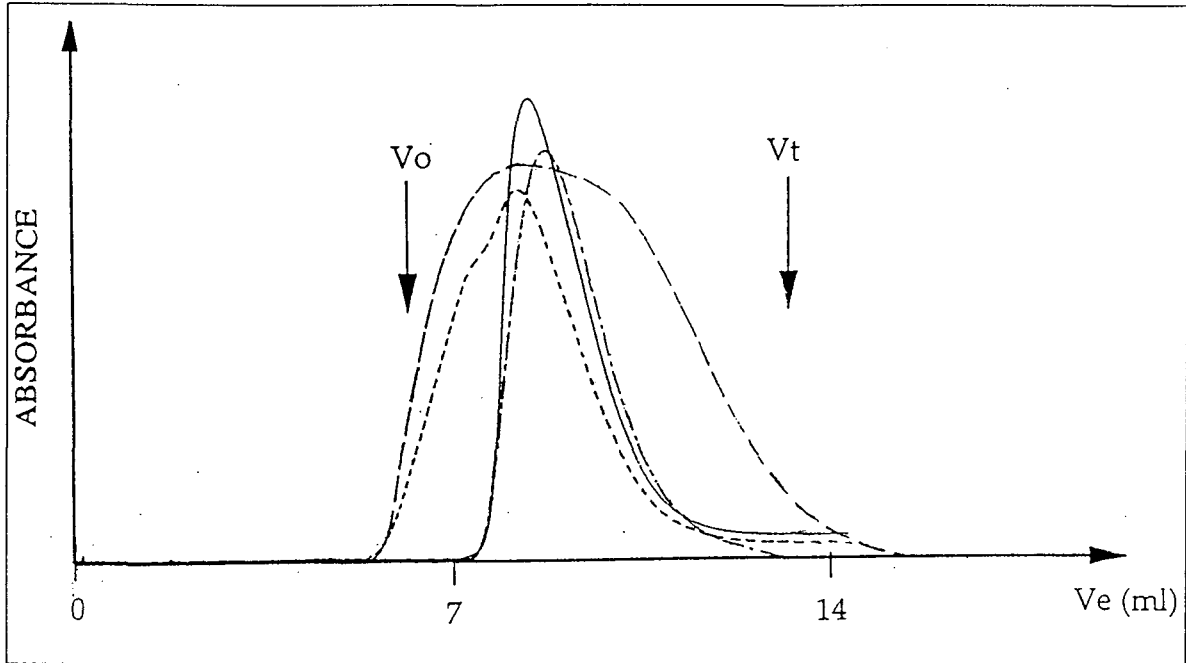


Figure 52. Chromatogrammes des trois solutions d'hémoglobine perfusées et de l'hémoglobine native (TSK G3000 SW - tampon phosphate 0,05 M - pH 7,2 - 25°C - détection UV à 580 nm).

————— : $\alpha\alpha$ -Hb ; - - - - - : Hb-Dex-BTC ;
 : HemolinkTM ; - · - · - · : Hb native
V₀ : volume mort ; *V_t* : volume total

La solution d' $\alpha\alpha$ -Hb a un volume d'élu­tion proche de celui de l'hémoglobine native, ce qui est en accord avec les données du tableau IV. Les profils d'élu­tion des solutions HemolinkTM et Hb-Dex-BTC sont déplacés vers les masses moléculaires les plus élevées. Il est à noter que le profil d'élu­tion de Hb-Dex-BTC est plus étalé que celui de HemolinkTM car il est aussi déplacé vers les masses moléculaires les plus faibles. Il peut être attribué à la présence de molécules d'hémoglobine sous forme de dimères et/ou de monomères.

3 - Caractéristiques physico-chimiques des solutions de référence

Le choix d'un substitut plasmatique pouvant servir de solution de référence dans notre étude a été régi par les impératifs suivants :

- caractéristiques physico-chimiques les plus proches possibles de celles des solutions d'hémoglobine testées ;
- demi-vie vasculaire suffisante pour les 3 heures de suivi post-hémodilution ;
- effet limité sur l'hémodynamique.

Parmi les solutés de remplissage vasculaire possibles (gélatines fluides modifiées, dextrans, cristaalloïdes de synthèse), nous avons retenu l'albumine sérique humaine (déjà utilisée dans nos études préliminaires) et un hydroxyéthylamidon de faible masse moléculaire.

3.1 - La solution d'albumine sérique humaine

Dans le domaine du remplissage vasculaire, l'albumine humaine purifiée et chauffée est le soluté le plus physiologique (effet immédiat sur la pression oncotique, innocuité presque totale) et le mieux toléré. Mais du fait des risques de transmission virale, de sa disponibilité, de son coût élevé et de sa durée limitée d'expansion volémique, son utilisation en pratique hospitalière n'est plus de mise. Pour notre étude, l'albumine présente toutefois l'intérêt de présenter une masse moléculaire proche de celle de l'hémoglobine native (et de l' α -Hb) et des caractéristiques physico-chimiques adaptées (tableau V). La solution d'albumine humaine purifiée (200 g/L) que nous avons utilisée a été fournie par Pasteur-Mérieux, sérums & vaccins (Marcy-L'Etoile, France) et diluée extemporanément dans une solution de Tyrode pour obtenir une solution isotonique à 50 g/L.

3.2 - La solution d'hydroxyéthylamidon Elohes® 6%

Les hydroxyéthylamidons (HEA) sont des polysaccharides naturels modifiés extraits de maïs, riches en amylopectine, polymère de glucose de haute masse moléculaire (figure 53). L'hydroxyéthylation (substitution sur le glucose de groupements hydroxyyles par des radicaux hydroxyéthyl-éthers) de l'amylopectine permet de stabiliser la solution et de ralentir son hydrolyse par l'amylase sérique.

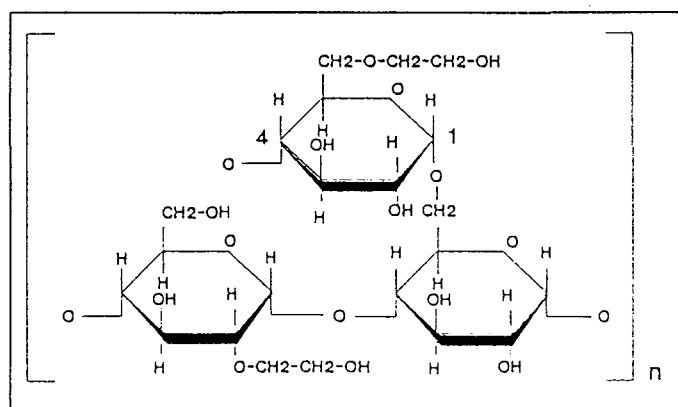


Figure 53. Formule chimique de l'hydroxyéthylamidon. L'hydroxyéthylation se fait généralement en C₂. D'après Baron J-F., 1992.

Tableau V. Principales caractéristiques physico-chimiques des solutions de référence.

	Albumine humaine (lot 91AS120)	Hydroxyéthylamidon (Elohès® 6%)
Concentration (g/L)	50	60
Masse moléculaire (kDa)	68	moyen en poids : 200 moyen en nombre : 60
Viscosité (cSt)	0,92	1,93
Pression oncotique (mm Hg)	25	25
Osmolarité (mOsm/L)	300	310
pH	7,5	4,0-7,0

Les HEA sont caractérisés par deux paramètres, la masse moléculaire et le taux d'hydroxyéthylation, quantifié par le taux de substitution molaire (rapport du nombre de radicaux hydroxyéthyles de la molécule d'HEA sur le nombre de glucoses totaux). Les caractéristiques physico-chimiques de la solution d'HEA que nous avons utilisé (Elohès® 6%, Fresenius France Pharma, France) sont présentées dans le tableau V. Cette solution présente donc une masse moléculaire moyenne en masse proche de celle des solutions d'Hb-Dex-BTC et Hemolink™, une masse moléculaire moyenne en nombre (masse moléculaire moyenne des molécules exerçant le pouvoir colloïdo-osmotique) proche de celle de la solution d'αα-Hb, et un taux de substitution molaire de 0,6.

4 - Conditions expérimentales

4.1 - Répartition des individus au sein des groupes expérimentaux

Le protocole d'hémodilution décrit au chapitre précédent a été conduit dans deux études ne différant que par la nature de l'artère périphérique choisie (artère fémorale gauche : étude n°1, ou artère rénale droite : étude n°2). Dans chacune des études, les animaux ont été répartis de manière aléatoire dans cinq groupes expérimentaux selon la solution perfusée (Tableau VI). L'acquisition des données biochimiques et hémodynamiques et le traitement *a posteriori* des valeurs recueillies ont été effectués selon le modèle proposé au chapitre précédent sur les trois heures suivant l'échange transfusionnel. Dans la mesure où le protocole expérimental ne diffère, entre les deux études, que par le choix du vaisseau sur lequel sont

effectuées les mesures de vitesse sanguine périphérique, nous avons regroupé les résultats communs.

4.2 - Traitement statistique

Pour les cinq groupes, les valeurs des paramètres biochimiques et hémodynamiques aux temps post-hémodilution (t=5, 30, 60, 120 et 180 min) ont été comparées aux valeurs pré-hémodilution par ANOVA à un facteur avec mesures répétées (logiciel Statview[®], Abacus Concepts, USA). A chaque temps post-hémodilution, la comparaison des valeurs entre les cinq groupes a été réalisée par ANOVA à un facteur avec mesures répétées suivie de la correction de Bonferroni. Pour chaque analyse, l'inégalité du nombre d'animaux a été prise en compte. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme significative.

L'ensemble des résultats communs ou propres aux deux études est présenté ci-dessous. Les résultats de l'étude n°1 sont par ailleurs décrits dans l'article joint en annexe 3.

Tableau VI : Distribution et poids des lapins au sein des groupes expérimentaux. Le poids est exprimé en moyenne \pm 1 e.s.m.

	Etude n°1		Etude n°2	
	Nombre	Poids (kg)	Nombre	Poids (kg)
Albumine	8	2,82 \pm 0,31	7	2,60 \pm 0,19
Elohès [®] 6%	7	2,59 \pm 0,28	7	3,10 \pm 0,48
Hb-Dex-BTC	10	2,75 \pm 0,23	8	2,80 \pm 0,26
$\alpha\alpha$ -Hb	5	2,85 \pm 0,13	5	2,38 \pm 0,15
Hemolink TM	6	2,60 \pm 0,16	5	2,45 \pm 0,15

5 - Données biochimiques sanguines et plasmatiques

5.1 - Les paramètres sanguins

5.1.1 - *L'hématocrite artériel*

L'échange transfusionnel partiel de 20% du volume sanguin conduit à une réduction d'environ 29% de l'hématocrite (figure 54). On notera ici que la diminution d'hématocrite ne suit pas de manière linéaire la diminution du volume sanguin ; deux hypothèses peuvent expliquer ce fait :

- le volume sanguin échangé a été sous-estimé et ne correspond pas exactement à 20% comme attendu en se basant sur les valeurs de la littérature estimant le volume sanguin du lapin à 6,5% de son poids corporel (Mitruka BM. *et al.*, 1977),
- une redistribution de liquides entre le compartiment vasculaire et le compartiment cellulaire aboutit à un volume érythrocytaire prélevé proportionnellement plus important que le volume plasmatique.

La première hypothèse a été vérifiée par des mesures de volémie (voir le chapitre "*Influence de deux solutions d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC et $\alpha\alpha$ -Hb) sur la volémie en situation d'hémodilution chez le lapin*" pour la méthode) et a permis de montrer que le volume sanguin des animaux utilisés dans notre travail correspond à 6,74 % du poids corporel (voir figure 80). L'erreur entre les valeurs réelles et théoriques du volume sanguin à échanger est donc faible et correspond à 0,6 mL environ pour un animal de 2,75 kg, soit une erreur de moins de 2%. La seconde hypothèse pourrait faire intervenir divers mécanismes difficilement chiffrables et susceptibles d'être influencés par des facteurs tels que l'anesthésie ou la perfusion continue de la solution saline.

Néanmoins, les conditions expérimentales permettent d'atteindre une valeur finale d'hématocrite qui reste stable au cours du temps. De plus, cette valeur est similaire d'un groupe à l'autre, ce qui met en évidence l'absence d'influence de la nature de la solution sur ce paramètre. La stabilité de l'hématocrite, qui est déterminante pour l'analyse des paramètres hémodynamiques (cf. relation de Poiseuille), autorise ainsi une comparaison de ces derniers indépendamment de ce facteur sanguin.

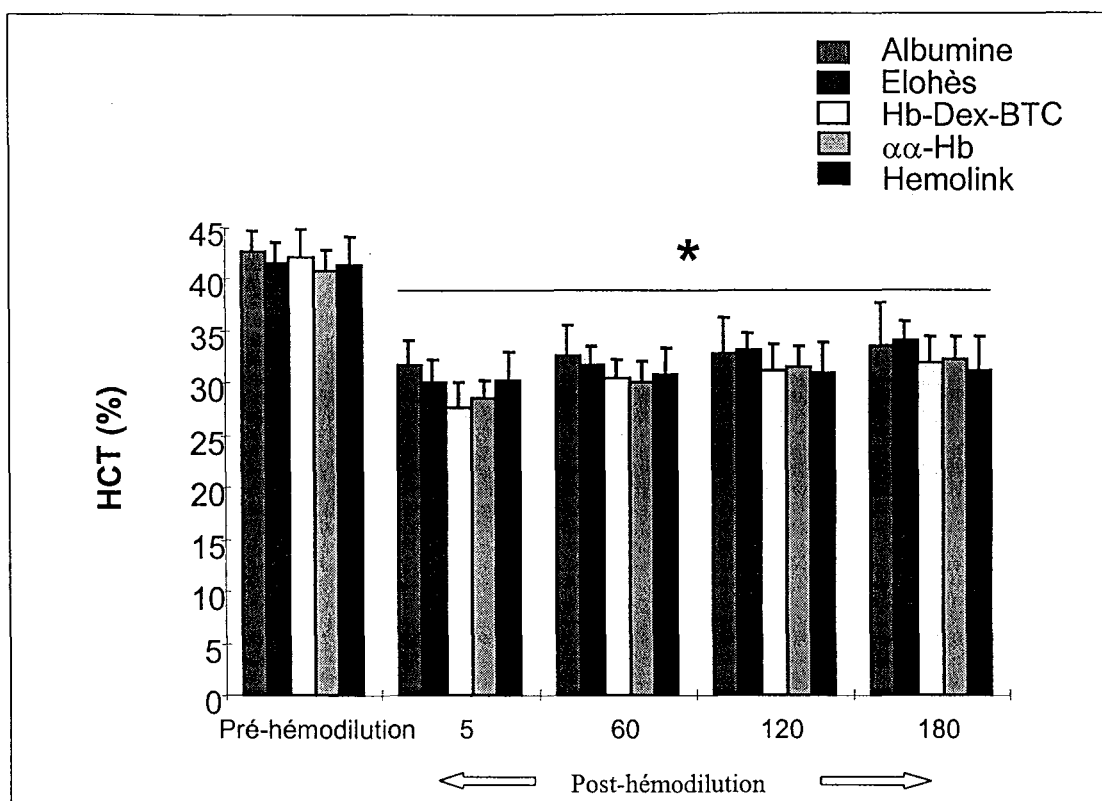


Figure 54. Influence de l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées sur l'hématocrite artériel (HCT).

Les temps post-hémodilution sont exprimés en minutes. * : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution. Pas de différence entre les groupes.

5.1.2 - Les gaz du sang

L'analyse des gaz du sang prélevé au niveau artériel n'a montré aucune altération de l'un ou l'autre des paramètres (pH, PCO_2 , PO_2) entre les différents groupes (figure 55). Les comparaisons intragroupes ont révélé des modifications ponctuelles de pH, à savoir une diminution au temps 180 min dans le groupe Elohès, une diminution aux temps 120 et 180 min dans le groupe Hb-Dex-BTC et une augmentation aux temps 60 et 120 min dans le groupe Hemolink™. Une augmentation significative de la PO_2 a été observée au temps 5 min dans le groupe Hb-Dex-BTC.

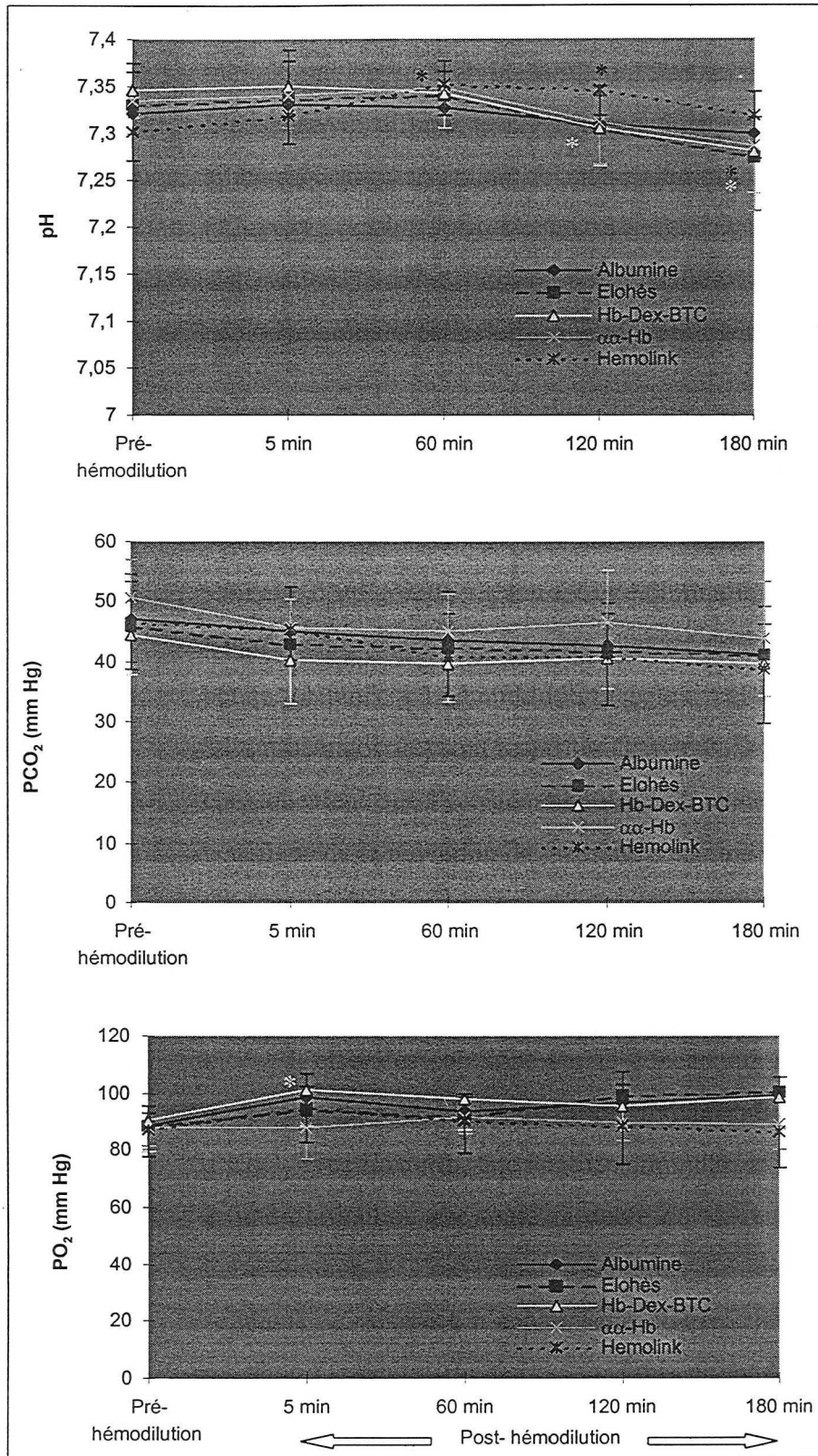


Figure 55. Influence de l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées sur le pH et les gaz du sang artériel (PCO₂ et PO₂).

* : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution. Pas de différence entre les groupes.

L'ensemble de ces résultats et notamment l'absence de modification de la PCO_2 indique une bonne stabilité de l'équilibre acido-basique dans ces conditions expérimentales. L'absence de différence significative intergroupe pour chacun des paramètres indique par ailleurs que l'intervention de mécanismes de régulation dépendants de l'état acido-basique (Alkjær C. *et al.*, 1996), à défaut d'être inexistante, est similaire pour les cinq groupes. Cette observation permet donc de conclure que l'analyse ultérieure des paramètres hémodynamiques peut s'effectuer indépendamment de ce facteur biochimique.

5.1.3 - L'hémoglobine totale circulante (figure 56)

L'échange transfusionnel partiel de 20% du volume sanguin conduit à une réduction significative de l'hémoglobine totale circulante, stable durant les trois heures de suivi et similaire d'un groupe à l'autre. Cette diminution de la tHb sanguine est parfaitement corrélée à la réduction d'hématocrite artériel et on aboutit à une situation pour laquelle les chiffres de bonne tolérance à l'hémodilution (règle des 10/30 : 10 g d'hémoglobine par dL de sang et 30% d'hématocrite) sont respectés (Janvier G. *et al.*, 1995). Dans ces conditions, on considère classiquement que l'oxygénation est maintenue à des valeurs physiologiques grâce à l'effet bénéfique de la réduction de viscosité sanguine s'opposant à l'effet d'une réduction de la tHb. Ceci se vérifie dans les groupes de référence où le taux d'HbO₂ sanguine est maintenu, bien que les solutions infusées soient dépourvues de capacité oxyphorique ; une légère augmentation de ce taux est même observée avec la solution d'HEA.

L'effet des solutions sur la concentration des différentes formes d'hémoglobine du sang total est variable selon le produit injecté puisque l'on observe un maintien du taux d'HbO₂ avec l' $\alpha\alpha$ -Hb, une augmentation durant les 60 premières minutes avec Hb-Dex-BTC et une diminution sur toute la durée du suivi avec Hemolink™. Au vu de ces données, l'amélioration de l'oxygénation sanguine par les solutions d'Hb testées en comparaison aux solutions de référence n'apparaît pas clairement. Toutefois, l'intérêt des solutions à capacité oxyphorique peut difficilement être mis en évidence par la mesure d'HbO₂ au niveau de la circulation systémique centrale. Des mesures au niveau de la microcirculation seraient nécessaires pour mettre en évidence l'apport des HBOCs en terme d'oxygénation, aussi nous nous garderons d'interpréter ces changements d'HbO₂ comme étant le reflet de l'état d'oxygénation tissulaire. Il apparaît plus probable que les modifications de l'HbO₂ sanguine

soient directement liées aux concentrations en HbO₂ présentes dans chacune des solutions (Tableau IV).

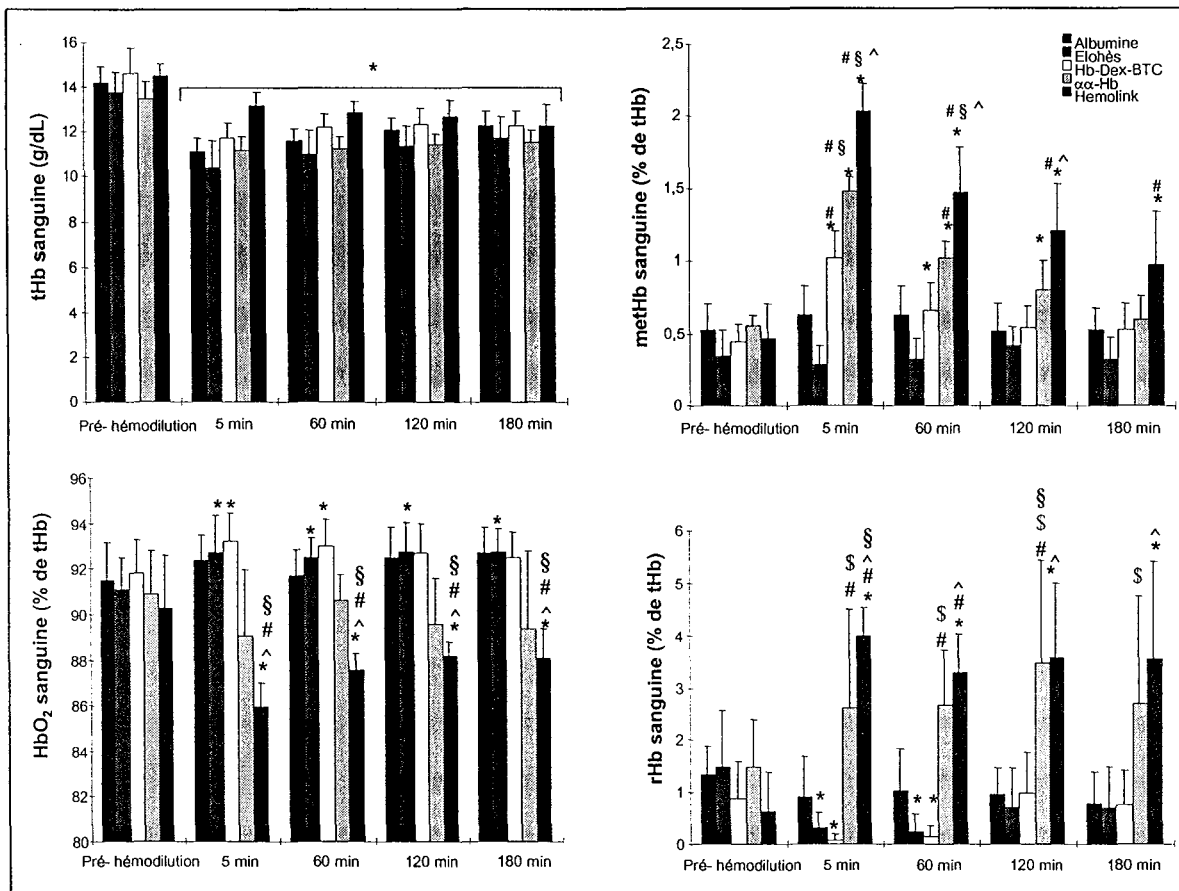


Figure 56. Influence de l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées sur les concentrations sanguines des différentes formes d'hémoglobine.

tHb : hémoglobine totale ; metHb : méthémoglobine ; HbO₂ : oxyhémoglobine ; rHb : désoxyhémoglobine.

* : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution.

§ : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Albumine ; # : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Elohès ; ^ : $P < 0,05$: Hb-Dex-BTC vs. Hemolink ; \$: $P < 0,05$: Hb-Dex-BTC vs. αα-Hb.

L'administration des solutions d'Hb provoque une augmentation de la metHb sanguine immédiate et dépendante de la concentration initiale de metHb de la solution (Tableau IV). La metHb sanguine est maximale au temps $t = 5$ min puis décroît progressivement et spécifiquement pour chacune des solutions. Ainsi, la concentration de metHb sanguine reste supérieure aux valeurs relevées durant la période pré-hémodilution pendant 60 min pour Hb-Dex-BTC, 120 min pour l'αα-Hb et 180 min pour Hemolink™. La diminution de la metHb sanguine au cours du temps est maximale dans la première heure puisque l'on observe une réduction de son taux de 35% pour Hb-Dex-BTC, de 31% pour l'αα-Hb et de 28% pour Hemolink™. Puis, entre 60 et 120 min, la réduction de la metHb est de 18% pour Hb-Dex-

BTC et Hemolink™ et de 22% pour l'αα-Hb. Enfin, entre 120 et 180 min, la metHb sanguine diminue de 2% pour Hb-Dex-BTC, 25% pour l'αα-Hb et de 19% pour Hemolink™. Les mécanismes réducteurs responsables de la diminution de la concentration de méthémoglobine ne seront pas envisagés ici mais sont détaillés dans l'article de synthèse joint en annexe 3.

A la suite de l'échange transfusionnel, l'équilibre physiologique entre les taux sanguins de rHb et d'HbO₂ est maintenu puisque ces deux paramètres varient de manière inverse. Ainsi, il apparaît clairement que la diminution de l'HbO₂ et l'augmentation de la metHb observées pour les groupes αα-Hb et Hemolink™, s'accompagnent d'une augmentation du taux de rHb sur la durée du suivi post-hémodilution. Celle-ci s'expliquerait principalement par les concentrations de rHb présente dans les solutions injectées (Tableau IV). A l'inverse, la diminution de la rHb sanguine observée jusqu'à t = 60 min dans les groupes Elohès et Hb-Dex-BTC s'oppose à l'augmentation du taux d'HbO₂ relevée aux mêmes temps.

Il apparaît donc que les concentrations sanguines des différentes formes d'hémoglobine sont dépendantes de ces mêmes concentrations au sein des solutions infusées. L'analyse des échantillons plasmatiques prélevés aux mêmes temps, proposée au paragraphe suivant, permettra de confirmer ces observations et de comparer les produits de ce point de vue.

5.2 - Les paramètres plasmatiques

5.2.1 - *Analyse quantitative de l'élimination de l'hémoglobine par co-oxymétrie* (figure 57)

De même que dans les échantillons de sang total, le taux des différentes formes d'hémoglobine a été mesuré dans le plasma. La concentration physiologique de tHb plasmatique étant inférieure à 0,5 mg/dL, il apparaît que dans notre modèle sa valeur est multipliée par un facteur 5000 à 6000 selon la solution administrée. Cette concentration est similaire pour les trois solutions au temps t = 5 min après la fin de la perfusion puis devient dose-dépendante au-delà. La diminution de la tHb plasmatique au cours du temps permet d'estimer la demi-vie plasmatique des solutions ; elle serait respectivement de 4, 6 et 7 heures pour αα-Hb, Hb-Dex-BTC et Hemolink™.

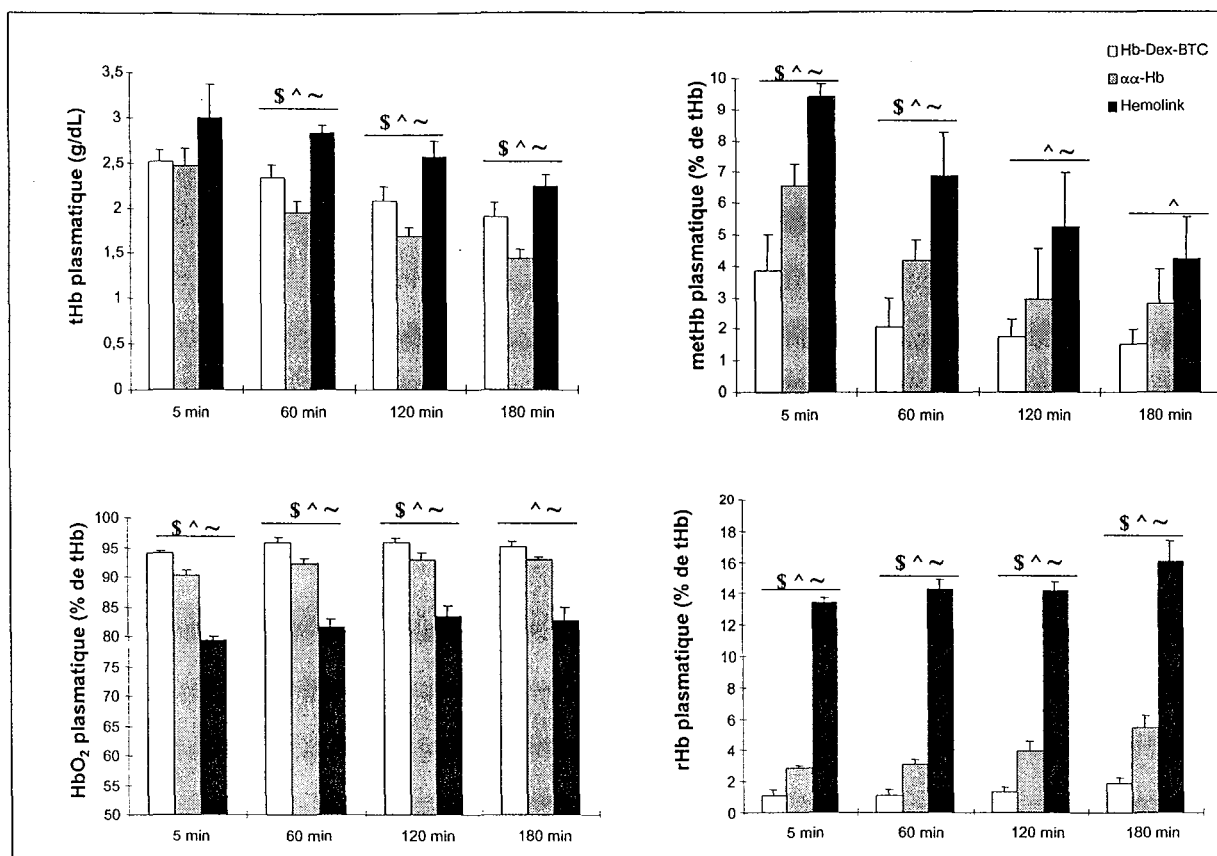


Figure 57. Influence de l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées sur les concentrations plasmatiques des différentes formes d'hémoglobine.
tHb : hémoglobine totale ; *metHb* : méthémoglobine ; *HbO₂* : oxyhémoglobine ; *rHb* : désoxyhémoglobine.
 ^ : $P < 0,05$: Hb-Dex-BTC vs. Hemolink ; ~ : $P < 0,05$: α -Hb vs. Hemolink ; \$: $P < 0,05$: Hb-Dex-BTC vs. α -Hb.

A tous les points de mesure, les taux de metHb, rHb et HbO₂ plasmatiques sont différents d'une solution à l'autre et apparaissent fortement liés aux taux initiaux au sein de ces mêmes solutions (Tableau IV). Ainsi, dès la fin de l'échange transfusionnel, Hb-Dex-BTC est présente à près de 95% sous forme oxygénée dans le plasma et n'est présente que pour moins de 4% sous forme oxydée (metHb) et environ 1% sous forme réduite. La forme oxygénée d' α -Hb représente plus de 90% de la tHb plasmatique et les formes oxydées et réduites constituent respectivement 6,5% et 3% environ de la tHb. La solution Hemolink™ présente un taux d'HbO₂ aux environs de 78% de la tHb et des taux de metHb et rHb d'environ 9% et 13% respectivement. Le catabolisme et l'élimination des solutions font évoluer les paramètres plasmatiques de manière spécifique à chacun des produits. Le taux d'HbO₂ varie peu au cours du temps pour la solution Hb-Dex-BTC et le taux de rHb semble augmenter de façon réciproque à la réduction de la metHb. Pour l' α -Hb et Hemolink™, on observe une

augmentation modeste du taux des formes oxygénées et réduites aux dépends de la forme oxydée.

Les variations du taux de metHb sont quantitativement les plus importantes et mettent en évidence la "métabolisation" de cette forme impropre au transport de l'oxygène (voir annexe 3). Ainsi, de même que pour la metHb sanguine, on observe une diminution de la metHb plasmatique qui est maximale dans la première heure suivant l'échange transfusionnel. La metHb diminue entre 5 et 60 min, respectivement de 47%, 36% et 27% pour Hb-Dex-BTC, $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™. De même, entre 60 min et 120 min, la diminution de metHb passe alors à 16%, 30% et 24%, et entre 120 et 180 min, elle décroît de 12%, 7% et 19%.

L'injection dans le compartiment vasculaire de grandes quantités d'hémoglobine acellulaire aboutit à des modifications des concentrations sanguines et plasmatiques d'hémoglobine directement liées aux taux des différentes formes d'hémoglobine présentes en solution. Le pourcentage des formes d'hémoglobine impropre au transport de l'oxygène doit donc être minimisé dans la formulation des solutions afin que, lors de leur "métabolisation", la fonction oxyphorique des produits injectés soit réelle. En particulier, le taux de metHb doit être surveillé car une élévation de la méthémoglobine sanguine (au-delà de 1,5% chez l'homme) peut engendrer des états de cyanose. De ce point de vue, Hb-Dex-BTC se révèle être la solution perturbant le moins les paramètres sanguins parmi les trois HBOCs utilisées dans notre modèle. Les solutions d' $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™ testées ici présentent en effet des taux de metHb (et de rHb) conduisant à une élévation relativement conséquente de ces mêmes paramètres au niveau sanguin et plasmatique. Si dans notre étude les conséquences de ces modifications sur l'état physiologique des animaux ne semblent pas délétères (cf. l'évolution des gaz du sang), il convient toutefois de s'interroger sur leurs effets à long terme (suivi que ne permet pas notre modèle) ou en cas d'une administration plus massive, car les résultats montrent que la présence d'hémoglobine dans le plasma est dose-dépendante. En effet, une saturation des systèmes hépatiques et rénaux impliqués dans le catabolisme de l'hémoglobine est susceptible de survenir en cas de dosage trop important. A notre connaissance, peu d'effets secondaires permettant d'argumenter dans ce sens ont été décrits dans la littérature avec les nouvelles générations d'HBOCs (Adamson JG. *et al.*, 1998 ; Gould SA. *et al.*, 1997 ; Standl T. *et al.*, 1998).

5.2.2. Analyse qualitative par HPLC de l'élimination de l'hémoglobine

Pour chacun des groupes, une analyse chromatographique d'échantillons plasmatiques prélevés sur le même animal aux temps 5, 60, 120 et 180 min a été réalisée afin de suivre qualitativement le devenir des solutions d'hémoglobine. Cette étude a été effectuée selon la méthodologie décrite au paragraphe 2 ("*Analyse chromatographique des solutions d'hémoglobine perfusées*"). L'analyse de plasma en l'absence de solution d'hémoglobine n'a révélé aucun signal susceptible d'interférer avec les pics dus à l'hémoglobine. Les résultats présentés dans les figures 58 et 59 permettent d'apprécier la diminution du taux d'hémoglobine plasmatique dans le temps et n'indiquent aucune modification de l'allure des pics des solutions. Cette observation permet d'affirmer que, pour chacune des solutions, la structure de l'hémoglobine modifiée est préservée durant les trois heures de suivi envisagées dans notre modèle.

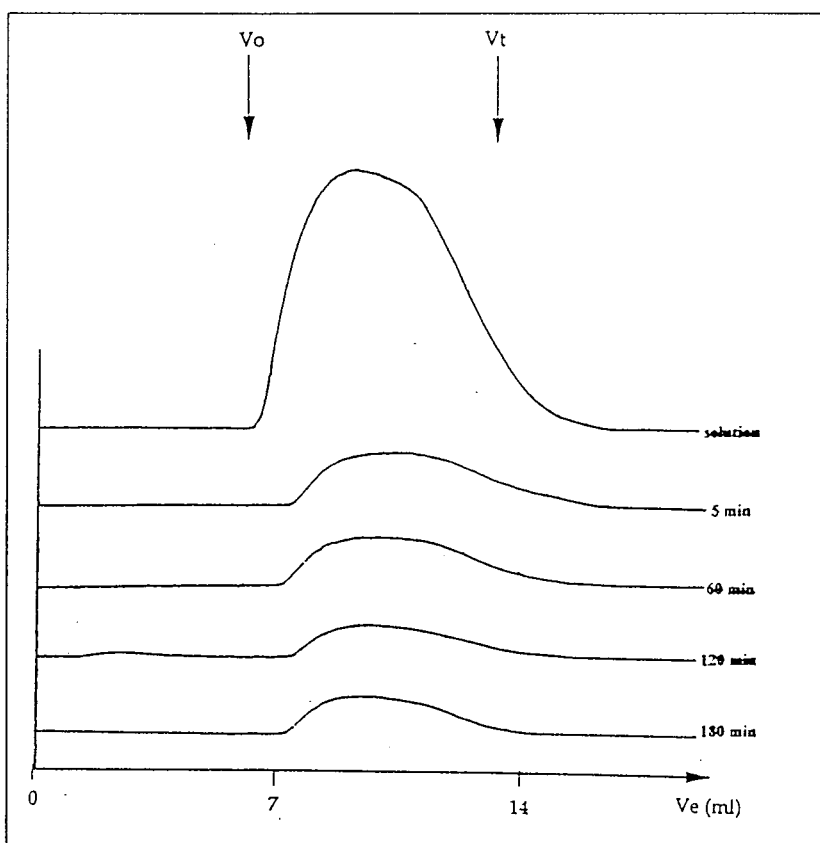


Figure 58. Chromatogrammes obtenus à partir d'échantillons plasmatiques recueillis à différents temps après échange transfusionnel avec la solution Hb-Dex-BTC. Le chromatogramme de la solution infusée est proposé pour rappel. (TSK G3000 SW - tampon phosphate 0,05 M - pH 7,2 - 25°C - détection UV à 580 nm).

V_o : volume mort ; V_t : volume total

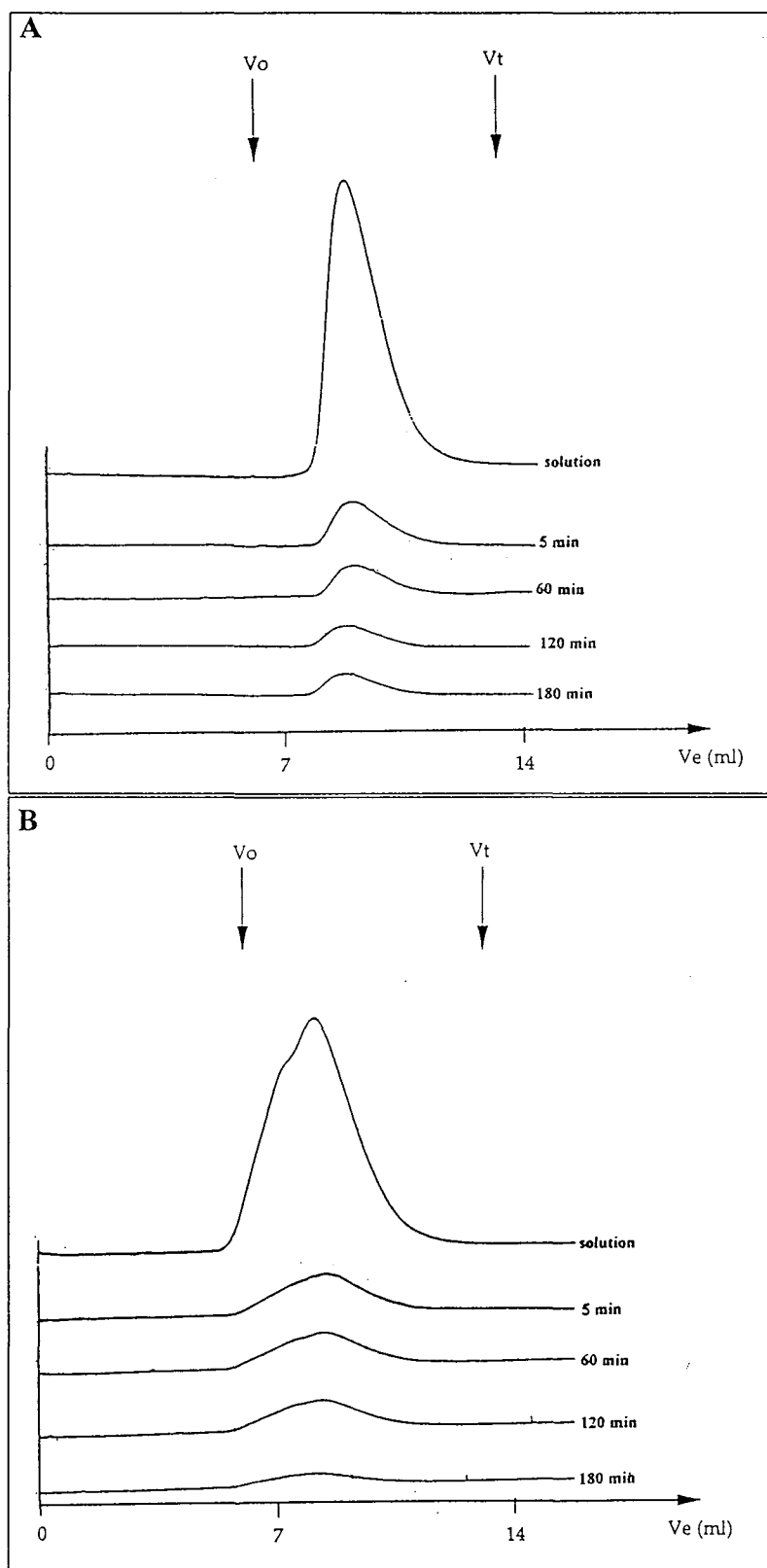


Figure 59. Chromatogrammes obtenus à partir d'échantillons plasmatiques recueillis à différents temps après échange transfusionnel avec la solution $\alpha\alpha$ -Hb (A) ou Hemolink™ (B). Les chromatogrammes des solutions infusées sont proposés pour rappel. (TSK G3000 SW - tampon phosphate 0,05 M - pH 7,2 - 25°C - détection UV à 580 nm).
 V_o : volume mort ; V_t : volume total

6 - Données hémodynamiques

Après l'analyse des données biochimiques, nous allons comparer les effets de chacune des solutions testées sur les paramètres hémodynamiques.

6.1 - La pression artérielle moyenne (PAM) (figure 60)

Les mesures de PAM mettent clairement en évidence l'effet presseur des trois HBOCs, largement décrit dans la littérature. Toutefois, les variations observées diffèrent d'une solution à l'autre. L'augmentation de la PAM n'est en effet significative que durant une heure pour Hemolink™, alors qu'elle le demeure durant les trois heures de suivi pour les solutions Hb-Dex-BTC et $\alpha\alpha$ -Hb. Malgré cette différence dans la durée de l'effet presseur, aucune différence significative quant à l'intensité de cet effet n'a pu être mise en évidence d'une solution d'Hb à l'autre.

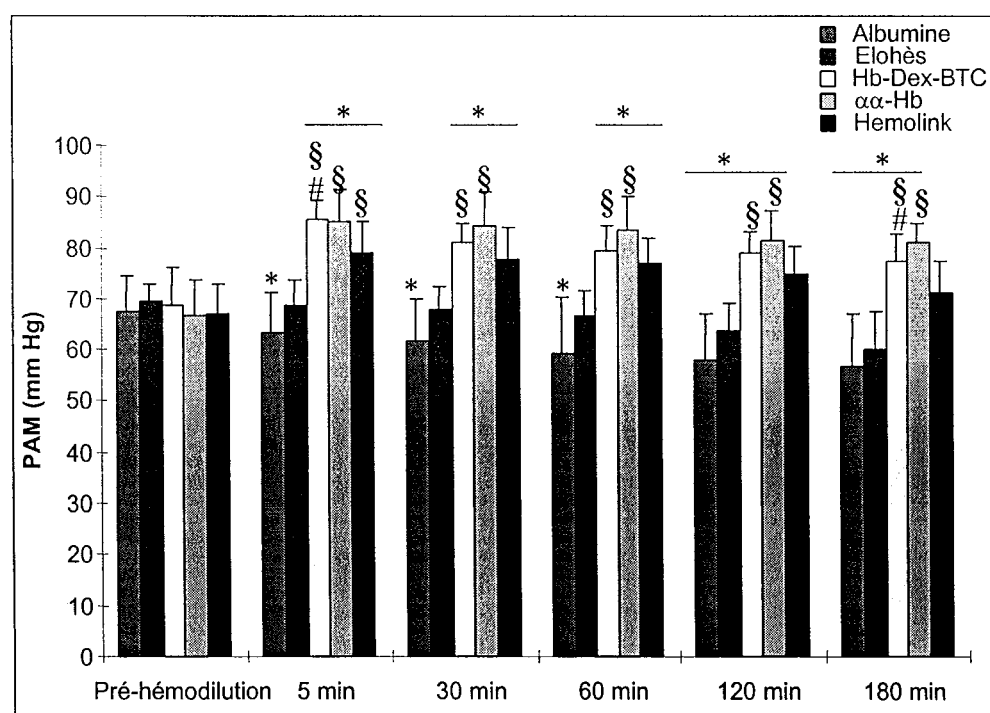


Figure 60. Variations de la pression artérielle moyenne (PAM) en réponse à l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

* : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution ; § : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Albumine ; # : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Elohès.

A l'inverse des solutions d'Hb, l'hémodilution avec les solutions de référence conduit à une diminution de la PAM, immédiate avec l'albumine et apparaissant à $t=120$ min avec

l'HEA. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent qu'il existe une "compétition" entre l'effet vasoactif des solutions infusées qui se manifeste notamment par des variations de la PAM et l'effet propre à l'hémodilution (modifications des propriétés rhéologiques du sang). Ainsi, les résultats montrent que l'effet presseur des solutions d'Hb surpasse l'hypotension résultant de l'hémodilution.

Pour la suite de notre analyse, il sera donc nécessaire de garder en mémoire cette situation de "compétition" dont les effets sont susceptibles d'affecter l'hémodynamique dans son ensemble.

6.2 - La fréquence cardiaque (figure 61)

Dans les trois groupes d'HBOCs, la fréquence cardiaque varie de manière inverse à l'augmentation de PAM observée. On note en effet une diminution de la fréquence cardiaque par rapport à sa valeur pré-hémodilution durant 30 min pour Hemolink™, durant 60 min pour $\alpha\alpha$ -Hb et sur les 3 heures du suivi pour Hb-Dex-BTC. En dépit des modifications de fréquence cardiaque, aucune différence significative n'a été mise en évidence d'une solution d'Hb à l'autre.

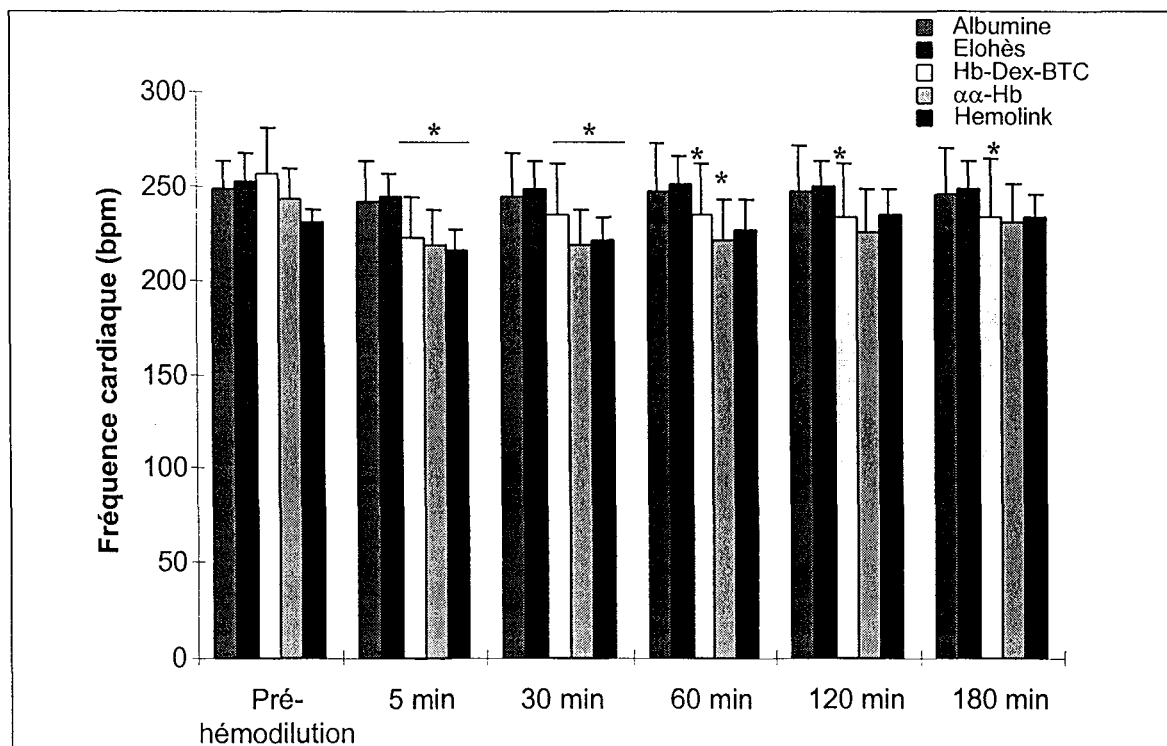


Figure 61. Variations de la fréquence cardiaque en réponse à l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

* : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution.

Les variations de fréquence cardiaque pourraient être dues en partie à une correction de type baroréflexe qui vise à adapter le débit cardiaque à la pression de perfusion (voir figure 19). Cette réponse réflexe ne semble pas être mise en jeu dans les groupes de référence, probablement du fait de l'amplitude limitée des variations de pression observées. Un effet bradycardisant direct des solutions n'est toutefois pas à exclure puisque les variations de PAM ne sont pas toujours corrélées à la fréquence cardiaque. Un tel effet a déjà été mis en évidence pour la DCLHb™ (Migata R. *et al.*, 1997).

L'évolution d'autres paramètres hémodynamiques va maintenant être abordée.

6.3 - La vitesse sanguine aortique (figure 62)

L'évolution de la vitesse sanguine aortique se fait selon le schéma observé dans les études décrites précédemment (figures 39 et 47) avec une diminution marquée après 60 min. Les comparaisons inter-groupes n'ont mis en évidence que peu de différences significatives d'une solution à l'autre. Ces résultats indiquent donc que la vitesse sanguine semble plus influencée par les conditions expérimentales que par les éventuelles propriétés vasoactives des différentes molécules.

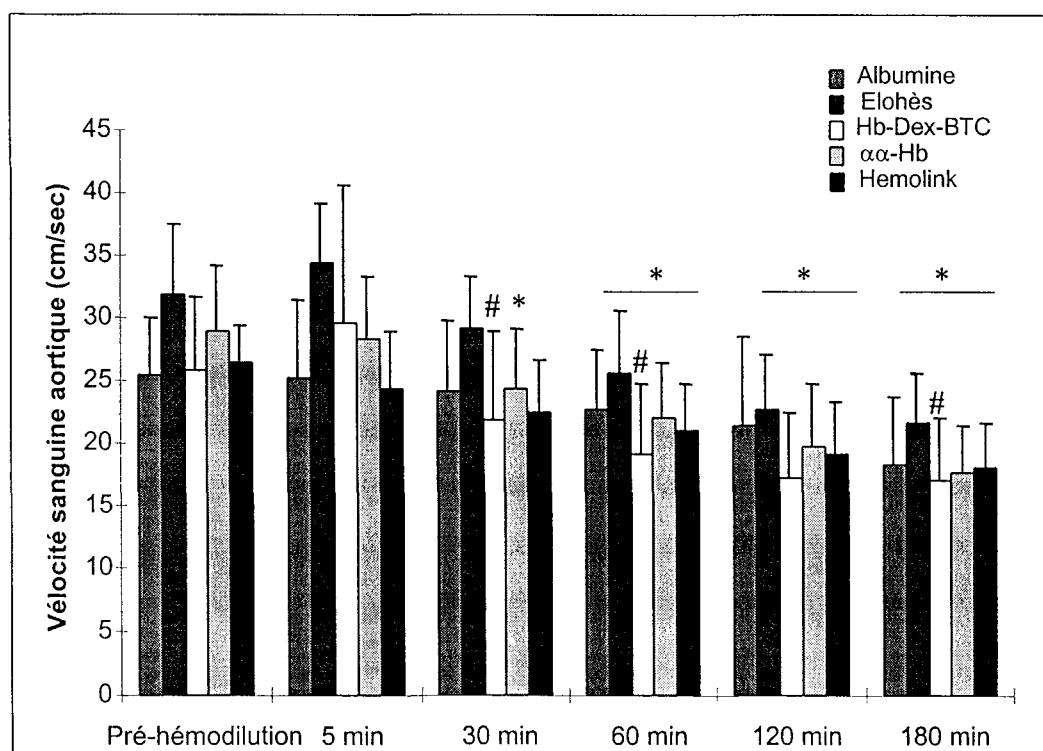


Figure 62. Variations de la vitesse sanguine aortique en réponse à l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

* : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution ; # : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Elohès.

Au regard de la littérature, une hémodilution isovolémique avec réduction de l'hématocrite aux environs de 30% se traduit généralement par une augmentation du débit cardiaque visant à adapter l'apport d'oxygène et de nutriments à la demande métabolique (Spahn DR. *et al.*, 1994 ; Birchard GF., 1997). Or, si l'on assimile la vitesse sanguine aortique au débit aortique (à défaut de mesurer le débit cardiaque absolu dans notre modèle), nous observons une diminution de ce paramètre, résultat d'une probable vasoconstriction, ce qui laisse préjuger que d'autres facteurs interviennent dans le modèle.

L'analyse des autres données hémodynamiques telles que la vitesse sanguine mesurée sur des vaisseaux plus périphériques et la résistance devrait permettre de répondre à cette question.

6.4 - La résistance périphérique (figure 63)

Comme nous l'avons souligné dans le chapitre décrivant le mode de calcul des différents paramètres hémodynamiques, la résistance telle que nous l'utilisons dans notre modèle ne peut rendre compte du tonus vasomoteur dans sa totalité, mais seulement du comportement des vaisseaux résistifs situés en aval du point de mesure de la pression artérielle et de la vitesse sanguine aortique.

A l'instar de la PAM, la résistance augmente en réponse à l'injection des solutions d'Hb, dès la fin de l'échange transfusionnel et pour la durée du suivi. Toutefois, on note des différences d'incrément d'une solution d'Hb à l'autre, avec une augmentation constante de la résistance pour $\alpha\alpha$ -Hb et Hb-Dex-BTC, alors que pour Hemolink™, la résistance est stable à partir de 60 min. Néanmoins, les calculs statistiques n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les trois HBOCs. L'absence de variations de résistance dans les groupes contrôles indique que l'éventualité d'une vasoconstriction due au modèle, telle que nous l'avons évoquée au paragraphe précédent, ne semble pas se confirmer. Ces résultats tendent donc à démontrer l'effet vasoconstricteur des solutions d'Hb *per se* et permettent notamment d'expliquer l'augmentation de PAM observée.

L'étude de la vitesse sanguine en périphérie (artères rénale et fémorale), envisagée dans les deux paragraphes suivants, devrait permettre d'affiner cette proposition.

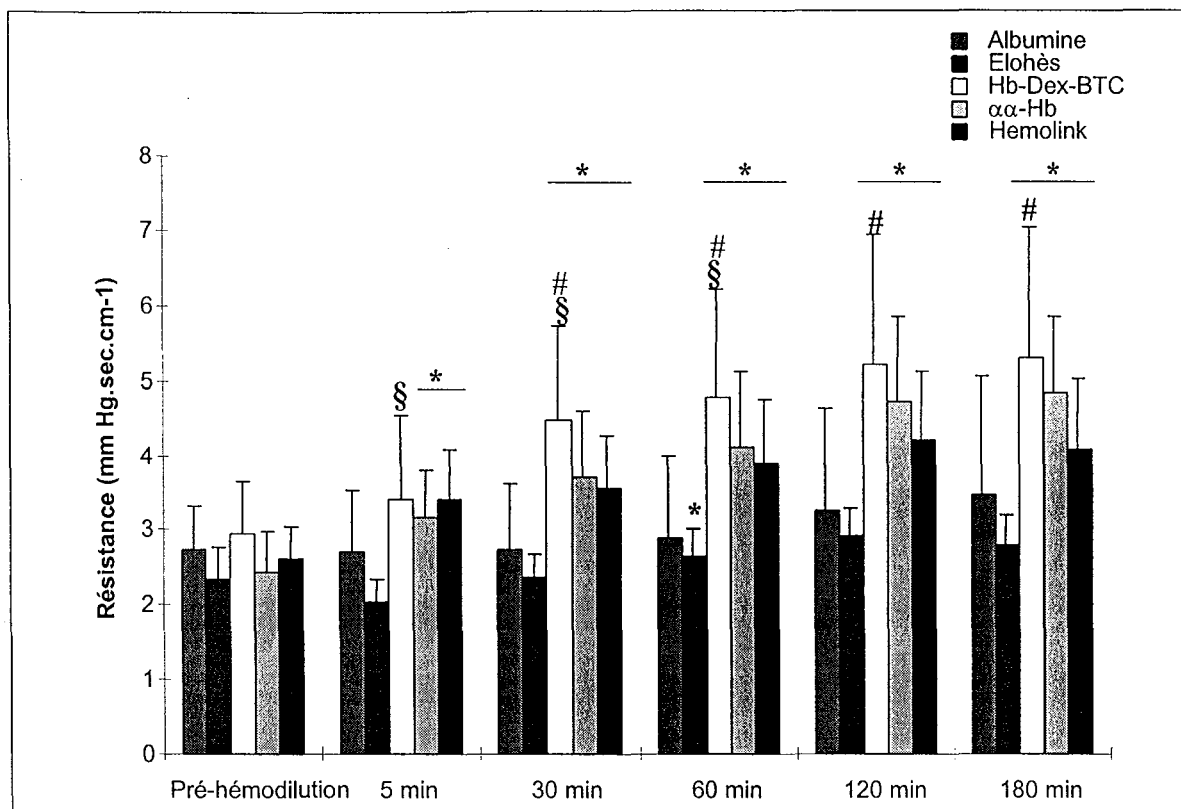


Figure 63. Variations de la résistance périphérique en réponse à l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

* : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution ; § : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Albumine ; # : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Elohès.

6.5 - La vélocité sanguine rénale (figure 64)

Les comparaisons statistiques intra- et inter-groupes n'ont révélé aucune modification de la vélocité sanguine rénale (VSR), quelle que soit la solution infusée, ce qui indique que l'hémodilution est sans influence sur ce paramètre. L'intervention des mécanismes d'autorégulation rénale pourrait expliquer le fait que les variations hémodynamiques engendrées par l'hémodilution et/ou l'effet propre des solutions ne s'observent pas à ce niveau. Le système intrinsèque des reins vise en effet à maintenir constante la filtration glomérulaire, élément essentiel de l'homéostasie, en dépit des fluctuations hémodynamiques systémiques et, pour ce faire, met en jeu plusieurs voies d'autorégulation comprenant un mécanisme myogène, un mécanisme de rétroaction des tubules sur les glomérules, un mécanisme NO-dépendant et le système rénine-angiotensine (Tack I. *et al.*, 1997).

Ainsi, la seule mesure de la VSR ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet vasoconstricteur des HBOCs au niveau artériel rénal, tel que nous l'avons proposé au paragraphe précédent. La détermination simultanée du diamètre de l'artère rénale permettrait

de vérifier cette hypothèse, mais comme nous l'avons vu cette mesure n'a pu être réalisée dans notre modèle.

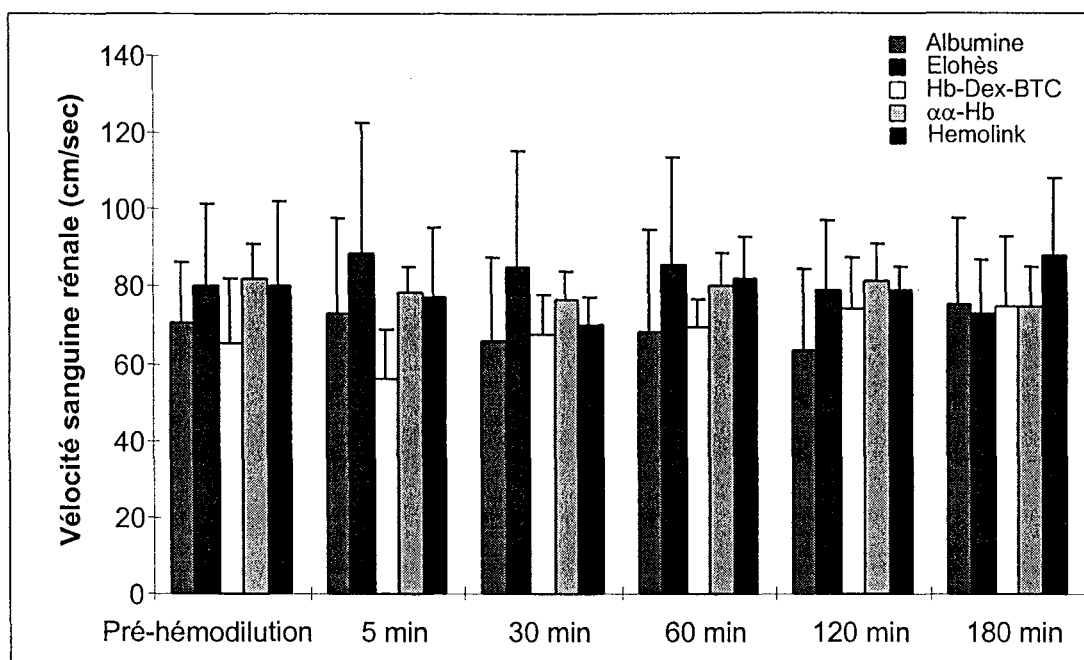


Figure 64. Variations de la vélocité sanguine rénale en réponse à l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m. *Pas de différence.*

6.6 - La vélocité sanguine fémorale (figure 65)

La vélocité sanguine fémorale (VSF) est diversement modifiée selon la solution injectée. Ainsi, après administration d'albumine, la VSF est stable, puis augmente significativement à partir de 120 min. L'injection des solutions d'HEA et d' α -Hb conduit à une diminution de la VSF qui n'apparaît toutefois pas significative d'après les calculs statistiques. Les solutions Hb-Dex-BTC et HemolinkTM induisent une diminution significative transitoire de la VSF (entre 30 et 120 min). En dépit des évolutions divergentes de la VSF entre la solution α -Hb d'une part, et les solutions Hb-Dex-BTC et HemolinkTM d'autre part, l'analyse statistique ne montre pas de différence entre les trois HBOCs.

Les résultats montrent donc une diminution globale de la VSF, plus ou moins marquée et transitoire selon la solution d'Hb, qui serait la conséquence de l'effet vasoconstricteur des HBOCs.

En conclusion, l'analyse des données hémodynamiques indique que, dans notre modèle, les modifications de pression, résistance et vélocité sanguine centrale et périphérique

sont dans leur ensemble comparables entre les trois HBOCs testés. Pour tenter de confirmer l'effet vasoconstricteur que décrivent ces données, nous avons étudié deux paramètres décrivant la tonicité des vaisseaux, de manière individuelle (coefficient de distensibilité aortique) ou globale (indice de pulsatilité).

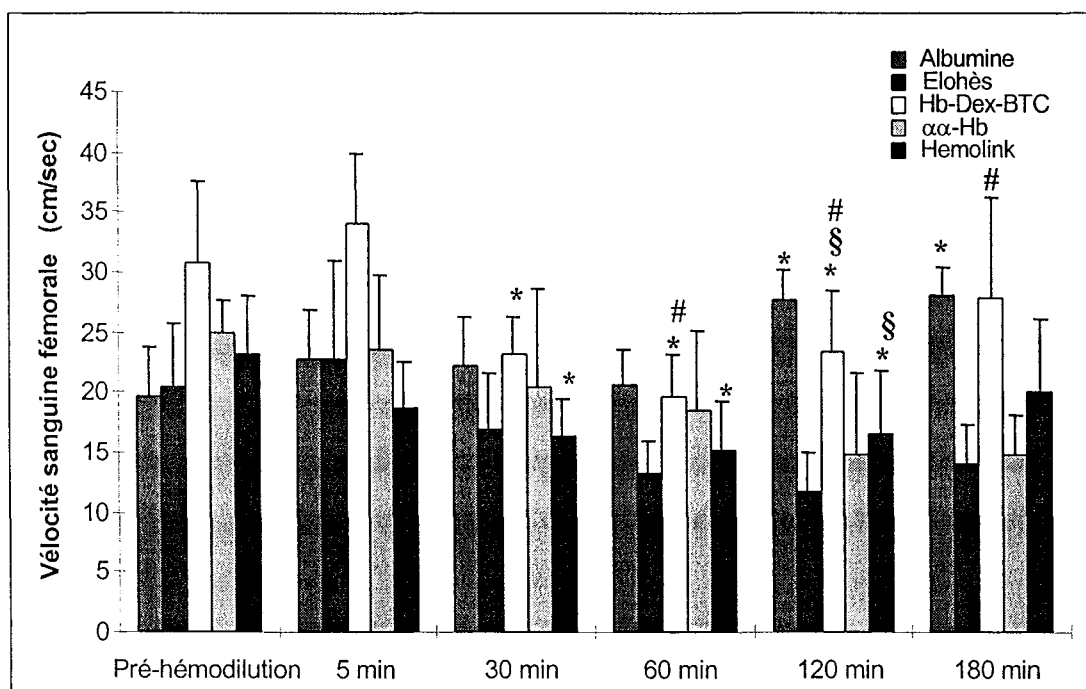


Figure 65. Variations de la vélocité sanguine fémorale en réponse à l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

* : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution ; § : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Albumine ; # : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Elohès.

7 - Paramètres du tonus vasculaire

Les calculs du coefficient de distensibilité et de l'indice de pulsatilité ont été effectués au moyen du logiciel Acqknowledge® (Biopac system, USA), sur des fenêtres d'analyse de cinq secondes environ et aux temps définis précédemment. Le détail des calculs est présenté dans les deux paragraphes suivants.

7.1 - Le coefficient de distensibilité aortique (figure 67)

Les modifications hémodynamiques reportées aux paragraphes précédents sont en accord avec les données obtenues *in vitro* montrant l'effet constricteur de différentes solutions d'hémoglobine sur des portions d'artères isolées et notamment d'origine aortique (Martin W. *et al.*, 1985 ; Nakai K. *et al.*, 1996 ; Rioux F. *et al.*, 1997a ; Hart JL. *et al.*, 1997). Afin

d'étudier *in vivo* l'action des HBOCs sur le tonus aortique, nous avons procédé à des mesures de dimensions du vaisseau par la technique d'*echo-tracking*. Nous tenons à rappeler que le module ultrasonore Wall-Tracker, dans la configuration où nous l'avons utilisé, n'autorise pas une mesure absolue des variations du diamètre de l'aorte abdominale, mais permet de mettre en évidence d'éventuelles modifications des propriétés mécaniques du vaisseau (voir partie "*Description du modèle expérimental de base*").

Ainsi selon le protocole de l'étude n°1, nous avons montré que les variations de pression induites par les solutions d'hémoglobine se traduisent par une diminution de la distension aortique (Δd) (annexe 3). Toutefois, les variations de diamètre des vaisseaux de gros calibre étant dépendantes de la pression qui s'exerce sur leur paroi (figure 66), la détermination de Δd ne nous a pas permis de conclure à un effet direct des HBOCs sur le tonus aortique. Pour ce faire, il est nécessaire de normaliser les variations de diamètre par rapport aux variations de pression ; cette opération se réalise par le biais du calcul de paramètres de l'élasticité vasculaire pariétale (Lehmann ED. *et al.*, 1993 ; Marchais SJ. *et al.*, 1993 ; Rouvière R., 1998).

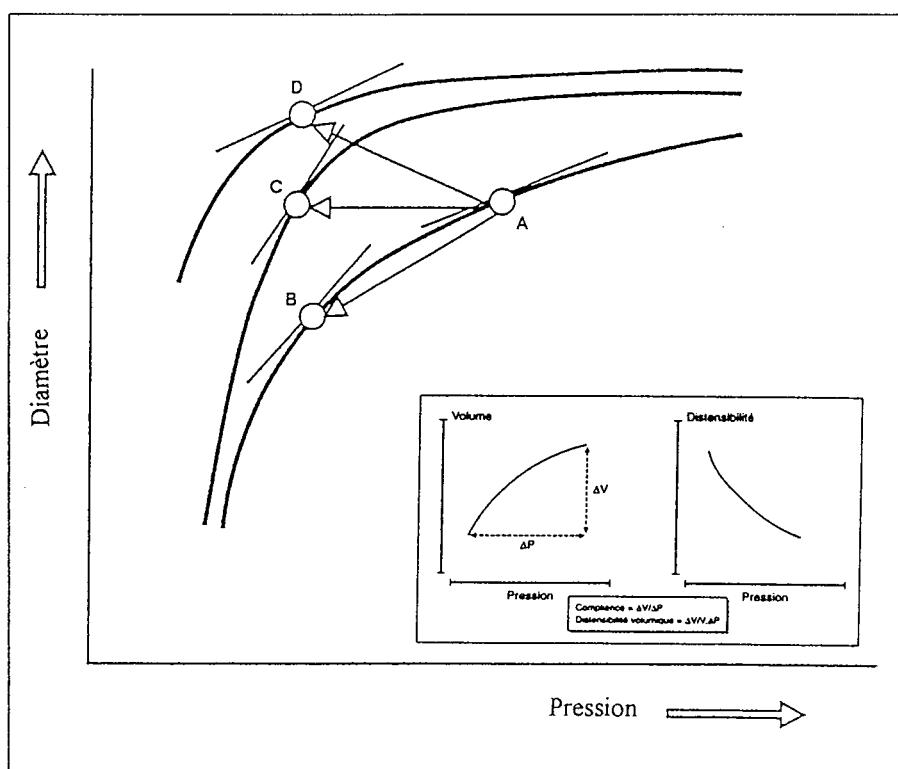


Figure 66. Relation pression-diamètre pour un vaisseau de gros calibre. La compliance est définie par la pente à chaque valeur de pression (-O-). La compliance peut être modifiée sous l'effet de substances vasoactives de manière passive (effet pression-dépendant, flèche de A vers B) ou de manière active (flèches de A vers C et de A vers D). D'après Marchais SJ. *et al.*, 1993.

Classiquement, la compliance (C_v) est définie comme la variation de volume ΔV pour une variation donnée de pression ΔP :

$$C_v = \Delta V / \Delta P$$

La distensibilité, décrite par le coefficient de distensibilité (DC), correspond quant à elle au pourcentage de variation de volume ($\Delta V/V$) pour une variation de pression :

$$DC = (\Delta V/V) / \Delta P$$

En considérant que les variations de volume du vaisseau sont dues à sa distension plutôt qu'à son élongation, la précédente équation peut s'écrire en fonction de l'aire de section A du vaisseau :

$$DC = (\Delta A/A) / \Delta P = \frac{[(2\pi d \cdot \Delta d) / 4] [4 / \pi d^2]}{\Delta P}$$

Le coefficient de distensibilité peut ainsi s'écrire après simplification :

$$DC = (2\Delta d/d) / \Delta P$$

A partir des données recueillies par le module Wall-Tracker (Δd et d) et par le capteur de pression (ΔP), nous avons appliqué ce calcul et obtenu les résultats présentés dans la figure 67.

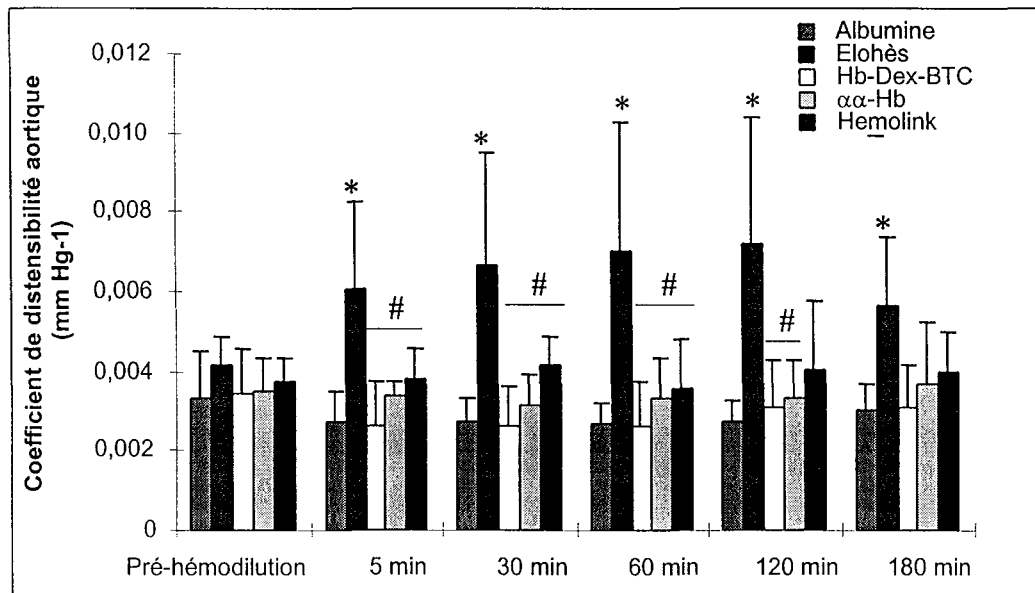


Figure 67. Variations du coefficient de distensibilité aortique en réponse à l'hémodilution par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

* : $P < 0,05$: pré-hémodilution versus temps post-hémodilution ; # : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Elohès..

Sur la durée du suivi post-hémodilution, l'analyse statistique intra- et inter-groupe n'a révélé aucune différence chez les animaux traités avec les solutions d'albumine, Hb-Dex-BTC, $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™. Pour la solution d'HEA, l'analyse révèle une augmentation significative de DC par rapport à la valeur de base et par rapport aux valeurs des trois groupes d'HBOCs. Ces résultats suggèrent que les solutions d'hémoglobine n'ont pas d'effet direct sur les propriétés mécaniques de l'aorte abdominale. A l'inverse, la solution d'HEA provoque une augmentation immédiate et durable de la distensibilité aortique, laissant supposer un effet vasodilatateur de ce produit sur le vaisseau.

7.2 - L'indice de pulsatilité (figure 69)

L'indice de pulsatilité est un estimateur non dimensionnel de la résistance périphérique calculé à partir du signal de vitesse sanguine aortique. Comme nous l'avons vu dans la partie "*Description du modèle expérimental de base*" (figure 37), ce signal présente une allure sinusoïdale. L'indice de pulsatilité (I_p) se calcule selon la formule :

$$I_p = (V_{\max} - V_{\min}) / V_{\text{moy}}$$

avec V_{\max} représentant la vitesse maximale, V_{\min} , la vitesse minimale et V_{moy} , la vitesse moyenne (Herment A. et Peronneau P. Estimateurs de l'écoulement. In : *Vélocimétrie Doppler. Applications en pharmacologie cardiovasculaire animale et clinique*, édité par P. Péronneau. INSERM éd., 1991, pp 69-82) (figure 68).

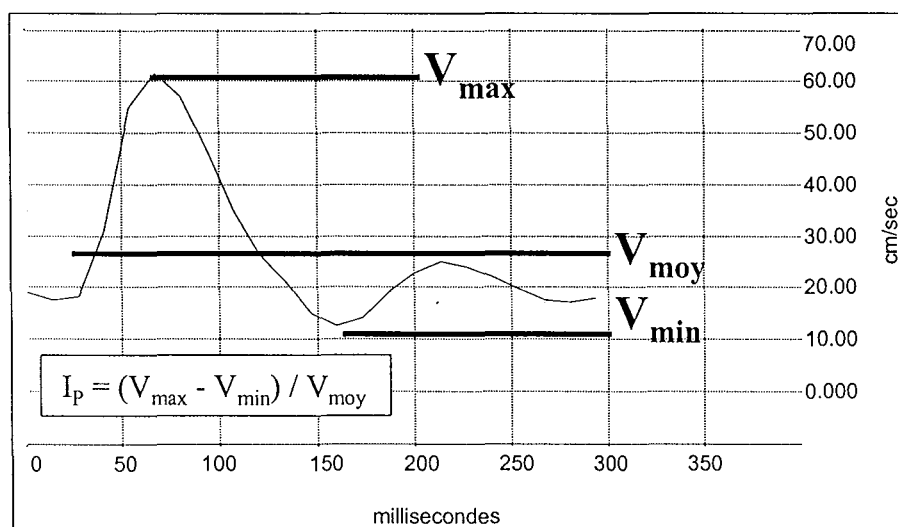


Figure 68. Définition de l'indice de pulsatilité (I_p), à partir d'un signal de vitesse sanguine aortique recueilli sur un lapin anesthésié.

V_{\max} : vitesse maximale ; V_{\min} : vitesse minimale ; V_{moy} : vitesse moyenne

Cet indice présente donc un intérêt particulier pour notre problématique puisqu'il permet d'exprimer la résistance périphérique indépendamment des variations de débit et de pression. Le calcul de l'indice de pulsatilité, réalisé à partir des données fournies par les études n°1 et 2, a donné les résultats présentés dans la figure 69. Ils mettent en évidence une évolution différente de l'indice de pulsatilité immédiatement après hémomodulation entre les groupes de référence (I_p inchangé) et les groupes HBOCs (I_p diminué). Les comparaisons inter-groupes n'ont révélé aucune différence significative entre les trois solutions d'hémoglobine.

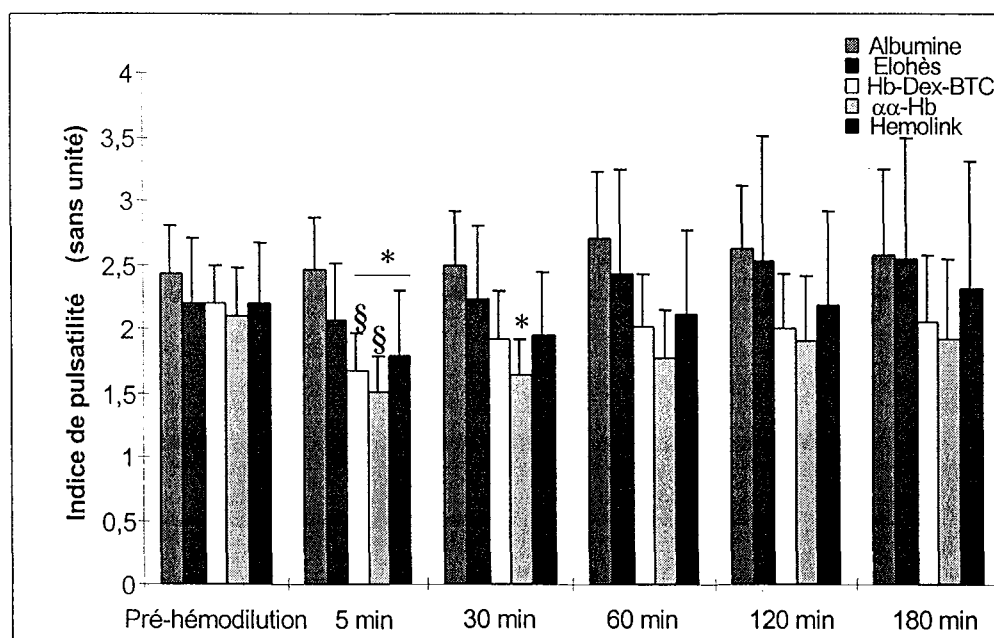


Figure 69. Variations de l'indice de pulsatilité en réponse à l'hémomodulation par échange transfusionnel partiel avec les solutions testées. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

* : $P < 0,05$: pré-hémomodulation versus temps post-hémomodulation ; § : $P < 0,05$: solution d'Hb vs. Albumine.

8 - Conclusion

Nous avons pu observer que les modifications hémodynamiques engendrées par les trois HBOCs testées dans le modèle proposé sont clairement différentes de celles provoquées par les solutions de référence et en faveur d'une action vasoconstrictrice se traduisant par une augmentation de la résistance. Cette augmentation de résistance n'a pu être confirmée par le calcul de l'indice de pulsatilité qu'à court terme et aucun effet direct sur le tonus aortique n'a été mis en évidence. L'effet hypertenseur des HBOCs semble résulter de l'augmentation de la résistance et il permet en partie d'expliquer la baisse transitoire de fréquence cardiaque. Les

variations de pression sont apparues stables en dépit de l'augmentation croissante de résistance dans le temps et suggèrent donc la mise en œuvre d'une régulation efficace.

La mise en évidence de l'impact éventuel de la formulation de chaque HBOC (modification chimique appliquée à l'hémoglobine ou encore caractéristiques physico-chimiques des solutions) est rendue délicate au niveau macrohémodynamique, par les multiples paramètres non contrôlables pouvant être impliqués. Dans notre modèle, les données hémodynamiques sont en effet influencées par les propriétés pharmacologiques des solutions mais aussi par l'hémodilution *per se*. Cette dernière engendre une réduction de la viscosité du sang et donc une diminution de la résistance à l'écoulement.

Nous avons donc tenté de contourner cette difficulté en abordant différents mécanismes susceptibles d'intervenir dans notre modèle expérimental, indépendamment les uns des autres. Ces études expérimentales sont proposées au chapitre suivant.

9 - Annexe 3

Les deux articles cités en référence dans le présent chapitre sont proposés ci-après.

Cardiovascular and hemorheological effects of three modified human hemoglobin solutions in hemodiluted rabbits

ALEXIS CARON,¹ PATRICK MENU,¹ BEATRICE FAIVRE-FIORINA,¹
PIERRE LABRUDE,¹ ABDU I. ALAYASH,² AND CLAUDE VIGNERON¹

¹Department of Hematology and Physiology, School of Pharmacy, University Henri Poincaré-Nancy 1, 54001 Nancy cedex, France; and ²Laboratory of Plasma Derivatives, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20892

Caron, Alexis, Patrick Menu, Beatrice Faivre-Fiorina, Pierre Labrude, Abdu I. Alayash, and Claude Vigneron. Cardiovascular and hemorheological effects of three modified human hemoglobin solutions in hemodiluted rabbits. *J. Appl. Physiol.* 86(2): 541–548, 1999.—The cardiovascular effects of human albumin (Alb) and three human hemoglobin (Hb) solutions, dextran-benzene-tetracarboxylate Hb, $\alpha\alpha$ -crosslinked Hb, and *o*-raffinose-polymerized Hb were compared in anesthetized rabbits undergoing acute isovolemic hemodilution with Hct reduction from 41.4 ± 2.7 to $28.8 \pm 1.6\%$. The impact of the vasoconstricting properties of Hb was examined by measuring heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP), abdominal aortic, and femoral arterial blood flow, vascular resistance (VR), and aortic distension during the first 3 h after hemodilution. The impact of the hemorheological parameters was assessed by measurements of hemodiluted blood viscosity. In contrast to Alb, the Hb solutions elicited an immediate increase in MAP (20–38%). The effects of Alb and Hb solutions on HR, as well as on aortic and femoral arterial blood flow, were similar. VR decreased with Alb (20–28%) and increased with all three Hb solutions (30–90%), but the MAP and VR rising trends were different with each Hb solution. Aortic distension decreased in Hb groups compared with the Alb group for the first 60 min. The viscosity of hemodiluted blood was similar for all groups at high shear rates but was dependent on the viscosity of the solutions at low shear rates. We conclude that the vasoconstriction elicited by the Hb solutions overrides the vasodilation associated with viscosity changes due to hemodilution and would be the major factor responsible to the cardiovascular changes.

oxygen carriers; blood flow; hemodilution; viscosity

PRESENTLY, HEMOGLOBIN (Hb)-based solutions are undergoing advanced clinical trials with the aim of reducing blood transfusion in situations of preoperative and intraoperative hemodilution. These solutions make it possible to reduce serious complications associated with transfusion and have the advantage, compared with plasma exchange fluids, of possessing O₂-carrying capacity (25). However, many studies reported an increased arterial pressure after infusion of Hb solutions, in both animals and humans, as a result of vasoconstriction (1, 4, 6). This property has been demonstrated *in vitro* in various preparations of vessels immersed in or perfused with Hb (9, 15, 23). The most commonly

accepted explanation is that free Hb (in the ferrous form Fe²⁺) traps nitric oxide (NO) released by the endothelium and thus impairs the vasodilating action of this relaxing factor (14, 19, 23). Nakai et al. (19) compared cellular Hb forms and free Hb derivatives in rabbit aorta strips. Nakai et al. emphasized the contribution of Hb chemical form to the NO-trapping action of the solutions. However, in a recent report, Rohlf et al. (24) concluded that the blood pressure increases observed in rats after 50% exchange transfusion with Hb solutions could not be the result of NO scavenging by the heme and indicated that other physiological mechanisms were more likely to be involved. Gulati et al. (8) also suggested a contribution by endothelin to the pressor action of diaspirin cross-linked Hb ($\alpha\alpha$ -Hb) in hemorrhaged rats. Stimulation of α -adrenergic receptors has also been proposed as a reason for peripheral vasoconstriction after $\alpha\alpha$ -Hb administration in rats (7, 26). An autoregulatory control of blood pressure in response to changes in tissue oxygenation was also proposed by Intaglietta et al. (13) as a contributing mechanism to vasoactivity. Nolte et al. (20, 21) indicated that the increased blood O₂-carrying capacity in the microcirculation after injection of $\alpha\alpha$ -Hb could also contribute to the pressor response of Hb as a result of alterations in vasomotion frequency and amplitude.

Despite the large number of studies of Hb-based O₂ carriers, the incidence of the type of modification applied to Hb on the cardiovascular function after hemodilution is poorly documented. Therefore, we examined the effects of three human Hb solutions: dextran-benzene-tetracarboxylate-conjugated Hb (Dex-BTC-Hb), $\alpha\alpha$ -Hb, and *o*-raffinose-polymerized Hb (PolyHb) after acute isovolemic hemodilution, compared with albumin (Alb), a solution used in clinical practice for intravenous volume replacement. Hemodynamic parameters and vascular resistance (VR) were examined periodically during the first 3 h. We also measured the variations in aortic distension, a mechanical parameter of conductance vessels which is likely to be affected by an increase in blood pressure. In separate experiments, measurements of blood viscosity after hemodilution were performed to determine the possible impact of this rheological parameter on hemodynamic changes.

METHODS

Animals and anesthesia. Thirty male New Zealand White rabbits (La Garenne, Villey Saint-Etienne, France), which weighed 2.7 ± 0.3 kg, were anesthetized with ketamine (Ketalar 50, Parke-Davis, France; 50 mg/kg im) and pentobarbital sodium (Sanofi, France; 40 mg/kg iv, followed by infusion

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

at $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in the right ear marginal vein). The rabbits were placed in the dorsal decubitus position on a heating table, and they were warmed to maintain a constant body temperature. The trachea was intubated, and the animal spontaneously breathed room air. At the end of the experiments, the animals were killed by excess dose of pentobarbital sodium. The study design was approved by the Animal Protection Bureau of the French Ministry for Fishing, Agriculture, and Food, and the experiments were conducted in accordance with the *Guiding Principles for Research Involving Animals*.

Surgery and instrumentation. The left femoral artery was exposed, and a directional, pulsed, Doppler flow probe (DBF-120A, Crystal Biotech, Holliston, MA) was placed on it. The right femoral artery was cannulated with a heparin-filled polyethylene catheter (0.56 mm ID) that was advanced in the abdominal aorta for arterial pressure measurements and blood collection. After a midline laparotomy was performed, the abdominal aorta was carefully exposed 2 cm above the emergence of the catheter. A directional, pulsed, Doppler flow probe (HDP-120A, Crystal Biotech) and a single-crystal transducer designed to measure the absolute arterial diameter, within a range of 1–12 mm and with a resolution of 0.01 mm (DMT-120-CP, Crystal Biotech), were placed on the vessel. Saline ($10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ iv) was infused by the right ear marginal vein to maintain fluid after the laparotomy.

Data acquisition. The femoral arterial catheter was connected to a pressure transducer (Viggo-Spectramed, Paris, France) to measure the pulsatile arterial pressure. The aortic and femoral arterial flow probes were connected to 20-MHz modules with pulse-repeated frequency of 125 kHz (PD-20, Crystal Biotech) to measure the blood flow, as reported by Haywood et al. (10). The crystal was connected to a 20-MHz echo-tracking module (WT-20, Crystal Biotech) to measure the aorta diameter in millimeters. The blood flow and echo-tracking modules were connected to a dedicated amplifier (CBI-8000, Crystal Biotech). The pressure transducer and the amplifier were connected to a personal computer for on-line data acquisition at a rate of 75 Hz (Acqknowledge + MP100 hardware and software, Biopac Systems, Goleta, CA).

Acute isovolemic hemodilution. The rabbits were randomly allocated to experimental groups in which hemodilution was performed with human Alb ($n = 8$) or with Dex-BTC-Hb ($n = 8$), $\alpha\alpha$ -Hb ($n = 8$), or PolyHb ($n = 6$). After instrumentation was completed, the animals were allowed to equilibrate during a 1-h baseline period. Hemodilution with one of the solutions described below was then initiated by partial-exchange transfusion to achieve a final Hct of $\sim 28\%$. Blood was withdrawn at 100 ml/h with a syringe pump (Vial Médical SE 400, Saint-Martin-le-Vinoux, Grenoble, France) connected to the femoral arterial catheter. The solutions were infused at the same rate with a reciprocating syringe pump (Vial Médical SE 400) by the right ear marginal vein. The exchange transfusion was achieved in ~ 50 min, and the end of the infusion was considered as time point $t = 0$.

Blood samples and hematologic parameters. Blood samples consisting of $750 \mu\text{l}$ were collected at the end of the baseline period and at various time points ($t = 5, 60, 120,$ and 180 min), and they were replaced by an equal volume of saline. Blood samples were used for Hct determination, pH, and analysis of blood gases (ABL2, Radiometer, Copenhagen, Denmark) as well as blood and plasma total Hb concentrations (Hb_{tot}; Co-oximeter 482, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). Because blood was collected by the femoral arterial catheter, measurements of arterial pressure were discontinued during the collection procedure.

Solutions. Human Alb (5 g/dl) dissolved in Tyrode medium (in mM: 6.7 glucose, 140 Na⁺, 5.0 K⁺, 2.5 Ca²⁺, 1.1 Mg²⁺, 115.8 Cl⁻, 0.8 phosphates, 30.0 carbonates) was supplied by Pasteur-Mérieux Sérums & Vaccins (Marcy l'Etoile, France). The Alb solution was sterile and pyrogen free. Dex-BTC-Hb consists of 8.5 g/dl of human Hb extracted from outdated red blood cells and conjugated to a macromolecular allosteric effector, dextran-benzene-tetracarboxylate. Dex-BTC-Hb was produced in collaboration with Pasteur-Mérieux Sérums & Vaccins, according to the protocol previously described, and was suspended in Tyrode medium (pasteurized, sterile, pyrogen free) and then frozen at -20°C without preservatives (17, 22). $\alpha\alpha$ -Hb (from the US Army) consists of 8.2 g/dl of heat-treated human Hb obtained from outdated red blood cells, stabilized by cross-linking between the two α -subunits with bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate, suspended in Ringer lactate, and frozen at -80°C (28). PolyHb consists of a 10 g/dl pasteurized solution of human Hb extracted from outdated red blood cells, cross-linked internally with raffinose, and polymerized to form PolyHb (11, 12). PolyHb was suspended in lactated Ringer injection [US Pharmacopoeia (in mM: 123.9–137.0 Na⁺, 3.6–4.4 K⁺, 1.2–1.5 Ca²⁺, 103.9–115.2 Cl⁻, 25.7–29.0 lactate)] and was frozen at -80°C without preservatives. PolyHb was generously provided by Hemosol (Etobicoke, Ontario, Canada).

Each of the solutions had low endotoxin levels, and their mean physicochemical characteristics are described in Table 1.

In vitro viscosity measurements. The kinematic viscosity of Alb, Dex-BTC-Hb, $\alpha\alpha$ -Hb, and PolyHb was determined at 37°C with an automatic capillary viscometer (module V, Amtec, Villeneuve-Loubet, France) and expressed in centistokes (Table 1). The principle of the instrument is to measure automatically the flowing time of a solution in a capillary between two points that are optically defined. The measurement of this time is equivalent to the measurement of the kinematic viscosity.

Ex vivo viscosity measurements. In separate experiments, 25 male New Zealand White rabbits weighing 2.4–2.7 kg (La Garenne) were used. While the animals were under general anesthesia with 1% halothane (Belamont, France) mixed in 95% O₂-5% CO₂, a polyethylene tube was inserted into the right carotid artery and tunneled subcutaneously to emerge at the top of the back. The animals were treated with

Table 1. Physicochemical characteristics of solutions used for hemodilution

Solution	Protein Concentration, g/dl	Molecular Mass, kDa	P ₅₀ , mmHg	Kinematic Viscosity, cSt	Oncotic Pressure, mmHg	Osmolality, mosmol/l	MetHb Content, %	Endotoxin Level, EU/ml
Albumin	5.0	68		0.92	25	300		<0.5
Dex-BTC-Hb	8.5	64–500	23	2.11	40	280	<5	<0.5
$\alpha\alpha$ -Hb	8.2	64	29.5	0.97	34.5	280	<5	0.25
PolyHb	10.0	64–500	34	1.24	26	280–300	<10	0.06

Dex-BTC-Hb, dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin (lot 94PS235); $\alpha\alpha$ -Hb, $\alpha\alpha$ -cross-linked Hb (lot 950404-00-X); PolyHb, α -raffinose polymerized Hb (lot 95HM0404); P₅₀, oxygen half-saturation pressure of Hb measured at 37°C ; MetHb, methemoglobin. Kinematic viscosity was determined at 37°C with an automatic capillary viscometer (module V, Amtec, France).

penicillin (200,000 U/kg im) and were allowed a recovery period of 1 day before experiments. On the day of experiments, the animals received heparin (150 U/kg iv); 5 min later, an exchange transfusion was performed to decrease Hct to 28%. In these experiments, Alb, Dex-BTC-Hb, α -Hb, and PolyHb ($n = 5$, each) were used for hemodilution. The whole blood and the blood + solution mixtures were collected with 5% EDTA (wt/vol). The viscosity was determined 5 min after the end of exchange transfusion, at 37°C, by using a Couette viscometer (Low Shear 30, Contraves, Zurich, Switzerland) for shear rates ranging from 0.5 to 128 s⁻¹ and expressed in millipascals per second. For determination of control blood viscosity, the Hct was adjusted to 40 and 30% ($n = 5$ each) by addition or subtraction of autologous plasma.

Data analysis. Mean arterial pressure (MAP) was calculated as $[1/3 (\text{systolic pressure} - \text{diastolic pressure}) + \text{diastolic pressure}]$. Heart rate (HR) was calculated from the aortic blood flow signal as the reciprocal between two consecutive systolic peaks. VR was calculated as $\text{MAP}/\text{aortic blood flow}$. Aortic distension was expressed as the difference between the aortic systolic and diastolic diameters for each beat. MAP, HR, aortic blood flow, aortic distension, VR, and femoral blood flow are expressed as means \pm SE. Statistical comparisons were made before hemodilution and at posthemodilution time points ($t = 5, 30, 60, 120$, and 180 min) for each group by using an analysis of variance for repeated measures. Comparisons between groups were made for each time point by using an analysis of variance for repeated measures with Dunn-Bonferroni correction. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Hematological results. Hct decreased similarly in each group after exchange transfusion (from 41.4 ± 2.7 to $28.8 \pm 1.6\%$; $P < 0.05$) and was stable for the 3 h of experiments (Fig. 1A).

Hemodilution led to a decrease in blood Hb_{tot} which was significant in the Alb group (Fig. 1B). Hb appeared in plasma immediately after exchange transfusion with the three Hb solutions, and plasma Hb_{tot} decreased with time (Fig. 1C).

The order of the kinematic viscosity of the solutions measured in vitro was Dex-BTC-Hb > PolyHb \approx α -Hb > Alb (Table 1). At 5 min after exchange transfusion, marked differences were found in blood viscosity at low shear rates; blood hemodiluted with Dex-BTC-Hb exhibited a higher viscosity than blood hemodiluted with α -Hb, PolyHb, and Alb, respectively (Fig. 2). In contrast, at high shear rates, the viscosity values were similar between the groups.

No major changes in arterial blood gases and pH were found after exchange transfusion; this indicates that the acid-base status and oxygenation were well maintained all through the experiments (Table 2).

Effects of hemodilution with Alb. Hemodilution with Alb caused a progressive decrease in MAP of 12–25% and had no effect on HR (Fig. 3). Aortic blood flow decreased by 26% at $t = 180$ min, and femoral arterial blood flow increased by 33% after 120 min (Fig. 4). VR decreased (20%) after 30 min (Fig. 5). Aortic distension significantly increased by 20% in the first 30 min after exchange transfusion (Fig. 5).

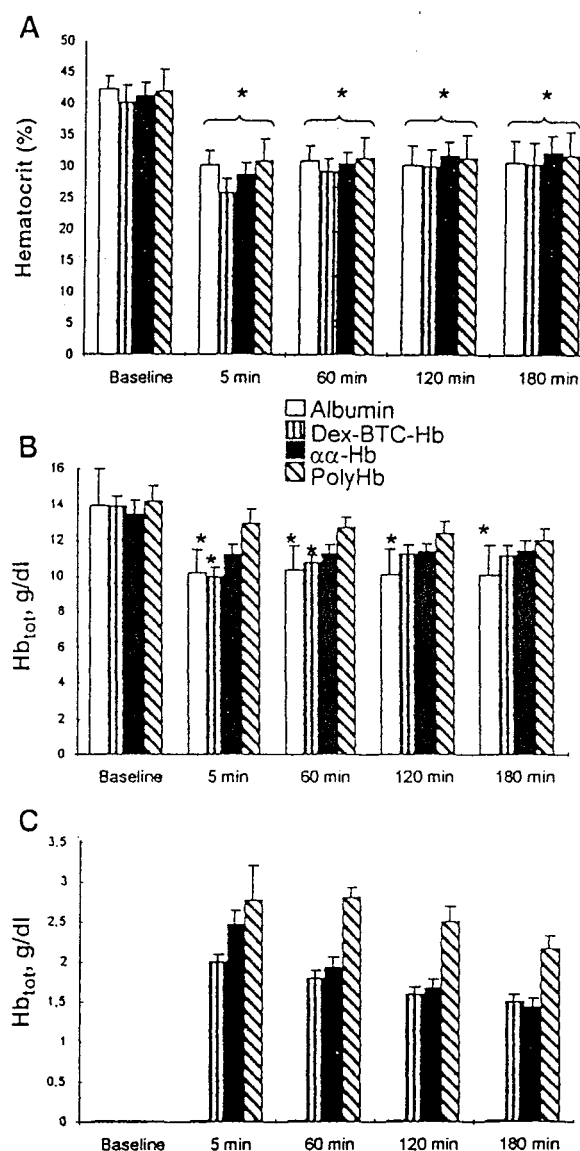


Fig. 1. Variations of hematocrit (Hct; A), blood total hemoglobin (Hb_{tot}; B), and plasma Hb_{tot} (C) after exchange transfusion with albumin ($n = 8$ rabbits), dextran-benzene-tetracarboxylate Hb (Dex-BTC-Hb; $n = 8$ rabbits), α -cross-linked Hb (α -Hb; $n = 8$ rabbits), and σ -raffinose-polymerized Hb (PolyHb; $n = 6$ rabbits). Values are means \pm SE. *Significant difference, posthemodilution vs. baseline within groups; $P < 0.05$. No symbol indicates no difference between groups.

Effects of hemodilution with Dex-BTC-Hb. Dex-BTC-Hb induced an increase in MAP (37% maximum) in the 3 h after exchange transfusion; MAP values were significantly higher than in the Alb group (Fig. 3). A 12% decrease in HR was observed 5 min after exchange transfusion, and HR was not different from baseline value after this time (Fig. 3). Aortic blood flow increased by 35% 5 min after hemodilution, thereafter the values were not different from those of the other groups (Fig. 4). Femoral arterial blood flow decreased between 30 and 120 min (25–40%) after exchange transfusion (Fig.

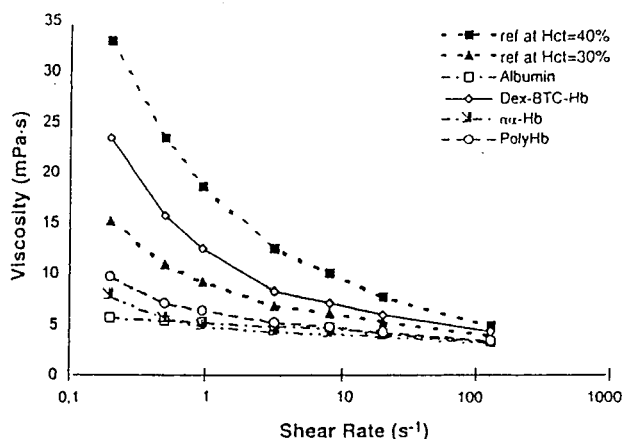


Fig. 2. Plot of whole blood viscosity (mPa·s) vs. shear rate (s^{-1}) determined in rabbit blood samples collected 5 min after end of exchange transfusion with albumin, Dex-BTC-Hb, $\alpha\alpha$ -Hb, and PolyHb. Bold lines, mean values obtained from all control samples, both after adjustment of Hct at 30 and 40%. Data points are mean of 5 experiments.

4). VR progressively increased (40–60%) after 30 min and was higher than in the Alb group (Fig. 5). Aortic distension decreased by 25% in the first 60 min after hemodilution and was lower than in the Alb group all through the experiments (Fig. 5).

Effects of hemodilution with $\alpha\alpha$ -Hb. MAP increased by 35% for the 3 h after hemodilution with $\alpha\alpha$ -Hb compared with baseline value (Fig. 3) and was higher than in the Alb group. HR and femoral arterial blood flow remained unchanged after exchange transfusion (Fig. 3 and 4). A significant decrease (35%) in aortic blood flow was observed at $t = 180$ min (Fig. 4). VR progressively increased (by 30–90%) after exchange transfusion and was higher than in the Alb group all

Table 2. Variations of blood-gas values after exchange transfusion with albumin, Dex-BTC-Hb, $\alpha\alpha$ -Hb, and PolyHb

Time	Albumin	Dex-BTC-Hb	$\alpha\alpha$ -Hb	PolyHb
<i>pH</i>				
Baseline	7.34 ± 0.03	7.35 ± 0.03	7.33 ± 0.02	7.33 ± 0.02
5 min	7.35 ± 0.04	7.36 ± 0.02	7.36 ± 0.03	7.34 ± 0.04
60 min	7.34 ± 0.04	7.36 ± 0.04	7.36 ± 0.02	7.35 ± 0.03
120 min	7.32 ± 0.05	7.32 ± 0.04	7.35 ± 0.02	7.35 ± 0.03
180 min	7.32 ± 0.05	7.29 ± 0.04	7.35 ± 0.02	7.35 ± 0.02
<i>PO₂, Torr</i>				
Baseline	89.98 ± 7.15	95.96 ± 9.24	92.10 ± 7.56	86.70 ± 9.90
5 min	93.52 ± 8.01	108.94 ± 12.88	87.38 ± 15.18	81.55 ± 7.45
60 min	90.03 ± 6.32	105.11 ± 9.35	89.38 ± 4.90	87.25 ± 8.15
120 min	93.20 ± 5.97	100.97 ± 7.14	86.84 ± 6.29	93.10 ± 10.50
180 min	97.30 ± 8.93	106.33 ± 8.67	85.26 ± 11.53	89.45 ± 9.45
<i>PCO₂, Torr</i>				
Baseline	44.12 ± 5.28	41.21 ± 5.61	45.04 ± 4.15	35.75 ± 4.95
5 min	43.18 ± 5.15	37.16 ± 5.35	42.12 ± 5.18	45.65 ± 4.45
60 min	42.67 ± 5.10	35.14 ± 3.44	39.82 ± 4.50	35.15 ± 3.75
120 min	43.13 ± 6.14	36.77 ± 2.46	38.44 ± 4.40	33.70 ± 4.80
180 min	41.38 ± 5.98	36.41 ± 2.09	35.86 ± 1.93	30.50 ± 1.50

Values are means ± SE; albumin, $n = 8$ rabbits; Dex-BTC-Hb, $n = 8$ rabbits; $\alpha\alpha$ -Hb, $n = 8$ rabbits; PolyHb, $n = 6$ rabbits.

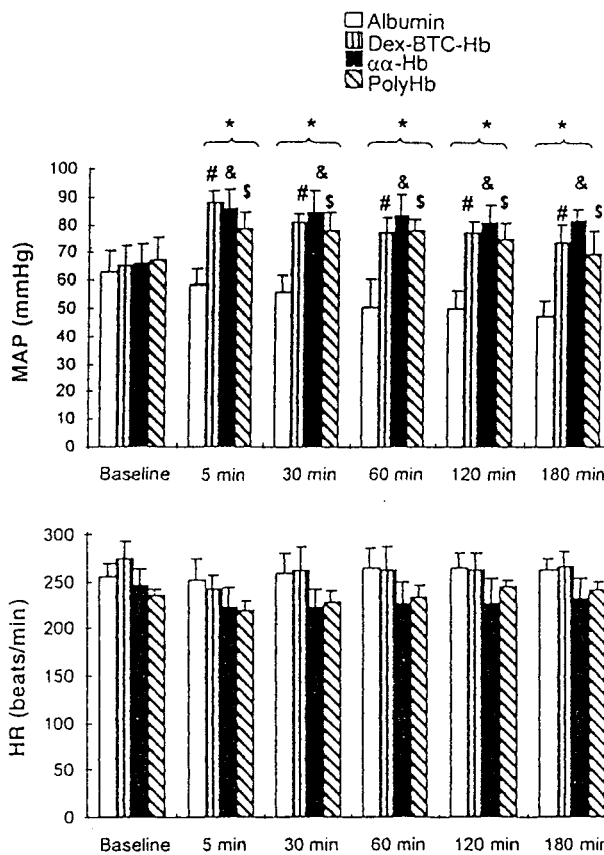


Fig. 3. Variations of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) after exchange transfusion with albumin ($n = 8$ rabbits), Dex-BTC-Hb ($n = 8$ rabbits), $\alpha\alpha$ -Hb ($n = 8$ rabbits), or PolyHb ($n = 6$ rabbits). Values are means ± SE. Significant differences, $P < 0.05$: *posthemodilution vs. baseline within groups, #Dex-BTC-Hb vs. albumin, & $\alpha\alpha$ -Hb vs. albumin, \$PolyHb vs. albumin.

through the experiments (Fig. 5). Aortic distension slightly decreased compared with baseline (Fig. 5).

Effects of hemodilution with PolyHb. MAP increased after hemodilution with PolyHb compared with the Alb-exchanged group, and the values were significantly different from baseline value until 180 min (Fig. 3). HR was not altered after exchange transfusion (Fig. 3). Aortic blood flow was reduced after 120 min, and femoral arterial blood flow decreased by 30% between 60 and 120 min after hemodilution (Fig. 4). VR progressively increased (25–38%) after 30 min and was higher than in the Alb group all through the experiments (Fig. 5). Aortic distension was slightly reduced compared with baseline (Fig. 5).

Comparative effects of the three Hb-based solutions. The increase in MAP was immediate in Dex-BTC-Hb and PolyHb groups, and MAP decreased with time, whereas it was stable in the $\alpha\alpha$ -Hb group (Fig. 3). Aortic blood flow was significantly higher in Dex-BTC-Hb group compared with $\alpha\alpha$ -Hb and PolyHb at $t = 5$ min, but the flow was not different after this time (Fig. 4). No statistical differences in HR, femoral arterial blood flow, and aortic distension were found between the three Hb groups at the various time points

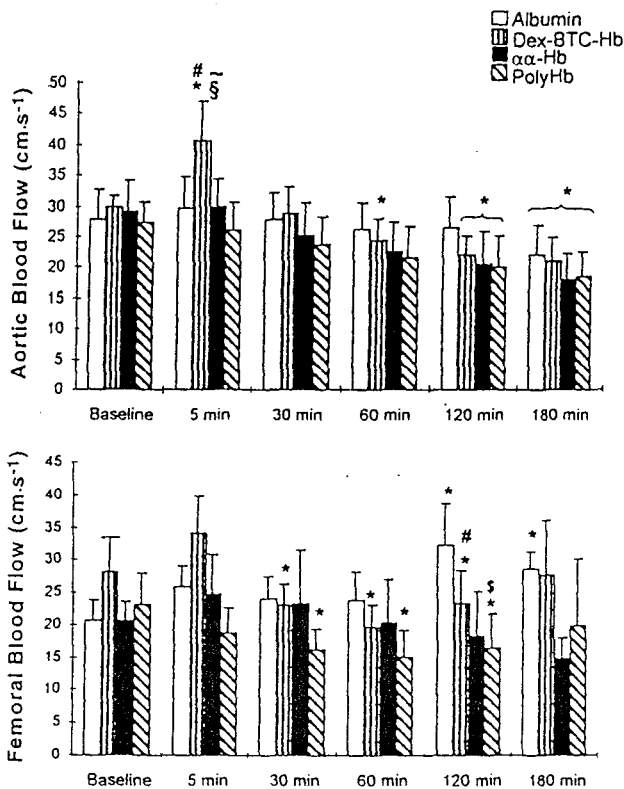


Fig. 4. Variations of aortic blood flow (top) and femoral arterial blood flow (bottom) after exchange transfusion with albumin ($n = 8$ rabbits), Dex-BTC-Hb ($n = 8$ rabbits), α -Hb ($n = 8$ rabbits), or PolyHb ($n = 6$ rabbits). Values are means \pm SE. Significant differences, $P < 0.05$: *posthemodilution vs. baseline within groups, #Dex-BTC-Hb vs. albumin, & α -Hb vs. albumin, \$PolyHb vs. albumin, ~Dex-BTC-Hb vs. PolyHb.

(Figs. 3–5). Although no significant differences were found in VR, the increments were different in the groups (Fig. 5). There was a progressively rising trend in the Dex-BTC-Hb and α -Hb groups at each time point, whereas VR increased until 60 min and was stable thereafter in the PolyHb group.

DISCUSSION

We examined the cardiovascular effects of three human Hb solutions that were undergoing preclinical or clinical evaluation: Dex-BTC-Hb (preclinical evaluation), and α -Hb and PolyHb (clinical evaluation). The possible influence of the type of chemical modification applied to Hb was assessed in an exchange-transfusion protocol that led to a reduction in Hct from 41 to 28%. The model we chose did not aim at being a clinical model but was intended to permit a comparative study of cardiovascular parameters after hemodilution. An important point to consider was to have a reduction in Hct that was similar among the experimental groups to allow valid comparisons of blood flow measurements. Blood flow is indeed directly proportional to blood viscosity, and, therefore, to Hct (2) as indicated by Poiseuille-Hagen equation

$$\dot{Q} = \Delta P \cdot \pi \cdot r^4 / 8 \eta \cdot L$$

where \dot{Q} is blood flow, ΔP is the pressure difference, η is blood viscosity, and r and L are vessel radius and length, respectively.

The contribution of O₂-transport parameters and acid-base status to hemodynamics was comparable in the experimental groups, because no changes in arterial blood gases and pH were observed after hemodilution (Table 2). Blood Hb_{tot} content was above 10 g/dl (Fig. 1), the commonly accepted threshold at which oxygenation is correctly maintained. Moreover, the low endotoxin levels of the infused solutions make it possible to assume that the animals did not react to this parameter. Thus we can assume the cardiovascular changes observed with Hb solutions are related to their vasoactive and/or hemorheological effects.

Comparative effects of Alb and Hb solutions. Human Alb was used as a control solution because it has a viscosity similar to that of plasma and most Hb solutions presently undergoing clinical tests. The cardiovascular responses to hemodilution with non-O₂-carrying and Hb solutions have been extensively characterized. Unlike the case with Hb solutions, hemodilution with volume-replacement solutions devoid of O₂-carrying capacity increases cardiac output by a compensatory

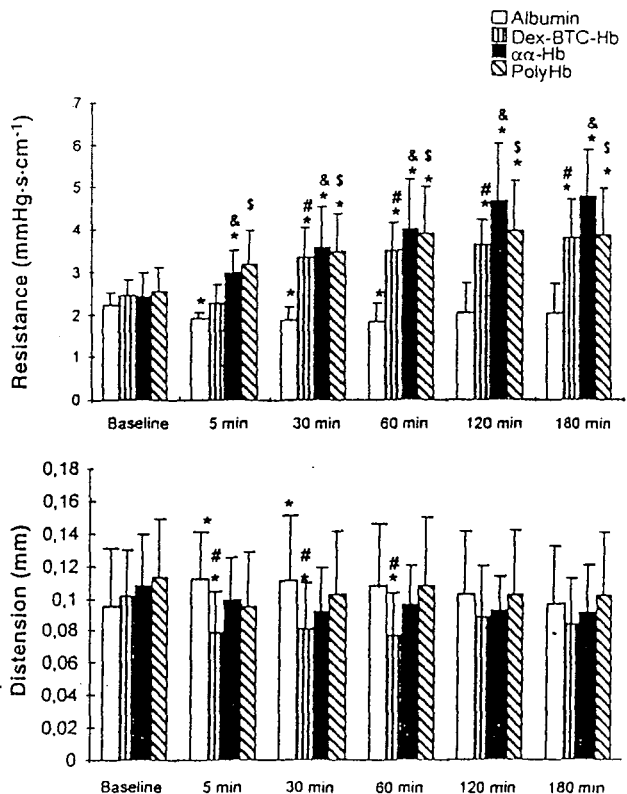


Fig. 5. Variations of vascular resistance and aortic distension after exchange transfusion with albumin ($n = 8$ rabbits), Dex-BTC-Hb ($n = 8$ rabbits), α -Hb ($n = 8$ rabbits), or PolyHb ($n = 6$ rabbits). Values are means \pm SE. Significant differences, $P < 0.05$: *posthemodilution vs. baseline within groups, #Dex-BTC-Hb vs. albumin, & α -Hb vs. albumin, \$PolyHb vs. albumin.

mechanism that aims at maintenance of O_2 delivery at prehemodilution values (27). In clinical practice, such as cardiopulmonary bypass, hemodilution is conducted to reach a final Hct of <30% (3, 5, 27). In our protocol, we did not measure absolute cardiac output, but it was estimated by aortic blood flow. We did not find major differences in aortic blood flow between the Alb and Hb groups, although Hct was reduced to ~28%, nor did we find any major difference in HR.

Blood viscosity reduction has been proposed as the major factor responsible for the increase in cardiac output with non- O_2 -carrying solutions rather than decreased O_2 delivery (27). In a recent study, Dietz et al. (6) compared the effects of Alb and $\alpha\alpha$ -Hb in a partial-exchange transfusion model in which blood viscosity changes were similar with both solutions. They concluded that the vasoconstricting properties of the Hb solution had a greater effect on vasculature than blood viscosity. Our viscosity measurements are consistent with these findings: at high shear rates, reflecting the rheological behavior of blood in the conductance vessels, such as the abdominal aorta, the viscosity of hemodiluted blood was similar for Alb and Hb, despite differences in the proper viscosity of the solutions (Fig. 2, Table 1). In contrast, at low shear rate values (0.5–5 s^{-1}), reflecting the hemorheological behavior in the small vessels, the viscosity of hemodiluted blood is highly dependent on the viscosity of the solutions (Fig. 2). The beneficial effect of the low viscosity of Hb solutions in the microcirculation is of great interest, because these solutions could thus improve oxygenation more efficiently than whole blood in ischemic tissues (3, 20, 21). But the improvement of oxygenation due to viscosity reduction could also induce vasoactive responses by autoregulation mechanisms, as proposed by Intaglietta et al. (13).

We observed major differences between Alb and Hb groups in MAP, VR, and aortic distension; these differences are related to the vasoactive properties of the solutions. MAP and VR decreased after exchange transfusion with Alb, whereas Hb solutions increased both MAP and VR. The VR, calculated in our experiments as the ratio of MAP to aortic blood flow, describes the vascular bed distal to the location of the flowmeter (i.e., the abdominal aorta). The rise in VR after Hb infusion in the three groups confirms the vasoconstricting effect of these solutions, which led to increased pressure (1, 6–8, 14, 20, 27). In contrast, the decrease in VR and MAP in the Alb-hemodiluted group indicates that hemodilution with a solution without vasoconstrictor properties (Alb) evokes vasodilation, as previously reported (6). Aortic distension was expressed as the difference between systolic and diastolic aorta diameter as measured with an echo-tracking device. In our experimental model, aortic distension was reduced in the three groups of animals hemodiluted with Hb compared with Alb-hemodiluted animals for the first 60 min after exchange transfusion (Fig. 5). In contrast, the transient increase in aortic distension after hemodilution with Alb may be due to decreased blood pressure. Although we did not measure the absolute distensibility [the

property of conductance vessels which contribute to propagate the pressure pulse and to buffer stroke volume [expressed as $\Delta\text{diameter}/(\text{diameter} \times \Delta\text{pressure})$] (16)], we can assume that the changes in aortic distension after Hb infusion are caused by increased wall stress elicited by increased blood pressure.

As discussed above, the impact of the viscosity of Alb and Hb solutions was similar at the macrohemodynamic level; thus the alterations in MAP, VR, and aortic distension can basically be attributed to the Hb-induced vasoconstriction. Many mechanisms have been proposed to explain the vasoconstrictor action of Hb: 1) inhibition of the NO-dependent vascular smooth muscle relaxation by NO-scavenging action of free Hb (4, 9, 14, 15, 23), 2) sensitization of α -adrenergic receptors (7, 26), 3) involvement of endothelin (8), and 4) increase in microcirculation vascular tone as a response to increased blood O_2 -carrying capacity (13, 20, 21).

Comparison of Dex-BTC-Hb, $\alpha\alpha$ -Hb, and PolyHb effects. The three solutions were prepared from human Hb that was extracted from outdated banked red blood cells according to specific protocols previously described (11, 12, 22, 28). The three Hb solutions are isosmolar to plasma, but each solution has specific physicochemical properties, the contribution of which to the hemodynamic effects cannot be absolutely defined (Table 1). There is a clear difference in oncotic pressure between Dex-BTC-Hb and $\alpha\alpha$ -Hb vs. PolyHb that would differentially affect the plasma volume expansion ability of the solutions (18). This could explain at least in part the large increase in aortic blood flow after administration of Dex-BTC-Hb, as a result of an increase in preload. However, the colloid oncotic pressure measured in vitro is only an approximation of the oncotic behavior of the macromolecules in vivo, and the exact quantitative effect is unknown.

The Hb concentration was similar for Dex-BTC-Hb and $\alpha\alpha$ -Hb, (administered dose, 3.1 g) and was higher for PolyHb (administered dose, 3.7 g). The concentration of plasma Hb was dose dependent, because it was higher in PolyHb group vs. Dex-BTC-Hb and $\alpha\alpha$ -Hb (Fig. 1C). The plasma retention times, estimated from the data shown in Fig. 1C, indicated that $\alpha\alpha$ -Hb had a shorter half-life (~4 h) than Dex-BTC-Hb (~6 h) and PolyHb (~7 h) in this experimental model. Despite these differences, we could have expected that the impact of the dose administered on the blood pressure was similar, because only a small dose of free Hb is necessary to achieve maximal pressor effect immediately (plateau effect). The three Hb solutions induced a significant increase in MAP, with specific increments for each of the solutions (Fig. 3). Dex-BTC-Hb and $\alpha\alpha$ -Hb induced a significant rise in MAP compared with preexchange values for 3 h, whereas the increase with PolyHb was no longer significant after 2 h. There was also a progressive rising trend in the VR in Dex-BTC-Hb and $\alpha\alpha$ -Hb groups, whereas VR increased until 60 min and was stable thereafter in the PolyHb group (Fig. 5). In contrast, statistical comparisons indicated that Dex-BTC-Hb, $\alpha\alpha$ -Hb, and PolyHb had similar acute effects on HR, aortic blood flow, femoral blood flow, and aortic distension (Figs. 3–5).

As discussed previously, despite large differences in viscosity between Dex-BTC-Hb vs. $\alpha\alpha$ -Hb and PolyHb (Table 1), the rheological properties of the Hb solutions had limited impact on the hemodynamic changes (Fig. 2). The differences in the pressor action elicited by the solutions could instead be attributed to the specific permeability characteristics of the modified Hbs. The NO-scavenging action and the role it plays in inhibiting vasodilator mechanisms are indeed thought to be related to the leakage of Hb across the endothelial barrier into the space directly surrounding the smooth muscle cells (1, 19). The polymerization of Hb, aiming to increase its molecular size, would hence result in an impaired penetration into the vascular wall (1, 19) and could explain the limited vasoconstricting action of PolyHb compared with $\alpha\alpha$ -Hb and Dex-BTC-Hb. The structural modification of the heme pocket induced by the chemical modifications applied to Hb, and thereby the changes in affinity of the heme moiety for NO, is another factor likely to be involved in the different cardiovascular effects of the solutions. The accessibility to the $\beta 93$ cysteine residue of the globin, known to react with NO and thus to contribute to its transport by Hb (14), may also be different from one solution to another, thus resulting in different vasoactive effects. The interaction of Hb with other regulatory elements involved at the vascular wall level (endothelin, α -adrenergic receptors) could also be specific to the type of modification applied to Hb and requires further investigation.

In summary, Dex-BTC-Hb, $\alpha\alpha$ -Hb, and PolyHb have specific vasoactive effects, but in regard to the multiple parameters possibly involved, the proper action of the chemical modification is difficult to establish in vivo. The contribution of viscosity to the macrohemodynamic changes induced seems, however, to be blunted by the vasoconstricting properties of Hb solutions.

We are grateful to Hemosol, Inc., for supplying *o*-raffinose polymerized hemoglobin. Calculations were performed with software developed by Michel Dubuit (Centre Interuniversitaire de Ressources Informatiques de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France).

This research was supported in part by the Association Recherche et Transfusion, Paris, France.

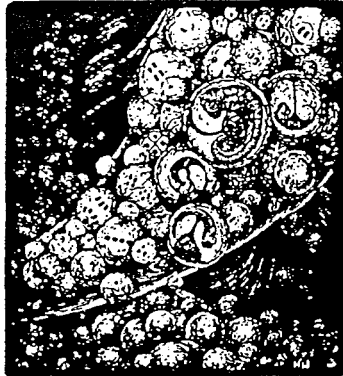
Address for reprint requests: A. Caron, Laboratoire d'Hématologie et de Physiologie, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, 54001 Nancy cedex, France (E-mail: caron@pharma.u-nancy.fr).

Received 8 April 1998; accepted in final form 5 October 1998.

REFERENCES

- Abassi, Z., S. Kotob, F. Pieruzzi, M. Abouassali, H. R. Keiser, J. C. Fratantoni, and A. I. Alayash. Effects of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 129: 603-610, 1997.
- Birchard, G. F. Optimal hematocrit: theory, regulation and implications. *Am. Zool.* 37: 65-72, 1997.
- Cole, D. J., J. C. Drummond, P. M. Patel, J. C. Nary, and R. L. Applegate. Effect of oncotic pressure of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) on brain injury after temporary focal cerebral ischemia in rats. *Anesth. Analg.* 83: 342-347, 1996.
- Collins, P., J. Burman, H. I. Chung, and K. Fox. Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries in vivo. *Circulation* 87: 80-85, 1993.
- Cooper, J. R., and S. Slogoff. Hemodilution and priming solutions for cardiopulmonary bypass. In: *Cardiopulmonary Bypass: Principles and Practice*, edited by G. P. Gravlec, R. F. Davis, and J. R. Utley. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1993. p. 124-137.
- Dietz, N. M., C. M. Martin, A. G. Beltran-del-Rio, and M. J. Joyner. The effects of cross-linked hemoglobin on regional vascular conductance in dogs. *Anesth. Analg.* 85: 265-273, 1997.
- Gulati, A., and S. Rebello. Role of adrenergic mechanisms in the pressor effect of diaspirin cross-linked hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 124: 125-133, 1994.
- Gulati, A., A. P. Sen, A. C. Sharma, and G. Singh. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am. J. Physiol.* 273 (Heart Circ. Physiol. 42): H827-H836, 1997.
- Hart, J. L., M. A. Ledvina, and S. M. Muldoon. Actions of diaspirin cross-linked hemoglobin on isolated rat and dog vessels. *J. Lab. Clin. Med.* 129: 356-363, 1997.
- Haywood, J. R., R. A. Schaffer, C. Fastenow, G. D. Fink, and M. J. Brody. Regional blood flow measurement with pulsed Doppler flowmeter in conscious rat. *Am. J. Physiol.* 241 (Heart Circ. Physiol. 10): H273-H278, 1981.
- Hsia, J. C. *Pasteurizable, freeze-storable hemoglobin-based blood substitute*. US Pat. 4,857,636. 15 Aug. 1989.
- Hsia, J. C. *o*-Raffinose polymerized hemoglobin as a red blood cell substitute (Abstract). *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.* 19: 402, 1991.
- Intaglietta, M., P. C. Johnson, and R. M. Winslow. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc. Res.* 32: 632-643, 1996.
- Jia, L., C. Bonaventura, J. Bonaventura, and J. S. Stamler. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380: 221-226, 1996.
- Kim, H. W., and A. G. Greenburg. Hemoglobin mediated vasoactivity in isolated vascular rings. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 23: 303-309, 1995.
- Marchais, S. J., A. P. Guerin, B. Pannier, G. Delavaud, and G. M. London. Arterial compliance and blood pressure. *Drugs* 46, Suppl. 2: 82-87, 1993.
- Menu, P., B. Faivre, P. Labrude, P. Riffard, M. Grandgeorge, and C. Vigneron. Human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran as a potential red blood cell substitute. II. Pharmacotoxicological evaluation. *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.* 22: 551-558, 1994.
- Migita, R., A. Gonzales, M. L. Gonzales, K. D. Vandegriff, and R. Winslow. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J. Appl. Physiol.* 82: 1995-2002, 1997.
- Nakai, K., T. Ohta, I. Sakuma, K. Akama, Y. Kobayashi, S. Tokuyama, A. Kitabatake, Y. Nakazato, T. A. Takahashi, and S. Sadayoshi. 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.
- Nolte, D., A. Botzlar, S. Pickelmann, E. Bouskela, and K. Messmer. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 130: 314-327, 1997.
- Nolte, D., P. Steinhauser, S. Pickelmann, S. Berger, R. Härtl, and K. Messmer. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on local tissue oxygen tension in striated skin muscle: an efficacy study in the hamster. *J. Lab. Clin. Med.* 130: 328-338, 1997.
- Prouchayret, F., G. Fasan, M. Grandgeorge, C. Vigneron, P. Menu, and E. Dellacherie. A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. I. Preparation, purification and characterization. In: *Blood Substitutes and Oxygen Carriers*, edited by T. M. S. Chang. New York: Dekker, 1993. p. 144-147.
- Rioux, F., G. Drapeau, and F. Marceau. Recombinant human hemoglobin (rHb1.1) selectively inhibits vasorelaxation elicited by nitric oxide donors in rabbit isolated aortic rings. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25: 587-594, 1995.
- Rohlf, R. J., E. Bruner, A. Chiu, A. Gonzales, M. L. Gonzales, D. Magde, M. D. Magde, Jr., K. D. Vandegriff, and

- R. M. Winslow. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 273: 12128-12134, 1998.
25. Scott, M. G., D. F. Kucik, L. T. Goodnough, and T. G. Monk. Blood substitutes: evolution and future applications. *Clin. Chem.* 43: 1724-1731, 1997.
26. Sharma, A. C., and A. Gulati. Yohimbine modulates d aspirin crosslinked hemoglobin-induced systemic hemodynamics and regional circulatory effects. *Crit. Care Med.* 23: 874-884, 1995.
27. Spahn, D. R., B. J. Leone, J. G. Reves, and T. Pasch. Cardiovascular and coronary physiology of acute isovolemic hemodilution: a review of nonoxygen-carrying and oxygen-carrying solutions. *Anesth. Analg.* 78: 1000-1021, 1994.
28. Winslow, R. M., and K. W. Chapmann. Pilot scale preparation of hemoglobin solutions. In: *Methods in Enzymology. Hemoglobins, Biochemical and Analytical Methods*, edited by J. Everse, K. D. Vandegriff, and R. M. Winslow. Orlando, FL: Academic, 1994, vol. 231, part B, p. 3-16.



Les hémoglobines érythrocytaires, plasmatiques et substitutives face aux agents oxydants et réducteurs physiologiques

B. Faivre-Fiorina
A. Caron
P. Labrude
C. Vigneron

Résumé. L'oxydation de l'hémoglobine est normale et constante dans les globules rouges comme dans tout autre milieu biologique. Si les connaissances actuelles des mécanismes qui régissent l'état d'oxydation de ce transporteur d'oxygène permettent de traiter la plupart des méthémoglobinémies acquises et quelques méthémoglobinémies constitutionnelles, ces connaissances sont insuffisantes pour optimiser l'utilisation de substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine comme le démontrent quelques travaux précliniques sur l'oxydation de ces substituts *in vivo* dans le plasma. Cette revue fait le point sur les différents mécanismes d'auto-oxydation et d'oxydation de l'hémoglobine dans les globules rouges et dans le plasma par les différents agents oxydants endogènes (anions peroxyde nitrite, oxyde nitrique, anions superoxyde, peroxyde d'hydrogène), elle souligne les différentes espèces oxygénées radicalaires ou non (radicaux superoxyde et hydroxyl, peroxyde d'hydrogène) résultant de l'oxydation de l'hémoglobine ainsi que les mécanismes physiologiques et thérapeutiques susceptibles de prévenir ou de réduire les différents états d'oxydation (HbFe³⁺, HbFe²⁺) de l'hémoglobine dans le sang. L'état d'oxydation de l'hémoglobine dans le sang est le résultat de phénomènes très complexes et s'il apparaît que l'organisme lutte contre la formation de méthémoglobine, forme impropre au transport de l'oxygène, l'oxydation de l'hémoglobine est parfois nécessaire car elle offre une voie de défense contre les nombreuses formes de molécules oxydantes radicalaires ou non. Ainsi, tous ces mécanismes d'oxydation et de réduction sont étroitement liés entre eux et le taux de méthémoglobine circulante est le résultat d'une remarquable régulation de ces mécanismes.

Mots clés : Hémoglobine – Oxydation – Réduction – Érythrocytes – Substitut érythrocytaire.

Summary. Oxidation of hemoglobin is constant and normal in red blood cells and in all biological media. The knowledge of the mechanisms which manage oxidation state is perhaps sufficient to treat acquired and some hereditary methemoglobinemia. But in case of transfusional treatment with hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC), some preclinical investigations on the oxidation of these products *in vivo* in plasma showed that our knowledge was not sufficient to understand and control all oxidations which could occur. This review analyses the literature on the different mechanisms in red blood cells and plasma by which hemoglobin autooxidizes and by which endogenous oxidizing agents or their precursors (nitric oxide, peroxynitrite, superoxide, hydrogen peroxide) could oxidize it. It shows the production of different radical or non-radical oxygen species during hemoglobin autooxidation and oxidation processes and the different physiological or accessory mechanisms that could prevent or reduce the various oxidizing states of hemoglobin (HbFe³⁺, HbFe²⁺) in blood. Plasma contains a few anti-oxidizing or reducing systems but it profits by antioxidantizing and reducing activity from red blood cells. In blood, oxidation state of hemoglobin results from very complex phenomena

Laboratoire d'hématologie-physiologie,
Faculté de Pharmacie,
5, rue Albert-Lebrun, BP 403,
54001 Nancy cedex

Tirés à part : B. Faivre-Fiorina
Article reçu le 12 janvier 1998,
accepté le 14 mars 1998.

and if the body struggles against methemoglobin formation to maintain oxygen transport, the oxidation of hemoglobin is sometimes useful to protect tissues against various and numerous endogenous radical or non-radical oxidizing agents. In blood, a balance between all these oxidizing and reducing mechanisms makes it possible to regulate circulating methemoglobin rate.

Key words: Hemoglobin - Oxidation - Reduction - Erythrocytes - Blood substitute.

L'hémoglobine, dans le globule rouge ou dans le plasma, a la particularité de s'auto-oxyder ou de s'oxyder sous l'action de différents agents chimiques ou physiques endogènes ou exogènes en formant la méthémoglobine.

Cette auto-oxydation/oxydation de l'hémoglobine est normale et quotidienne. Elle est nécessaire puisqu'elle constitue la première étape du catabolisme physiologique de cette molécule dans le plasma et dans les globules rouges retournés à la moelle osseuse pour y être dégradés. En revanche, dans le globule rouge circulant, le phénomène est à l'origine d'une diminution du transport de l'oxygène et peut aboutir à des méthémoglobinémies. Pour réguler cette auto-oxydation/oxydation, le globule rouge possède de nombreux systèmes enzymatiques ou chimiques, anti-oxydants ou réducteurs, permettant de maintenir le taux de méthémoglobine circulante à une valeur voisine de 1% chez l'adulte.

Les mécanismes par lesquels l'hémoglobine s'auto-oxyde, s'oxyde et se réduit sont mal connus, tant dans le globule rouge que dans le plasma. Si les connaissances actuelles permettent cependant de traiter la plupart des méthémoglobines érythrocytaires, elles sont certainement insuffisantes pour comprendre ces mécanismes lors de l'administration de substituts sanguins transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine. Les substituts de premières générations, dont certains sont en phase IV des essais cliniques et en attente d'une autorisation de mise sur le marché, seront administrés par voie veineuse et l'hémoglobine ne disposera d'aucune protection membranaire ou enzymatique [1]. L'hémoglobine persistera dans le plasma plusieurs heures, voire plusieurs jours, puisque la demi-vie plasmatique des différentes espèces chimiques potentielles est de 8 à 24 h selon le type. Elle sera aussi à des concentrations variant de 5 à 30 g/l, soit 1 000 à 6 000 fois supérieures à l'hémoglobinémie physiologique qui est inférieure à 5 mg/l.

L'objectif de cette revue est de faire le point sur les principaux mécanismes par lesquels l'hémoglobine est susceptible de s'auto-oxyder et/ou de s'oxyder et par conséquent de perdre sa fonction oxyphorique, ainsi que sur les mécanismes physiologiques principaux ou accessoires dont dispose l'organisme pour réguler l'état d'oxydation de l'hémoglobine, que ce soit dans les globules rouges ou dans le plasma. Il est à noter par ailleurs que, dans la littérature traitant de l'auto-oxydation/oxydation de l'hémoglobine, il est souvent fait une confusion entre les réactions concernant les monomères ou les tétramères ; or, selon que l'on considère les uns ou les autres, les mécanismes d'auto-oxydation/oxydation diffèrent.

La structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine de l'adulte (Hb) est une chromoprotéine constituée de quatre sous-unités (α, β), composées chacune d'une fraction protéique, la globine, de type α (141 acides aminés) ou de type β (146 acides aminés) et d'un centre actif, l'hème. Celui-ci, formé d'une protoporphyrine IX et d'un atome de fer ferreux apolaire, est logé dans une poche hydrophobe « aménagée » dans la globine (figure 1). L'hème est fortement lié à la globine par une liaison covalente avec l'histidine proximale F8, par des liaisons hydrogènes avec quelques acides aminés (αVal^{93} , βVal^{92}) et par environ 80 interactions hydrophobes. L'atome de fer possède six liaisons de coordination, une avec chacun des atomes d'azote des quatre noyaux pyrrole de la protoporphyrine, soit quatre liaisons avec la protoporphyrine, une avec un atome d'azote du cycle imidazole de l'histidine proximale F8 et enfin une sixième qui permet de fixer réversiblement une molécule d'oxygène diatomique en fonction de la pression partielle en oxygène (pO_2). Cette fixation est régulée par une molécule effectrice, le 2,3 diphosphoglycérate

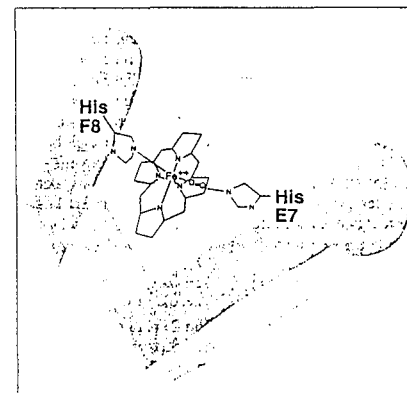


Figure 1. Les liaisons hème-globine.

(2,3 DPG), dont le site d'action est une poche située au centre du tétramère d'hémoglobine et délimitée par les quatre sous-unités. Cette molécule de 2,3 DPG régule la fixation d'une molécule d'oxygène sur chacun des quatre atomes de fer ferreux du tétramère d'hémoglobine. Les atomes de fer étant les seuls aptes à fixer l'oxygène, leur état d'oxydation est d'une importance fondamentale pour la fonction oxyphorique de l'hémoglobine.

Dans le cas des substituts sanguins à base d'hémoglobine, le tétramère a été soit extrait du globule rouge, humain ou bovin, pour subir ensuite différentes modifications chimiques, soit produit par génie génétique. Les hémoglobines ainsi obtenues sont stabilisées dans leur conformation tétramérique, ont une masse moléculaire comprise entre 64 et 400 kDa, et possèdent ainsi une demi-vie plasmatique élevée (8 à 24 h). Par ailleurs, l'affinité pour l'oxygène de l'hémoglobine extraite du globule rouge étant très fortement accrue par suite de la perte du 2,3 DPG au cours de la préparation des substituts, les modifications apportées chimiquement ou génétiquement permettent au tétramère de retrouver une affinité plus physiologique ($P_{50} = 22$ à 30 mmHg) et de présenter des caractéristiques oxyphoriques proches de celles de l'hémoglobine intra-érythrocytaire.

Les principes de l'oxydation de l'hémoglobine

L'hémoglobine est constamment exposée à l'oxydation. Celle-ci porte essentiellement sur l'atome de fer mais peut aussi concerner la molécule protéique. Nous mentionnerons plus loin la possibilité de cette oxydation de la protéine.

Bien que l'hème soit à l'abri dans sa poche hydrophobe, environnement permettant à l'atome de fer de se maintenir à l'état ferreux (Fe^{2+}) lors de l'oxygénation et de la déoxygénation, il arrive que cet atome perde un électron et passe à l'état ferrique (Fe^{3+}). L'hème est alors appelé hématine et l'hémoprotéine, méthémoglobine (metHb) mais aussi ferrihémoglobine ou encore hémiglobine.

La liaison de coordination avec l'histidine proximale F8 ne parvenant pas à neutraliser cette troisième charge positive, le fer ne peut plus fixer l'oxygène par sa sixième liaison de coordination et il devient alors capable, selon le pH, de capter une autre molécule, telle que l'eau ou un anion cyanure ou fluor, qui, à pH acide, viendra se placer entre l'atome de fer et l'histidine distale pour former respectivement l'aquaméthémoglobine, la cyanméthémoglobine ou la fluorométhémoglobine. Avec l'alcalinisation, les anions hydroxyle (OH^-) viendront se coordonner au fer ferrique pour former l'hydroxyméthémoglobine. Tous ces ligands étant liés de façon stable, une simple augmentation de la pO_2 ne pourra les déplacer. Des systèmes chimiques et enzymatiques sont donc nécessaires à leur déplacement, à la réduction du fer ferrique et au rétablissement de la capacité de l'hémoglobine à fixer et à transporter l'oxygène.

Dans le cas des substituts érythrocytaires, l'hémoglobine est supposée s'oxyder selon le même principe. Les modifications génétiques ou chimiques n'influent théoriquement pas sur celle-ci, même si ces modifications font intervenir un hydrate de carbone tels le dextrane et le raffinose, ou une enzyme réductrice ou antioxydante. La présence d'une telle enzyme pourra en revanche modifier la cinétique ou l'équilibre oxydation/réduction.

L'auto-oxydation de l'hémoglobine

Si le principe de l'oxydation de l'hémoglobine paraît simple, dans les faits le phénomène est très complexe car l'hémoglobine ne participe pas à une seule mais à de nombreuses réactions d'oxydation plus ou moins imbriquées les unes dans les autres.

Les réactions faisant intervenir des agents toxiques exogènes sont les plus connues et ne seront pas développées ici. En revanche, l'hémoglobine peut être oxydée soit spontanément, soit par différents agents physiologiquement présents dans la circulation sanguine. Aussi, envisager l'oxydation de l'hémoglobine, c'est avant tout considérer son auto-oxydation qui est à l'origine d'une production quotidienne de méthémoglobine dans les globules rouges, d'un stress oxydant endogène et de l'instabilité des substituts érythrocytaires.

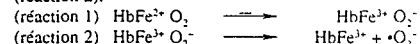
L'état à partir duquel l'hémoglobine s'auto-oxyde est très controversé selon que l'on considère une sous-unité ou le tétramère. L'analyse de la littérature montre que l'auto-oxydation est possible à partir de la forme oxygénée d'une sous-unité, mais aussi qu'elle est facilitée au niveau du tétramère lorsque celui-ci est partiellement déoxygéné [2]. De plus, selon l'hypothèse de Weiss [3, 4], les sous-unités d'oxyhémoglobine (HbO₂) seraient sous la forme superoxoferrihémoglobine HbFe³⁺O₂⁻ (réaction 1), forme qui serait due au déplacement, pendant l'oxygénation, d'un électron du fer hémique vers la molécule d'oxygène et qui serait responsable de cette auto-oxydation. Lors de la déoxygénation, cet électron est normalement restitué à l'atome de fer. Cependant, malgré l'environnement protégé, cet atome est susceptible de perdre son électron. L'HbFe³⁺O₂⁻ ne se déoxygène plus, mais se dissocie en méthémoglobine HbFe³⁺ et en radicaux superoxyde •O₂⁻ (réaction 2) [5-7]. C'est l'auto-oxydation de l'atome de fer.

Selon Wallace *et al.* [8], cette dissociation ne peut pas être responsable de toute l'oxydation de l'hémoglobine. Différents travaux ont clarifié cette question en démontrant *in vitro* que 31 % de l'auto-oxydation de l'hémoglobine pouvait être inhibée par la présence de superoxyde dismutase, 53 % par la présence de catalase, 76 % par la présence simultanée de ces deux enzymes, 23 % par la présence de mannitol et 50 % par la présence de thiourée. Aussi l'auto-oxydation ne se limite pas à la production de radicaux superoxyde et de méthémoglobine, mais est généralement accompagnée de l'oxydation de nouvelles sous-unités d'hémoglobine par ce même type de radical et par d'autres espèces oxygénées réactives telles que le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyl [5, 9].

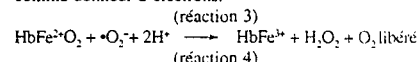
La part de responsabilité de chacune de ces espèces oxygénées réactives et de la dissociation de l'hémoglobine dans le phénomène d'oxydation spontanée n'est pas définie précisément, toutes les réactions dépendant plus ou moins les unes des autres. Aussi, on peut

considérer que l'auto-oxydation de l'hémoglobine soit assimilée comme la dissociation spontanée de la superoxoferrihémoglobine additionnée aux réactions qui en découlent. En fait, la dissociation de l'HbFe³⁺O₂⁻ n'est responsable que d'une faible fraction de la méthémoglobine formée, mais cette dissociation constitue l'étape initiale de l'auto-oxydation de l'hémoglobine.

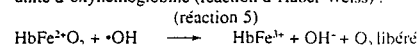
Ainsi, la séquence réactionnelle la plus souvent retenue [5, 10] et capable d'expliquer cette auto-oxydation dans les globules rouges ou dans le plasma est la suivante : une sous-unité d'oxyhémoglobine se dissocie directement en méthémoglobine et radical superoxyde (réaction 2).



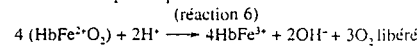
Ce radical superoxyde (réaction 2) peut ensuite oxyder le fer d'une nouvelle sous-unité d'oxyhémoglobine [9] en produisant du peroxyde d'hydrogène (réaction 3) qui à son tour oxyde une sous-unité d'oxyhémoglobine en générant un radical hydroxyl [5, 6] (réaction 4) selon une réaction de type Fenton utilisant le fer comme donneur d'électrons.



Ce radical hydroxyl •OH peut ensuite attaquer une sous-unité d'oxyhémoglobine (réaction d'Haber-Weiss) :

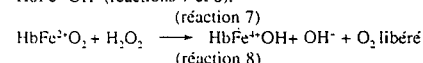


La dissociation d'une sous-unité d'oxyhémoglobine engendre ainsi l'oxydation en cascade de trois nouvelles sous-unités. Ce schéma réactionnel est généralement résumé par l'équation :



avec production des intermédiaires : •O₂⁻, •OH, et H₂O₂. Il faut cependant noter que la littérature ne précise jamais si cette cascade d'oxydation concerne préférentiellement les sous-unités d'un même tétramère ou non. Cette équation est en accord avec les travaux [5, 8] qui affirment que, pour chaque mole d'hémoglobine oxydée, 0,75 mole d'oxygène moléculaire est relarguée. Cependant, ce schéma réactionnel est toujours discuté, en particulier l'hypothèse [11] que le fer lié à la molécule d'hémoglobine est capable de catalyser une réaction de Fenton [12], c'est-à-dire la production, à partir du peroxyde d'hydrogène, de radicaux hydroxyl •OH hautement réactifs (réaction 4). D'après Alayash *et al.* [7, 13], en cas de large excès, le peroxyde d'hydrogène décompose l'oxyhémoglobine. Les atomes de fer sont

alors libérés et deviennent aptes à catalyser une réaction de Fenton. En revanche, en cas de faible excès, le peroxyde d'hydrogène réagit directement avec l'oxyhémoglobine, et surtout avec la méthémoglobine à pH acide, en provoquant la formation d'états d'oxydation très élevés de l'hème, les ferryl-hémoglobines HbFe⁴⁺OH (réactions 7 et 8).



Très récemment, Svistunenko [14] précise que l'oxydation de la méthémoglobine (activité peroxydasique de l'hémoglobine) se ferait en fait concomitamment sur deux sites différents :

- l'hème, dont le fer ferrique s'oxyderait en fer ferryl, avec formation de ferrylhémoglobine (HbFe⁴⁺=O),
- et la globine qui formerait un radical protéique, une ferrylhémoglobine radicalaire •HbFe⁴⁺=O.

La nature du radical protéique est encore très discutée bien que sa formation *in vitro* au niveau d'une tyrosine ait été démontrée [14]. Cependant, la présence de tels radicaux dans le sang *in vivo* n'a pour l'instant jamais été mise en évidence, car ils s'auto-réduisent spontanément, très rapidement [14] et leur formation est inhibée par fixation de l'hémoglobine à l'haptoglobine [15]. Aussi, seules les ferrylhémoglobines non radicalaires (HbFe⁴⁺=O) sont-elles généralement trouvées et seulement en très faibles quantités car, dans les globules rouges, elles sont soit réduites par l'oxyhémoglobine selon la réaction 9, soit prises en charge par les systèmes réducteurs intraglobulaires tels que l'acide ascorbique et le glutathion [16], soit autoréduites spontanément [14].

(réaction 9) $\text{HbFe}^{4+} + \text{HbFe}^{3+} \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{HbFe}^{3+} + \text{O}_2$

La méthémoglobine obtenue par toutes ces voies est ensuite réduite par la méthémoglobine réductase intracétythrocytaire. D'une façon générale, l'auto-oxydation de l'hémoglobine est inhibée *in vitro* par la liaison du fer au monoxyde de carbone ou à des anions tels que cyanure (CN⁻), azoture (azohydrate ou azide) N₃⁻ ou thiocyanate (SCN⁻). Ces ligands anioniques (L⁻), convertissant l'oxyhémoglobine en hémoglobine HbL, stoppent l'auto-oxydation dès la réaction 2 et par suite toutes celles qui pourraient s'enchaîner [9]. Ainsi, la forme oxygénée de la sous-unité d'hémoglobine et la dissociation de sa forme superoxoferrihémoglobine HbFe³⁺O₂⁻ en méthémoglobine et radical superoxyde •O₂⁻ seraient bien les conditions indispensables de l'auto-oxydation et la dissociation de la superoxoferrihémoglobine en serait l'étape clé.

Il a été démontré [5, 17] que cette dissociation était activée *in vitro* par une augmentation de température, par l'acidification du milieu, par la présence d'ions métalliques tels que le cuivre, de phosphates organiques (2,3 DPG ou inositol hexaphosphate, forme trouvée chez les oiseaux et utilisée pour modifier l'hémoglobine), ou simplement par l'état d'oxygénation partielle de l'hémoglobine [17]. En effet, la dissociation des sous-unités oxygénées a été observée comme étant plus rapide à la demi-saturation du tétramère lorsqu'il est dans sa conformation T [2]. C'est pourquoi les phosphates organiques tels que le 2,3 DPG ou l'inositol hexaphosphate, induisant le passage de l'hémoglobine dans cette conformation T, favorisent son auto-oxydation. De même, l'auto-oxydation dépend de la pression partielle en oxygène, elle diminue aux fortes pressions comme celle existant dans le sang artérielisé (pO₂ ~ 100 mmHg ou 13,33 kPa, et presque 100 % de saturation en O₂) alors qu'elle s'accroît pour de faibles pressions. Par conséquent, elle serait facilitée dans le sang veineux (pO₂ ~ 40 mmHg ou 5,33 kPa).

Comme l'oxygénation, la vitesse d'auto-oxydation des deux types de monomères α et β au sein du tétramère n'est pas identique. La déoxygénation étant plus rapide pour les sous-unités β et l'auto-oxydation étant facilitée à la demi-saturation, seules les sous-unités α remplissent la condition d'être oxygénées à la demi-saturation, elles s'auto-oxydent par conséquent plus rapidement que les sous-unités β (tableau 1) [17] et cela aboutit à des tétramères du type (α^{Fe3+}β^{Fe2+})₂.

L'oxydation de la molécule d'hémoglobine

En dehors de cette auto-oxydation, l'hémoglobine érythrocytaire ou plasmatique peut être oxydée facilement par des agents physiologiques endogènes ou par des agents toxiques exogènes.

Tableau 1. Sélectivité des sous-unités au cours de l'oxydation et de la réduction de l'hémoglobine selon Bunn *et al.* [17]

Oxydation de α ^{Fe3+} β ^{Fe3+}	
Auto-oxydation	α > β
Ferricyanure	β > α
Nitrite	β > α
Ion cuivrique	β
Réduction de α ^{Fe3+} β ^{Fe3+}	
Acide ascorbique	β > α
Cytochrome b ₅ réductase	β > α
NADPH-flavine réductase	β > α

Les principaux agents oxydants physiologiques

• Les espèces oxygénées. Les espèces telles que les radicaux superoxydes $\cdot O_2^-$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sont continuellement générées dans l'organisme et dans le sang, indépendamment de la séquence réactionnelle de l'auto-oxydation. Aussi, selon des réactions similaires à celles trouvées dans cette séquence d'auto-oxydation, mais également selon des réactions impliquant la déoxyhémoglobine, l'hémoglobine, quel que soit le composant sanguin dans lequel elle se trouve, est en théorie susceptible d'être oxydée jusqu'à l'état de ferryl-hémoglobine. Cette oxydation dépend de la disponibilité en ces espèces dont la durée de vie est généralement faible, et en cas d'ischémie-reperfusion, la surproduction de radicaux superoxyde occasionnée peut l'accélérer.

• L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote ($\cdot NO$). Produite par les cellules endothéliales et libérée dans la circulation sanguine, cette molécule très réactive pénètre facilement dans les érythrocytes où elle réagit avec les hèmes α pour former l'Hb- α -NO [18] et/ou avec les cystéines $\beta 93$ des globines pour favoriser le transfert de l'oxygène des sous-unités β aux tissus et favoriser aussi le flux sanguins dans la circulation périphérique en fonction de la pO_2 [19]. Aussi, au sein du globule rouge et *in vivo*, la formation de méthémoglobine NO-dépendante est très faible et proviendrait uniquement de l'interaction du NO avec les hèmes oxygénés des sous-unités β selon la réaction 11 [20].

(réaction 11) $HbFe^{2+}O_2 + \cdot NO \rightarrow HbFe^{3+} + NO_2^-$
En revanche, il a été démontré *in vivo* que le NO interagissait fortement avec l'oxyhémoglobine du plasma et participait de façon beaucoup plus importante à son oxydation qu'au sein du globule rouge. La mise en évidence *in vitro* [18] d'une formation rapide d'Hb- β -NO conjointement aux Hb- α -NO laisse supposer la responsabilité de ces Hb- β -NO dans la formation de méthémoglobine plasmaticque.

• Le peroxydant ($ONOO^-$). Cette forme rédox du $\cdot NO$ provient de son interaction chimique avec l' $\cdot O_2^-$ *in vivo* (réaction 12).

(réaction 12) $\cdot NO + \cdot O_2^- \rightarrow ONOO^-$ (avec $k = 6,7 \times 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [21]).

Dans les conditions normales, les interactions entre $\cdot O_2^-$ et $\cdot NO$ et la production de $ONOO^-$ dans les vaisseaux dépendent d'un délicat équilibre entre les processus pro- et anti-oxydants. C'est ainsi qu'une production excessive d' $\cdot O_2^-$ peut créer une diminution de la concentration normale de $\cdot NO$, provoquant la perte de l'effet bénéfique du $\cdot NO$ et une formation concomitante de $ONOO^-$. L'hémoglobine réagirait ensuite très

rapidement avec le $ONOO^-$, soit par une interaction directe au niveau de son noyau hème, soit par la nitration d'une tyrosine protéique. L'oxydation s'arrêterait à la méthémoglobine, $ONOO^-$ n'étant pas capable d'oxyder l'hémoglobine jusqu'à l'état ferryl [22] à la différence du peroxyde d'hydrogène. Cette oxydation serait facilitée en situation d'ischémie-reperfusion en raison des $\cdot O_2^-$ générés et concernerait fortement l'hémoglobine plasmaticque provenant de l'hémolyse ou les substituts érythrocytaires. L'hémoglobine est elle-même productrice de $\cdot O_2^-$ par son auto-oxydation et favorise une déplétion en $\cdot NO$ par son avidité pour ce dernier.

Les agents oxydants exogènes

En plus de ces oxydations physiologiques, l'hémoglobine intra-érythrocytaire ou plasmaticque est exposée à l'action de molécules toxiques exogènes provenant de l'alimentation ou de traitements médicamenteux dont les principales sont regroupées dans le tableau 2. Contrairement à l'auto-oxydation et en accord avec ce qui vient d'être développé, l'oxydation de l'hémoglobine par ces agents, quel que soit le composant sanguin dans lequel cette dernière est présente, est plus rapide pour les chaînes β que pour les chaînes α (tableau 1), les formes $(\alpha^{Fe^{2+}}\beta^{Fe^{3+}})_2$ sont alors trouvées [17].

La méthémoglobine dans le sang

Les méthémoglobinémies et leurs conséquences

Dans les érythrocytes, la formation de méthémoglobine est constante. L'accroissement de son taux dans la circu-

Tableau 2. Substances susceptibles d'oxyder l'hémoglobine *in vivo*, selon Bunn et al. [17]

<p>1. Par oxydation directe</p> <p>Ferricyanure Culvra Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) Hydroxylamine Autres : chromate, chlorate, tétranitrométhane, quinones, colorants</p>
<p>2. Par interaction avec l'oxygène</p> <p>Nitrites Hydrazines Thioles Autres : arsines, aminophénols, arylhydroxylamines, N-hydroxyurethane, phénylénediamines</p>
<p>3. Exigeant une transformation biochimique</p> <p>Aniline Sulfanilamide 4,4'-diaminodiphénylsulfone (dapsone) 8-aminoquinolines : primaquine et pamaquine N-Acylarylamines : acétanilide, phénacétine</p>

lation au-delà de 1 % chez l'adulte et de 1.5 % chez le nouveau-né est considéré comme pathologique. Ces pathologies appelées méthémoglobinémies peuvent aboutir à des états de cyanose. Elles sont dites acquises lorsqu'elles résultent de l'auto-oxydation ou d'une oxydation de l'hémoglobine par interaction avec le NO, les nitrites ou d'autres molécules toxiques et oxydantes d'origine alimentaire ou médicamenteuse. Ce sont les plus fréquentes (tableau 2). Elles sont dites congénitales ou constitutionnelles lorsqu'elles résultent d'anomalies génétiques qui touchent directement ou non la molécule d'hémoglobine. Le premier cas est celui des hémoglobines M qui, par suite de mutations au niveau de l'enchaînement des acides aminés de la globine, se trouvent stabilisées à l'état ferrique par leur sixième coordination entre le fer et la globine, et ne peuvent être réduites. Cet état est irréversible et il n'existe pas de traitement approprié. Le second cas est celui de l'absence ou de la déficience de l'enzyme principale de réduction de la méthémoglobine : la NADH-méthémoglobine réductase ou diaphorase I. La méthémoglobinémie qui en résulte peut être traitée par différentes molécules réductrices.

Dans le plasma, dans les cas d'hémolyse, la concentration en hémoglobine étant très élevée, l'auto-oxydation y est très importante. Lors des études d'évaluation pré-clinique d'un substitut à base d'hémoglobine, l'hémoglobine dextrane-benzène-tétracarboxylate chez le cobaye, espèce qui comme l'homme ne synthétise pas d'acide ascorbique, nous avons démontré que l'auto-oxydation de ces substituts dans le plasma *in vivo* était effectivement très importante et qu'elle était bi-phasique. En effet, le taux de méthémoglobine augmente d'abord rapidement puis atteint un plateau à 30-35 %, 8 heures après l'administration de l'oxyhémoglobine (figure 2) [23]. Cette évolution en deux temps implique un mécanisme à étapes multiples comme celui décrit pour l'auto-oxydation et auquel s'ajoutera l'action oxydante d'un ou de plusieurs des divers agents précités ($\cdot NO$, $ONOO^-$...). L'oxydation des substituts à base d'hémoglobine n'engendre pas, à notre connaissance, d'effets secondaires importants. Cependant, il faudra s'attendre à retrouver avec ces substituts les phénomènes observés en cas de méthémoglobinémies, à savoir une néphrotoxicité, une saturation des systèmes responsables du catabolisme de l'hémoglobine (hémopexine, haptoglobine), l'apparition de radicaux protéiques très réactifs ($HbFe^{2+}$), de peroxydation lipidique... De plus, un inconvénient particulier à ces transporteurs d'oxygène est la perte de leur fonction oxyphorique et par conséquent la perte de leur intérêt thérapeutique.

La régulation du taux de méthémoglobine circulante

En dépit de toutes ces possibilités d'oxydation, les méthémoglobinémies sont rares grâce à la capacité intrinsèque du milieu sanguin à limiter cette auto-oxydation/oxydation par des réactions anti-oxydantes et réductrices et à restaurer la fonctionnalité des molécules oxydées. Cette régulation se fait essentiellement au sein du globule rouge.

La présence d'agents oxydants et l'apparition de nombreuses réactions dont l'objectif est de piéger ou de rendre inoffensifs ces agents et/ou de réduire la méthémoglobine formée. Si, au sein du globule rouge, ces réactions ont comme principal objectif le maintien de l'hémoglobine dans un état fonctionnel, dans le plasma, les réactions anti-oxydantes ou réductrices interviennent pour protéger toutes les molécules biologiques du sang.

• Les anti-oxydants

Les anions superoxyde et le peroxyde d'hydrogène étant constamment produits dans l'organisme, il existe des enzymes telles que la superoxyde dismutase, la glutathion-peroxydase sélénium-dépendante et la catalase dont la finalité est d'éliminer ces espèces oxygénées [24]. Leur teneur est très différente dans le plasma

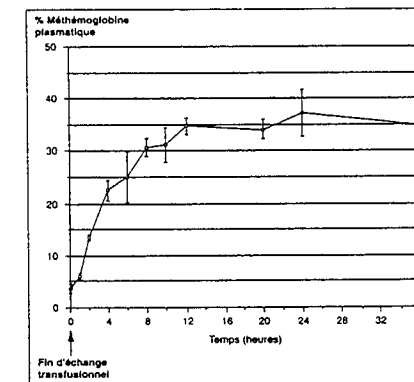


Figure 2. Évolution du taux de méthémoglobine plasmaticque suite à un échange transfusionnel à 50 % chez le cobaye Hartley mâle avec un substitut anhyrocytaire à base d'hémoglobine conjuguée à un polymère de dextrane-benzène-tétracarboxylate (moyenne \pm sem, n = 8) [23].

Tableau 3. Comparaison des teneurs plasmatiques et érythrocytaires en différents enzymes [25], agents réducteurs et anti-oxydants susceptibles d'intervenir dans la régulation de l'état d'oxydation de l'hémoglobine dans le sang humain.

Enzymes	Concentrations	
	Plasma (U ml ⁻¹)	Érythrocytes (U 10 ⁻¹⁴ cells)
Superoxyde dismutase	5-20	550-800
Catalase	?	3 800-5 400
Glutathion peroxydase	0,4	7,8-10,6
Glutathion réductase	0,03	2,7-3,7
Agents réducteurs et anti-oxydants	µM	µM
Glutathion (GSH)	5	2,5-10 10 ⁶
Acide ascorbique	45 à 85	40 à 70

et dans le globule rouge [25] comme le montre le tableau 3. Aussi, leur efficacité à protéger l'hémoglobine diffère dans le compartiment érythrocytaire et le compartiment plasmatique.

Les radicaux superoxyde, éléments clés du mécanisme d'auto-oxydation, sont en majeure partie neutralisés dès leur formation par la superoxyde dismutase de type Cu-Zn (EC 1.15.1.1) ($k = 2.10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) (réaction 13). Cette réaction a une constante de vitesse telle que l'amplification de l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine selon la réaction 3 ($k = 6.5.10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) est pratiquement inexistant au sein du compartiment érythrocytaire, riche en cette enzyme (tableau 3). Le peroxyde d'hydrogène produit par cette réaction est détruit par la glutathion-peroxydase ou la catalase.

Ces radicaux superoxyde peuvent aussi être piégés par l'acide ascorbique avec une constante $k = 8.2.10^7 \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ [9] ou même directement par la méthémoglobine (réaction 14) avec une constante $k = 4.10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ et un très faible rendement, un hème réagissant avec un radical superoxyde [6, 20] :

(réaction 14) $\cdot\text{O}_2^- + \text{HbFe}^{2+} \longrightarrow \text{HbFe}^{2+} \cdot\text{O}_2$
 La principale source de peroxyde d'hydrogène dans le globule rouge est l'auto-oxydation de l'hémoglobine (réaction 3) suivie de la réaction de dismutation (réaction 13) [14]. Comme nous l'avons vu plus haut, un accroissement de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans les globules rouges peut rapidement aboutir à la formation de ferrylhémoglobines très réactives. Aussi, ce peroxyde d'hydrogène est-il rapidement détruit. À faible concentration, H₂O₂ est principalement pris en charge par la glutathion-peroxydase (EC 1.11.1.9) (réaction 15) :

(réaction 15) $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GS-SG} + 2 \text{H}_2\text{O}$

En cas de déplétion sévère en glutathion réduit, l'acide ascorbique peut piéger directement le peroxyde d'hydrogène en s'oxydant en acide déhydroascorbique. À fortes concentrations en H₂O₂, la catalase (EC 1.11.1.6) est sollicitée (réaction 16).

(réaction 16) $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$
 Dans les érythrocytes, chez le sujet sain, dès que la concentration en radical superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$ excède 10 µM, $\cdot\text{O}_2^-$ est efficacement piégée selon les voies précitées tout comme H₂O₂ qui en résulte. Par conséquent, l'auto-oxydation se limite à la dissociation de l'oxyhémoglobine. Ces mécanismes offrent une protection importante contre la formation de méthémoglobine intra-érythrocytaire [26] et toute déficience dans ces mécanismes anti-oxydants est susceptible d'accroître l'oxydation de l'hémoglobine. Il est à noter cependant qu'aucune méthémoglobinémie associée à une acatalasémie n'a, à notre connaissance, été décrite.

Dans le plasma, l'hémoglobine étant physiologiquement en concentration très faible, ces systèmes anti-oxydants n'ont pas de rôle spécifique vis-à-vis d'elle. Cependant, pour des concentrations en hémoglobine excédant 160 µM (10 g/l de plasma), cas de l'administration des substituts, et pour des concentrations en radical superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$ inférieures ou égales à 1 nM à pH 7, la réaction 3 serait très active et consommerait tout l' $\cdot\text{O}_2^-$. Les réactions 4 et 5 ou 7 et 8 seraient alors également très actives et provoqueraient l'amplification de l'oxydation. Celle-ci est d'autant plus rapide que le plasma est physiologiquement pauvre en superoxyde dismutase, en glutathion peroxydase ou en catalase (l'existence de cette dernière dans le plasma n'a jamais, à notre connaissance, été mise en évidence) [25].

• **Les mécanismes de réduction de la méthémoglobine**
 Tous les agents anti-oxydants présents à la fois dans le globule rouge et dans le plasma, à des concentrations très différentes (tableau 3), permettent de limiter à 3 % le pourcentage total d'hémoglobine oxydée par jour chez l'homme [5]. La méthémoglobine sanguine ne dépasse normalement pas 1 % en permanence chez adulte, cette valeur étant inférieure à 1,5 % chez le nouveau-né. Cette différence met en évidence la présence dans le sang de divers mécanismes capables de réduire la méthémoglobine. Ils sont soit enzymatiques, soit chimiques.

La réduction enzymatique nécessite l'intervention du cofacteur NAD ou NADP produit par la glycolyse. La voie NADH-dépendante est la plus active. Une flavoprotéine, la NADH-méthémoglobine réductase (EC 1.6.2.2 ou diaphorase I) catalyse la réduction d'une hémoprotéine soluble intraglobulaire, le cytochrome

b5, par le cofacteur réduit NADH (réaction 17). Par liaison à la méthémoglobine, cette hémoprotéine permet, selon un rapport d'un cytochrome b5 par sous-unité, le transfert de l'électron requis pour réduire le fer ferrique en fer ferreux (réaction 18). Le cytochrome est ensuite régénéré par cette même enzyme qui est également appelée, pour cette raison, cytochrome b5 réductase ou même NADH-déshydrogénase. La concentration en cytochrome b5 détermine l'importance de la réduction de la méthémoglobine.

(réaction 17)
 $\text{NADH} + \text{Cytb}_5\text{-Fe}^{3+} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{Cytb}_5\text{-Fe}^{2+}$
 (réaction 18)

$\text{Cytb}_5\text{-Fe}^{2+} + \text{HbFe}^{3+} \longrightarrow \text{Cytb}_5\text{-Fe}^{3+} + \text{HbFe}^{2+}$
 Cette voie enzymatique est la seule qui intervient dans la réduction de la méthémoglobine intraglobulaire en situation physiologique. Elle réduit plus rapidement les chaînes β que les chaînes α *in vitro* (tableau 1) [17]. En liaison avec la glycolyse anaérobie, elle a un rendement de 4 atomes de fer ferrique réduits par molécule de glucose consommée ou de 2 atomes de fer ferrique par molécule de lactate dégradée. La vitesse de la réaction diffère d'une espèce animale à l'autre. Elle est décrite comme rapide chez le lapin et lente chez l'homme, le chien, le rat et le cobaye. Elle permet cependant chez l'homme de corriger spontanément, en 24 à 72 h, une méthémoglobinémie acquise correspondant à 30 % de l'hémoglobine totale consécutive à un empoisonnement. La concentration de cette enzyme est faible chez le nouveau-né, ce qui explique le risque important de méthémoglobinémie chez celui-ci. En cas d'absence ou d'inactivité de cette enzyme, d'origine génétique (autosomale récessive), une méthémoglobinémie est observée.

Accessoirement à cette voie principale de réduction, existe la voie NADPH-dépendante. La méthémoglobine-réductase concernée est appelée NADPH flavine réductase (EC 1.6.99.1), NADPH-déshydrogénase [17] ou encore diaphorase II. Comme dans la voie précédente, un donneur d'électron intermédiaire est nécessaire à la réduction de la méthémoglobine. Il est obtenu par la réduction enzymatique d'un accepteur de type flavine qui, étant peu disponible dans l'organisme [27], impose un rendement très faible à cette voie en situation physiologique :

(réaction 19)
 $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{flavine} \longrightarrow \text{NADP}^+ + \text{dihydroflavine}$

(réaction 20)
 $\text{dihydroflavine} + 2\text{HbFe}^{3+} \longrightarrow \text{flavine} + 2\text{HbFe}^{2+}$

En revanche, cette voie peut être activée en situation de méthémoglobinémie par l'administration thérapeutique d'un accepteur d'électron exogène [28], tel que le bleu de méthylène qui pénètre dans le globule rouge où, selon le principe de la réaction 19, il est rapidement réduit en leucobleu incapable de traverser la membrane érythrocytaire. Ce leucobleu échange alors directement son électron avec l'atome de fer ferrique de l'hémoglobine et régénère ainsi la fonction oxyphorique (réaction 20).

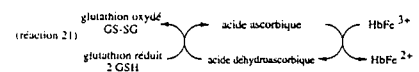
En présence de bleu de méthylène et d'une production suffisante de NADPH, cette voie est d'un rendement très supérieur à la précédente puisque jusqu'à 8 atomes de fer ferrique peuvent être réduits par molécule de glucose [29]. Elle constitue ainsi un traitement très efficace de la méthémoglobinémie et la cyanose, qui lui est associée, régresse généralement dans l'heure qui suit l'administration du bleu de méthylène [28]. Ce traitement est recommandé pour toutes les méthémoglobinémies acquises et pour les rares cas de méthémoglobinémie congénitale due à l'absence de diaphorase I. Cependant, en cas de méthémoglobinémie associée à une hémolyse, il est fortement conseillé, avant le traitement, de rechercher un déficit de l'activité de la glucose-6-P-déshydrogénase (cas d'empoisonnement aux chlorates) [30], car la carence en NADPH, due à ce déficit, stoppera l'activité de la NADPH flavine réductase. Aussi l'administration de bleu de méthylène sera inefficace et pourra même aggraver l'hémolyse et favoriser la formation de méthémoglobine [30]. Dans de tels cas, l'utilisation d'un autre accepteur d'électron sera nécessaire. Ce peut être la riboflavine ou vitamine B2, substrat de la NADPH flavine réductase qui ne présente pas d'effets indésirables et qui pourrait donc être considérée comme un traitement de choix [31].

Dans le plasma, ces diaphorases I et II ne sont pas présentes à notre connaissance. Cependant, Xu *et al.* [27] ont détecté, dans la fraction cytosolique du foie de rat et de bœuf, une réductase de type diaphorase II susceptible d'interagir avec l'hémoglobine plasmatique et donc d'intervenir dans la régulation de son état d'oxydation. *In vivo* chez le cobaye ayant subi un échange transfusionnel de 50 % de son volume sanguin par l'hémoglobine-dextrane-benzène-tétracarboxylate, substitut érythrocytaire, suivi de l'administration de bleu de méthylène (à 1 %, 1-2 mg/kg) ou de riboflavine (7,5 mg/kg [31]) par voie veineuse, nous avons mis en évidence une réduction efficace de la méthémoglobine plasmatique, et par conséquent la présence

dans le sang de mécanismes réducteurs de type diaphorase II inductibles par ces accepteurs d'électrons et agissant sur la méthémoglobine libre [23].

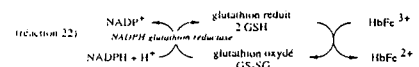
La *réduction non enzymatique* est une réduction bimoléculaire car elle ne fait intervenir que l'agent réducteur et la méthémoglobine. Les agents les plus actifs sont l'acide ascorbique et le glutathion réduit.

L'acide ascorbique, ou vitamine C, traverse facilement la membrane érythrocytaire et sa concentration semble s'équilibrer de part et d'autre de cette membrane. En plus de son action anti-oxydante, il possède une action réductrice très efficace de la méthémoglobine par cession directe d'un électron. L'acide déhydroascorbique obtenu est alors réduit par le glutathion (GSH) présent dans la cellule (réaction 21).



L'acide ascorbique n'étant pas synthétisé par l'homme, il est en concentration faible dans les globules rouges et dans le plasma, et son activité réductrice et/ou anti-oxydante est modérée. Cependant il peut être administré dans les cas de méthémoglobinémies réversibles et il se révèle alors très efficace à condition que le taux de méthémoglobine n'excède pas 30 %.

Le glutathion peut également réduire la méthémoglobine par transfert direct d'un électron [29]. Le glutathion est ensuite régénéré par la NADPH-glutathion réductase (EC 1.6.4.2) présente dans les érythrocytes (réaction 22).

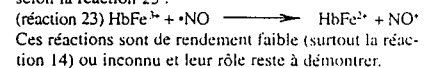


Ces deux voies non enzymatiques sont présentes à la fois dans les érythrocytes et dans le plasma (tableau 3). Dans les érythrocytes, selon certains auteurs [24, 29], elles ont une activité importante, puisqu'elles représenteraient 30 % du potentiel de réduction de la méthémoglobine ; selon d'autres, elles n'ont qu'un rôle minime [28]. Parallèlement à cette activité réductrice, ces agents présentent aussi une activité anti-oxydante.

Dans le plasma, le potentiel de réduction non enzymatique de la méthémoglobine dépendrait de différents éléments sanguins tels que les globules rouges et l'acide ascorbique, et très peu du glutathion. En effet, il a été démontré chez le rat que l'oxydation plasmatique de substitut érythrocytaire à base d'hémoglobine était inversement proportionnelle à l'hématocrite [32], ce qui signifie que plus l'hématocrite était faible, donc

la quantité de globules rouges circulants faible, plus l'oxydation de l'hémoglobine dans le plasma était forte. Par ailleurs, l'oxydation plasmatique est très importante chez des espèces comme le cobaye qui ne synthétisent pas l'acide ascorbique (30-40 % MetHb) [23] alors que, plus l'espèce animale a la capacité de synthétiser ce composé (lapin > rat), plus le taux d'oxydation de l'hémoglobine dans le plasma est faible (respectivement < 8 % et 10-15 %). L'efficacité de l'acide ascorbique serait due à ses actions à la fois réductrices et anti-oxydantes et celle du globule rouge serait due à sa capacité à régénérer l'acide ascorbique oxydé (acide déhydroascorbique) et à piéger le peroxyde d'hydrogène plasmatique. Cette régénération se ferait dans les érythrocytes par réduction directe par le glutathion érythrocytaire de l'acide déhydroascorbique ayant pénétré. Ainsi, le potentiel de réduction non enzymatique du plasma dépendrait de celui des érythrocytes. Pour le glutathion, au vu de sa très faible concentration plasmatique et de l'absence, à notre connaissance, d'une glutathion-réductase dans le plasma (tableau 3), cette capacité de réduction plasmatique semble limitée. L'administration de glutathion réduit chez le cobaye n'a conduit à aucune réduction significative de la méthémoglobine plasmatique et nous permet de conforter l'hypothèse de l'absence probable de systèmes capables de régénérer le glutathion oxydé dans le plasma [23].

En dehors de ces agents réducteurs, la méthémoglobine pourrait aussi être réduite selon deux autres voies non enzymatiques, l'une selon la réaction anti-oxydante 14 qui concerne l'interaction de la méthémoglobine avec les radicaux superoxyde, l'autre par interaction de la méthémoglobine avec le radical *NO [7] selon la réaction 23 :



Conclusion

L'analyse de la littérature montre combien le sujet traité dans cette revue est ancien, et combien il a été oublié durant les années 1980-1990. L'actuel développement des substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine explique son regain d'intérêt. Cette revue souligne la complexité et la diversité des mécanismes par lesquels l'hémoglobine peut s'oxyder et le potentiel anti-oxydant/réducteur puissant dont dispose l'organisme pour la maintenir dans un état fonc-

tionnel. La plupart des mécanismes anti-oxydants et réducteurs enzymatiques ou chimiques nécessaires sont présents dans les globules rouges, certains existent aussi dans le plasma et peut-être même dans le foie [27].

Dans le cas de fortes concentrations plasmatiques d'hémoglobine (maladie hémolytique ou administration d'un transporteur d'oxygène à base d'hémoglobine), la régulation de l'état d'oxydation de l'hémoglobine fait sans doute appel aux mécanismes anti-oxydants érythrocytaires et à l'acide ascorbique plasmatique. En effet, comme nous l'avons souligné, ce dernier peut intervenir dans de multiples réactions anti-oxydantes (avec *O₂⁻, H₂O₂...) et réductrices. Cette double activité lui conférerait un rôle très important dans la régulation de l'état d'oxydation de l'hémoglobine dans le plasma. Différents travaux [23, 32] réalisés chez des espèces où la synthèse d'acide ascorbique est quantitativement très différente, ont mis en évidence un taux plasmatique de méthémoglobine inversement proportionnel à leur capacité de synthèse. L'homme, comme tous les primates et comme le cobaye, ne synthétise pas l'acide ascorbique, aussi, pour autant que les résultats obtenus chez le cobaye (figure 2) [23] soient extrapolables à l'homme, ce dernier devrait exercer une régulation très médiocre de l'état d'oxydation de l'hémoglobine libre dans le plasma consécutive à une hémolyse ou à l'administration d'un substitut érythrocytaire. Des taux supérieurs à 15 % de méthémoglobine sont à attendre avec production de radicaux libres et peut-être d'espèces ferryl très toxiques pour des concentrations en hémoglobine plasmatique post-transfusionnelle supérieures à 5 g/l. Cependant, il est apparu chez le cobaye (figure 2) que le taux de méthémoglobine se stabilisait 8 à 10 heures après l'administration d'hémoglobine. Cela pourrait être la preuve indirecte de l'activité d'autres agents anti-oxydants ou réducteurs (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, glutathion...), du catabolisme préférentiel de la méthémoglobine plutôt que de l'hémoglobine et ainsi de l'établissement d'un équilibre entre l'oxydation, la réduction et le catabolisme de l'hémoglobine. Par ailleurs, comme pour les méthémoglobinémies d'origine érythrocytaire, l'administration de composés, tels que l'acide ascorbique, le bleu de méthylène ou la riboflavine, devrait permettre, comme nous l'avons montré chez le cobaye, de maintenir le taux de méthémoglobine plasmatique à une valeur inférieure à 10 % durant les premières heures qui suivent son administration. Des injections répétées sont ensuite nécessaires. L'efficacité de ces traitements

conforte les hypothèses d'une synergie globules rouges-acide ascorbique et l'existence d'une méthémoglobine-réductase du type diaphorase II à action plasmatique.

L'état d'oxydation de l'hémoglobine dans le sang dépend de phénomènes très complexes car s'il apparaît que l'organisme lutte contre la formation de méthémoglobine, forme impropre au transfert de l'oxygène, l'oxydation de l'hémoglobine est parfois nécessaire car elle offre une voie de défense contre les nombreuses formes de molécules oxydantes radicalaires ou non, endogènes ou exogènes. Ainsi l'ensemble des mécanismes d'oxydation et de réduction sont étroitement liés entre eux et le taux de méthémoglobine érythrocytaire circulante est le résultat d'une remarquable régulation de ces ressources. Mais, si les érythrocytes disposent d'un matériel diversifié et efficace pour maintenir ce taux bas de méthémoglobine, le plasma se trouve très démuné en présence de très fortes concentrations d'hémoglobine libre. Aussi, lors de l'administration des substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine, il faut s'attendre à une perturbation de cet équilibre. Actuellement, bien que quelques travaux précliniques sur les substituts érythrocytaires à base d'hémoglobine soulignent ce problème, aucune étude clinique, à notre connaissance, n'y attache encore vraiment d'importance.

Références

- Winslow RM. Blood Substitutes. *Sci Med* 1997; Mars/April : 54-63.
- Winslow RM, Rossi-Bernardi L. Oxygen-hemoglobin dissociation curve. In : *The Lung : Scientific Foundations*, Crystal RG, West JB, et al., ed. New York, Raven Press, 1991 : 1225-31.
- Weiss JJ. Nature of the iron oxygen bond in oxyhaemoglobin. *Nature* 1964 ; 202 : 83-4.
- Mansouri A, Lurie AA. Concise review : methemoglobinemia. *Am J Hematol* 1993 ; 42 : 7-12.
- Mal A, Chatterjee IB. Mechanism of autooxidation of oxyhaemoglobin. *J Biosci* 1991 ; 16 : 55-70.
- Sutton HC, Roberts PB, Winterbourn CC. The rate of reaction of superoxide radical ion with oxyhaemoglobin and methaemoglobin. *Biochem J* 1976 ; 155 : 503-10.
- Alayash AI, Cashion RE. Hemoglobin and free radicals : implications for the development of a safe blood substitute. *Mol Med Today* 1995 ; 1 : 122-7.
- Wallace WJ, Houtchens RA, Maxwell JC, Caughey WS. Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. Promotion of superoxide production by protons and anions. *J Biol Chem* 1982 ; 257 : 4966-77.
- Mal A, Nandi A, Chatterjee IB. Haemoglobin : a scavenger of superoxide radical. *J Biosci* 1991 ; 16 : 43-53.
- Winterbourn CC. Free radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Env Health Persp* 1985 ; 64 : 321-30.

11. Sadraideh SMH, Graf E, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW. Hemoglobin: a biologic Fenton reagent. *J Biol Chem* 1984; 259: 14354-6.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-5.
13. Alayash AI, Cashon RE. Reactions of nitric oxide and hydrogen peroxide with hemoglobin based blood substitutes. *Neurobiol NO⁻ -OH* 1994; 738: 378-81.
14. Svislunenko DA, Patel RP, Voloshchenko SV, Wilson MT. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *J Biol Chem* 1997; 272: 7114-21.
15. Miller YI, Altamentova SM, Shaklai N. Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: antioxidant role of haptoglobin. *Biochemistry* 1997; 36: 12189-98.
16. Mao GD, Thomas PD, Poznansky MJ. Oxidation of spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-l-oxide in an electron paramagnetic resonance study of the reaction of methemoglobin with hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med* 1994; 16: 493-500.
17. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin oxidation: methemoglobin, methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia. In: *Hemoglobin: molecular genetic and clinical aspects*. Bunn HF, Forget BG. Philadelphia, Saunders ed, 1986: 634-62.
18. Kosaka H, Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues. *Biochem Biophys Res Com* 1996; 218: 749-52.
19. Stamler JS, Ha L, Eu JP, et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276: 2034-7.
20. Murphy ME, Noack E. Nitric oxide assays using hemoglobin method. *Methods Enzymol* 1994; 233: 240-50.
21. Padjama S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 195: 539-44.
22. Alayash AI, Brochner RBA, Cashon RE. Peroxynitrite-mediated oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins. *Arch Biochem Biophys* 1997-1998, sous presse (communication personnelle).
23. Faivre B, Menu P, Labruide P, Grandgeorge M, Vigneron C. Methemoglobin formation after administration of hemoglobin conjugated to carboxylate dextran in guinea pigs. Attempts to prevent the oxidation of hemoglobin. *Art Cells Blood Subs Inmob Biotech* 1994; 22: 551-4.
24. Fiehn W. Concentration of methemoglobin in blood under physiological and pathological conditions. In: *The oxygen status of arterial blood*. Basel, Karger, Zander, Mertzluft ed, 1991: 190-5.
25. Bagrel A, Nabet F. Mesure des radicaux libres: méthodes directes et indirectes. *Ann Med Nancy Est* 1995; 34: 57-9.
26. Ohmori T, Takamoto K, Ogata M. The role of catalase in protecting erythrocytes against methemoglobin formation. *Acta Med Okayama* 1991; 45: 321-4.
27. Xu F, Quandt FS, Hultquist DE. Characterization of NADPH-dependent methemoglobin reductase as a heme-binding protein present in erythrocytes and liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2130-4.
28. Danel V. Le bleu de méthylène. In: *Les antidotes*. Baud F, Barnot P, Riou B. Paris, Masson ed, 1992: 29-41.
29. Faivre M, Faivre J, Armand J. *Les méthémoglobinémies toxiques*. Paris, Masson ed, 1970: 23-74.
30. Fimielz P, Gendoo Z, Lataste A, Chuet C, Guiserix J. Methemoglobinemia and intravascular hemolysis in a patient with G6PD deficiency. *Nephron* 1992; 62: 242.
31. Matsuki T, Yubisui T, Tomoda A, et al. Acceleration of methemoglobin reduction by riboflavin in human erythrocytes. *Brit J Haematol* 1978; 39: 523-8.
32. Den Boer PJ, Bleeker WK, Rigter G, et al. Intravascular reduction of methemoglobin in plasma of the rat in vivo. *Biomat Art Cells Inmob Biotech* 1992; 20: 647-50.

APPROCHES EXPERIMENTALES DES MECANISMES RESPONSABLES DE LA VASOACTIVITE INDUITE PAR LES SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE

Divers mécanismes ont été proposés dans la littérature pour expliquer l'effet vasopresseur des HBOCs et tenter de le moduler. Au regard du nombre d'articles y faisant référence, l'interaction hémoglobine-monoxyde d'azote est décrite comme le principal mécanisme à l'origine de la réponse vasoconstrictrice. Toutefois, plusieurs auteurs ont montré récemment dans différents modèles, que cette interaction ne suffit pas à expliquer les modifications du tonus vasoconstricteur induites par les HBOCs (Rohlf's RJ. *et al.*, 1998 ; Doherty DH. *et al.*, 1998 ; Gulati A. *et al.*, 1998 ; Sakai H. *et al.*, 1998 ; Nolte D. *et al.*, 1997b ; Moisan S. *et al.*, 1998).

Afin d'étudier certains mécanismes éventuellement impliqués dans l'effet vasoconstricteur des HBOCs, nous avons utilisé des modèles expérimentaux permettant d'analyser les interactions de l'hémoglobine avec le compartiment cardiovasculaire à différents niveaux d'organisation :

- à l'échelle macroscopique, nous avons mis au point un modèle de mesure de la volémie chez le lapin.
- à l'échelle microscopique, nous avons étudié l'effet des solutions d'hémoglobine :
 - d'une part sur le contenu des vaisseaux , c'est-à-dire le plasma et les éléments figurés du sang, par des techniques d'analyse des propriétés rhéologiques du mélange sang + solutions d'hémoglobine chez le lapin ;
 - d'autre part sur le contenant, c'est-à-dire la paroi vasculaire :
 - par une technique immunohistochimique permettant d'analyser la pénétration de l'hémoglobine dans les différentes couches tissulaires d'un vaisseau de conductance (aorte) chez le cobaye.
 - par une technique de morphométrie dynamique permettant d'analyser les effets vasomoteurs de solutions d'hémoglobine sur des vaisseaux de résistance (artérioles mésentériques) chez le rat.

1 - Influence de deux solutions d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC et $\alpha\alpha$ -Hb) sur la volémie en situation d'hémodilution chez le lapin

L'expansion volémique, ou capacité d'un soluté à entraîner un accroissement de volume plasmatique supérieur au volume perfusé, est un des facteurs susceptible d'expliquer les modifications hémodynamiques engendrées par les solutions à base d'hémoglobine. Cette capacité est dépendante de la pression oncotique, elle-même proportionnelle à la concentration des molécules osmotiques actives présentes dans le soluté. Afin d'évaluer l'éventuelle influence des caractéristiques oncotiques des solutions administrées sur la répartition des liquides entre les différents compartiments de l'organisme, nous avons réalisé des mesures de volémie chez le lapin à la suite d'une hémodilution par échange transfusionnel partiel. Préalablement à la description de la méthode utilisée, nous tenons à reprendre ici quelques notions de physiologie.

L'eau totale représente 60% du poids du corps et se répartit en trois secteurs : intracellulaire (55%), interstitiel (37%) et plasmatique (8%). Les mouvements liquidiens à travers les membranes de ces trois secteurs dépendent des forces hydrostatiques et osmotiques en présence. Dans les conditions normales, le volume sanguin est maintenu par un équilibre entre deux régimes de pressions :

- les pressions hydrostatiques, capillaire et interstitielle, favorisant le passage de liquide du capillaire vers l'interstitium,
- les pressions oncotique, capillaire et interstitielle, développées par les protéines qui traversent la membrane des capillaires et rejoignent l'interstitium. Une partie de ces protéines regagne la circulation générale par le système lymphatique (figure 70).

Cet équilibre est classiquement décrit par la loi de Starling, qui illustre le flux net de liquide à travers la membrane capillaire (F):

$$F = K_f S(\Delta P_{\text{hyd}}) - \delta(\Delta P_{\text{onc}})$$

où K est la conductivité hydraulique de l'endothélium, S, la surface capillaire, δ , le coefficient de perméabilité du capillaire pour les macromolécules (compris entre 0 et 1), ΔP_{hyd} , le gradient de pression hydrostatique entre le capillaire et l'interstitium, et ΔP_{onc} , le gradient de pression oncotique entre le capillaire et l'interstitium. D'après cette loi, plus le ΔP_{hyd} est élevé, plus la diffusion du capillaire vers l'interstitium est grande et plus le ΔP_{onc} est élevé, plus l'échange osmotique de l'interstitium vers les capillaires est important. Toutefois, cette loi

déjà ancienne ne décrit l'équilibre liquidien que dans des conditions idéales et ne tient pas compte par exemple de la vasomotricité, paramètre modifiant les pressions intracapillaires (Michel CC., 1997).

L'expansion volémique est un critère de qualité des solutés couramment utilisés pour le remplissage vasculaire. L'effet immédiat est déterminé par la pression oncotique, ainsi les solutés iso-oncotiques ont un pouvoir de remplissage équivalent au volume perfusé et les solutés hyper-oncotiques produisent une expansion volémique supérieure. L'effet sur la volémie est également fonction de la rapidité de la perfusion et de l'état initial du sujet, normo- ou hypovolémique (dans notre cas de figure, nous verrons que ces deux paramètres n'interviennent pas).

Ainsi, nous avons particulièrement étudié l'effet sur la volémie des deux HBOCs hyper-oncotiques (Hb-Dex-BTC et $\alpha\alpha$ -Hb, voir Tableau IV, page 114) en comparaison à la solution iso-oncotique d'HEA (Tableau V, page 122).

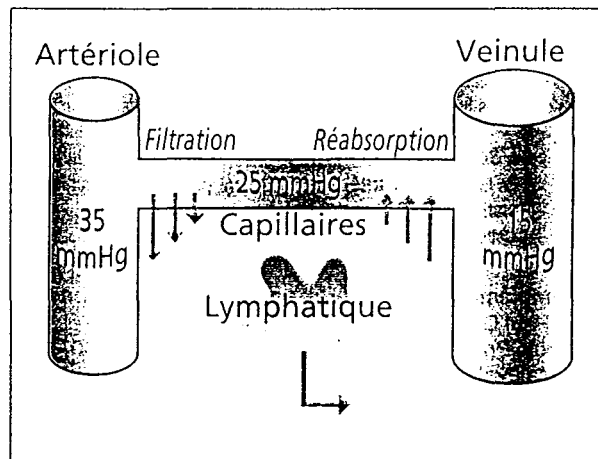
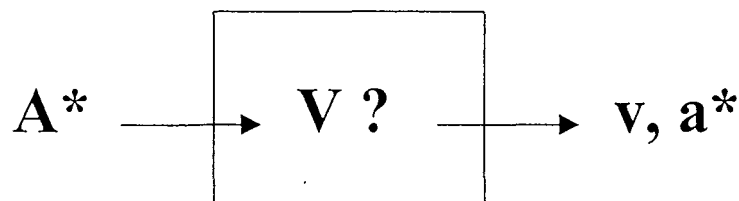


Figure 70 . Les mouvements liquidien à travers les membranes capillaires. D'après Nahon M. *et al.*, 1995.

1.1 - Théorie

La méthode utilisée pour mesurer la volémie repose sur le principe de dilution d'une molécule servant de traceur :



A*, représentant la radioactivité connue de la molécule injectée dans le volume V à déterminer, et a*, la radioactivité de la molécule mesurée à partir d'un volume v (prélevé du volume V après que A* soit diluée).

La détermination de V s'effectue simplement par calcul à partir de la concentration de radioactivité C* :

$$C^* = A^*/V = a^*/v \text{ d'où : } \boxed{V = (A^*/a^*).v} \quad (1).$$

Pour ces mesures, nous avons adapté la méthode de détermination de la masse sanguine employée dans un but diagnostique par le Dr. J-C. Mayer et le Pr. P-Y. Marie, dans le service de Médecine Nucléaire du Pr. Bertrand, au C.H.R.U. de Brabois (Vandœuvre-lès-Nancy, France).

1.2 - Matériels et méthodes

1.2.1 - Solution de sérumalbumine marquée à l'iode et matériel de mesure de la radioactivité

La molécule traceur utilisée étant la sérumalbumine marquée à l'iode 125 (Alb-¹²⁵I) à 5 µCi/mL (Cis Bio International, France), les expérimentations ont été réalisées dans des locaux adaptés à la manipulation de produits radioactifs. Les mesures de radioactivité ont été réalisées sur un compteur automatisé de type GAMMAmatic (Kontron Analytical, France). En résumé, l'énergie des émissions gamma ne pouvant être quantifiée directement, l'appareil détermine une différence de potentiel électrique correspondant à cette énergie après transformation des émissions gamma en photons puis en électrons. L'activité de l'échantillon est donnée en coups par unité de temps ; pour notre protocole les mesures ont été effectuées sur des périodes de 5 min.

1.2.2 - Préparation des animaux

Des lapins mâles néo-zélandais blancs de 2,2 à 3,2 kg (élevage La Garenne, Villey-Saint-Etienne, France) ont été utilisés pour les expérimentations. Avant les manipulations, les lapins ont séjourné en animalerie avec accès à la boisson et à la nourriture *ad libitum*. A la fin des expérimentations, les lapins ont été euthanasiés par injection i.v. de pentobarbital sodique (Sanofi Santé Animale, France) en excès, conformément aux règles d'éthique précédemment énoncées.

L'induction de l'anesthésie a été réalisée par insufflation dans une boîte hermétique d'un mélange à 5% d'halothane (Belamont, France) dans du carbogène (5% de CO₂, 95% d'O₂, Air Liquide Santé, France) à un débit de 8 L/min régulé par un débitmètre (système Gaultier, France). Après quelques minutes, les animaux ont été placés en décubitus dorsal et l'anesthésie a été maintenue au moyen d'un masque (4-5% d'halothane sous un débit de carbogène de 2 L/min). La mise en place d'une voie d'accès artérielle a été effectuée par l'artère fémorale droite selon le protocole décrit dans le chapitre "***Description du modèle expérimental de base***". L'extrémité libre du cathéter artériel a été glissée sous la peau pour émerger au niveau de la nuque où il a été suturé. Un accès veineux a été mis en place dans la veine marginale externe de l'oreille en introduisant un trocart en téflon de diamètre interne 0,5 mm et de diamètre externe 0,8 mm (Mosquito 123, Vygon, France) rempli de sérum physiologique hépariné. Après administration i.m. d'une dose de pénicilline (200000 UI/ kg ; Pénicilline G, Diamant, France), l'anesthésie a été arrêtée et les animaux placés dans une cage chauffée, jusqu'au moment des manipulations. La courte durée du protocole chirurgical (environ 45 min) a permis d'obtenir un réveil rapide des animaux. Pour les manipulations décrites ci-dessous, les lapins ont été placés en boîte à contention.

1.2.3 - Adaptation et validation de la méthode

La méthode de détermination de la volémie (ou de la masse sanguine) étant utilisée en clinique, son adaptation au lapin (division du poids corporel d'un facteur 30 environ) puis sa validation ont été nécessaires. Pour ce faire, la volémie a été mesurée à différents temps chez deux lapins témoins selon les étapes que nous allons détailler.

1.2.3.1 - Préparation de la solution étalon

La méthode de mesure faisant appel à des pesées dont la précision au microgramme conditionne les résultats, la préparation d'une solution étalon d'activité déterminée a été réalisée comme suit pour chaque flacon d'Alb-¹²⁵I. A chaque flacon de 1,5 mL d'Alb-¹²⁵I, on ajoute un volume de 4 mL de NaCl 0,9%. De ce mélange, 200 µL ont été prélevés et pesés au moyen d'une balance de précision pour déterminer la masse m_0 . A la suite de cette opération, le volume de 200 µL a été dilué 50 fois dans un ballon jaugé. A trois reprises, un échantillon de 1 mL de cette solution a été prélevé et son activité a été déterminée sur 5 minutes par le compteur GAMMAmatic. La moyenne des trois mesures a été calculée et, après soustraction

de l'activité due au bruit de fond, l'activité totale (A_T^*) de la solution diluée a été déterminée. L'activité de la solution d'Alb- ^{125}I diluée en NaCl 0,9% (A_S^*) par unité de masse, exprimée en $\text{cps} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, a alors été calculée en tenant compte du facteur de dilution selon la formule suivante :

$$A_S^* = (50 \times A_T^*)/m_0 \quad (2).$$

Cette activité a ensuite été utilisée pour le calcul de l'activité de la dose administrée A^* .

1.2.3.2 - Détermination de la volémie

Afin de mesurer le volume sanguin de l'animal, selon le principe théorique énoncé plus haut, la masse exacte de la dose initiale d'Alb- ^{125}I (m^*) injectée par voie i.v. a tout d'abord été déterminée en retranchant le poids de la seringue après injection du produit au poids de la seringue avant injection. Cette donnée nous a permis de calculer ensuite l'activité A^* de la dose administrée :

$$A^* = m^* \cdot A_S^* \quad (3).$$

Le prélèvement d'un échantillon sanguin artériel de volume v connu ($v=1 \text{ mL}$) a été réalisé 10 min après injection de la dose, ce délai permettant au produit de se répartir uniformément dans la circulation sanguine. L'activité du tube a_t^* a été mesurée au compteur et l'activité a^* a alors été calculée en tenant compte du bruit de fond au moment du comptage (BF^*) et du coefficient d'extravasation de l'Alb- ^{125}I (0,98) :

$$a^* = (a_t^* - \text{BF}^*)/0,98 \quad (4).$$

Le volume V est finalement déterminé après calcul de l'activité a^* de l'échantillon selon la formule (1).

N.B. : Le coefficient d'extravasation a permis de corriger la disparition de l'Alb- ^{125}I de la circulation, et donc la perte d'activité dans la circulation qui en résulte, entre le temps de l'injection et celui du prélèvement. Cette valeur a été déterminée chez le lapin lors de mesures pilotes, en effectuant des prélèvements espacés dans le temps à la suite de l'administration d'une dose unique.

D'un point de vue pratique, l'injection a été réalisée au moyen d'un système de chasse comme indiqué dans la figure 71. Cette opération a eu pour but d'éviter toute perte d'Alb- ^{125}I due au volume mort de la tubulure, source d'erreur potentielle dans la détermination de V , le volume de produit injecté étant faible (moins de 1mL). Par ailleurs, les prélèvements sanguins

artériels ont été réalisés sur tubes stériles héparinés (Hemogard[®] 5mL, Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe, France) conservés à 4°C jusqu'au moment du comptage. Et, afin d'avoir un bruit de fond identique pour une même expérimentation, le comptage des différents tubes a été effectué simultanément.

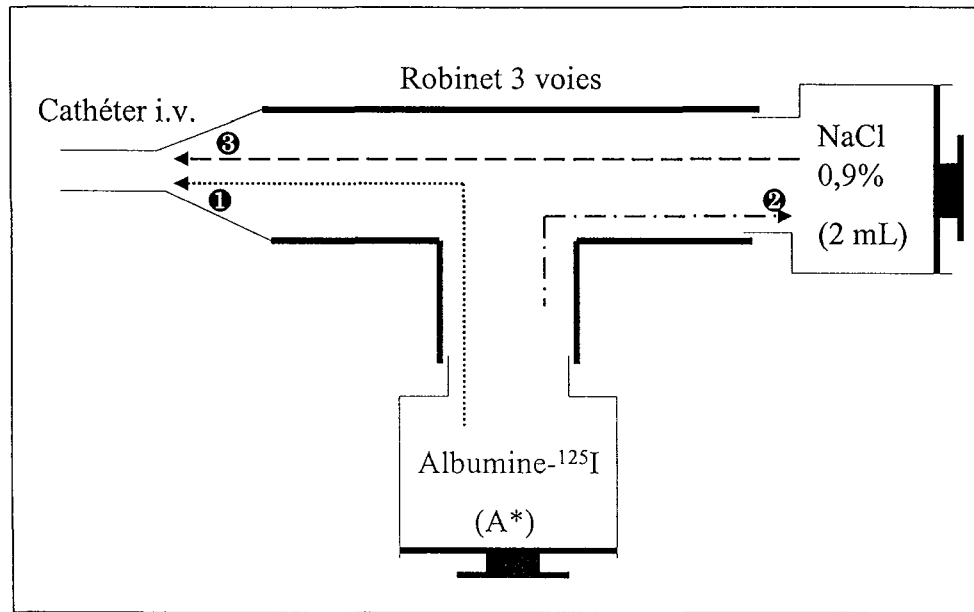


Figure 71. Schéma du montage utilisé pour l'injection i.v. de l'Albumine-¹²⁵I.
A : activité de la dose injectée ; ① : injection de la dose ; ② : reprise du volume mort contenant l'Alb-¹²⁵I dans du sérum physiologique ; ③ : injection du sérum physiologique et de l'Alb-¹²⁵I résiduelle.*

1.2.3.3 - Validation de la méthode

Pour valider la méthode, nous avons appliqué ce protocole chez deux animaux témoins en effectuant des mesures de volémie à des temps différents (t=0, 60, 120 et 180 min). Pour ce faire, les étapes décrites précédemment ont été répétées. Toutefois, l'administration itérative de produit radiomarqué a nécessité d'introduire une étape de calcul supplémentaire. L'opération a consisté à prélever un échantillon de sang artériel ou "prémix" cinq minutes avant une nouvelle injection de produit radiomarqué et d'en mesurer l'activité. Cette activité représente l'activité résiduelle due à l'injection précédente de produit dans la circulation ; sa valeur a été retranchée de l'activité mesurée sur le prélèvement sanguin suivant. Considérant la fuite d'Alb-¹²⁵I sur cinq minutes, le coefficient d'extravasation n'a pas été introduit dans le calcul. Les résultats de ces manipulations ont permis de montrer la bonne reproductibilité de la méthode dans le temps puisque les volumes obtenus se sont avérés identiques, aux erreurs de manipulation près (Tableau VII).

Tableau VII. Evolution de la volémie (V) au cours du temps chez 2 lapins témoins.

	Lapin n°1	Lapin n°2
t = 0 min	V = 147 mL	V = 156 mL
t = 60 min	V = 151 mL	V = 162 mL
t = 120 min	V = 148 mL	V = 158 mL
t = 180 min	V = 147 mL	V = 160 mL

Nous nous sommes donc proposés d'appliquer cette méthode à la détermination de la volémie en réponse à une hémodilution par échange transfusionnel partiel, comme il est proposé au paragraphe suivant.

1.3 - Application de la méthode à la mesure de la volémie faisant suite à une hémodilution avec Hb-Dex-BTC

Pour ces expérimentations, le protocole d'hémodilution a été le même que celui décrit dans la partie "*Adaptation du modèle à l'étude des effets cardiovasculaires induits par des solutions d'hémoglobine en situation d'hémodilution*". L'ETP a été initié cinq minutes après le prélèvement sanguin ayant servi à déterminer le volume pré-hémodilution ; le volume post-hémodilution a été déterminé après l'ETP.

N.B. : Les contraintes de la méthode (prémix et prélèvement 10 min après l'injection de la dose) ont conduit à déterminer la volémie au plus tôt vingt minutes après la fin de l'ETP.

Deux groupes d'animaux traités avec la solution d'Elohès® 6% (n=4 ; poids $2,62 \pm 0,10$ kg) ou d'Hb-Dex-BTC (n=4 ; poids $2,59 \pm 0,04$ kg) ont été constitués. Les caractéristiques de la solution d'Elohès® 6% ont été présentées dans le tableau V (page 122) ; les principales caractéristiques de la solution d'Hb-Dex-BTC ont été déterminées au Co-Oxymètre 682™ : tHb=8,2 g/dL et metHb<5%.

Après traitement statistique des données par ANOVA avec mesures répétées, nous avons observé une augmentation significative de la volémie de 7,25% avec Hb-Dex-BTC ($P=0,0397$) et une diminution non significative de 2,54% avec Elohès® ($P=0,2459$). Ces résultats sont présentés dans la figure 72.

Ces données mettent en évidence une expansion volémique limitée dans le cas d'Hb-Dex-BTC, alors que la solution d'HEA est sans effet sur la volémie dans ce modèle. L'effet de la solution d'Hb-Dex-BTC sur la volémie pourrait apporter un élément d'explication aux modifications hémodynamiques observées. Afin d'affiner cette hypothèse, la seconde partie

de l'étude a consisté à suivre l'évolution de la volémie dans le temps en réponse à l'hémodilution. Cette partie de notre travail est présentée au paragraphe suivant.

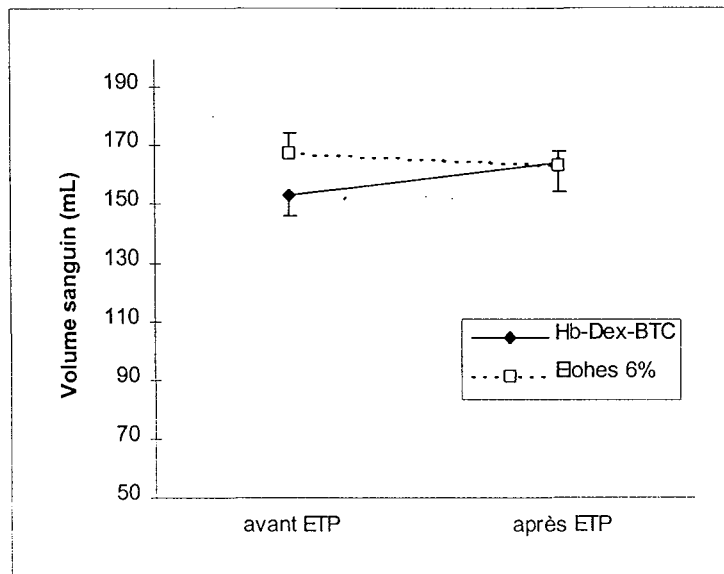


Figure 72. Evolution de la volémie chez le lapin après hémodilution par échange transfusionnel partiel (ETP) avec Elohes[®] 6% (n=4) et Hb-Dex-BTC (n=4). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

1.4 - Evolution de la volémie dans le temps à la suite d'une hémodilution avec Hb-Dex-BTC ou avec $\alpha\alpha$ -Hb

Afin de mettre en évidence une éventuelle relation causale entre les changements de volume sanguin et l'augmentation de résistance vasculaire à la suite de l'administration de solution à base d'hémoglobine, nous avons étudié en parallèle la volémie et la pression artérielle moyenne durant les deux heures suivant l'hémodilution. Les mesures de pression artérielle et le calcul de la PAM ont été réalisés selon la méthode proposée dans la partie "*Description du modèle expérimental de base*", sur des lapins vigiles placés en boîte à contention. Les calculs de volémie ont été réalisés selon la méthode décrite précédemment. Nous avons mesuré les deux paramètres avant l'ETP et aux temps 20, 60 et 120 min après la fin de l'ETP ; le détail du protocole est présenté dans la figure 73.

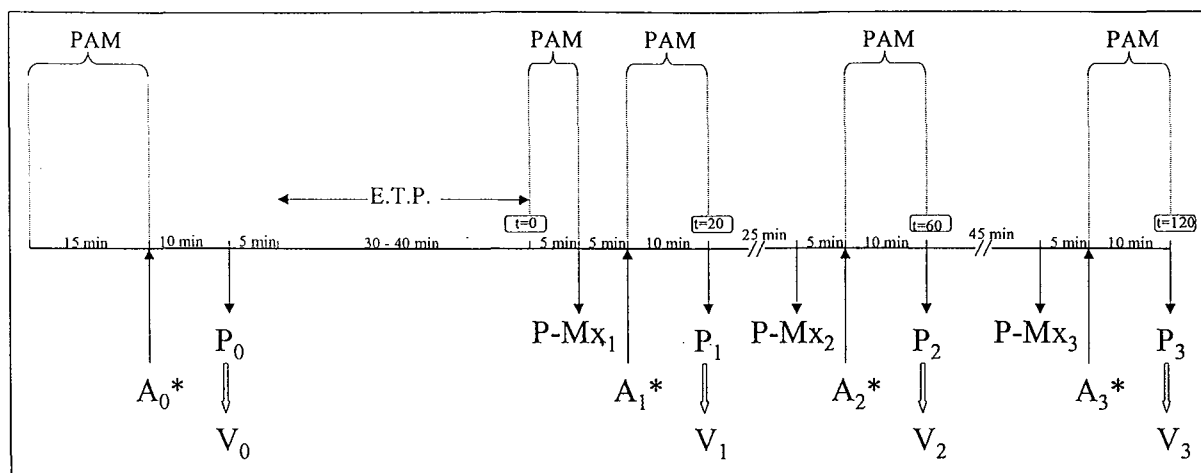


Figure 73. Représentation schématique du protocole expérimental permettant de suivre conjointement l'évolution de la volémie et de la pression artérielle moyenne à la suite d'une hémomodulation.

PAM : pression artérielle moyenne ; A_i^* : activité de la dose d'Alb-¹²⁵I injectée au temps i ; P_i : prélèvement au temps i ; V_i : volume sanguin au temps i ; $P-Mx_i$: prémix au temps i .

Pour cette étude, trois groupes d'animaux ont été constitués selon la solution administrée :

- groupe Elohès® 6% : n=4, poids $2,62 \pm 0,23$ kg
- groupe Hb-Dex-BTC : n=5, poids $2,43 \pm 0,12$ kg
- groupe α -Hb : n=5, poids $2,56 \pm 0,16$ kg.

Les caractéristiques physico-chimiques de l'Elohès® 6% ont été décrites dans le tableau V (page 122). Pour les deux HBOCs, les mesures au Co-Oxymètre 682™ ont donné les valeurs suivantes :

- Hb-Dex-BTC : tHb=8,2 g/dL, HbO₂=93,4%, metHb=4,6% et rHb=1,7% ;
- α -Hb : tHb= 7,9 g/dL, HbO₂= 92,6%, metHb= 5,6%, rHb= 2,2%.

Les comparaisons statistiques des données de pression artérielle et de volémie pré- et post-hémomodulation ont été effectuées par ANOVA avec mesures répétées et une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme significative.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 74. Ils indiquent que l'Elohès® 6% ne modifie significativement ni la PAM, ni la volémie. Les données sur la PAM sont en accord avec celles obtenues précédemment chez le lapin anesthésié. Les données sur la volémie sont plus difficiles à resituer par rapport à la littérature car, à notre connaissance, très peu de travaux ont abordé cette question. Il est toutefois connu que chez l'Homme, un

volume injecté de 500 mL induit une expansion volémique d'environ 150%, 120 minutes après son administration par voie i.v. (Baron J-F., 1992). Dans notre modèle, nous n'avons pas observé d'expansion volémique comparable mais, toutefois, nous avons obtenu un maintien du volume sanguin, ce qui fait de l'Elohès[®] une solution de référence. La stabilité de la volémie provient également du fait que la baisse de la concentration de l'Elohès[®] est insignifiante dans la période de temps considérée et qu'en conséquence, le nombre de molécules osmotiquement actives ne varie pas (Baron J-F., 1992).

Les données montrent que les deux solutions d'hémoglobine induisent un effet presseur plus transitoire que celui observé chez l'animal anesthésié. L'augmentation de pression est maximale dès la fin de l'injection de l' $\alpha\alpha$ -Hb (t=0) et à t=20 min pour Hb-Dex-BTC. Au temps t=60 min, la pression artérielle est revenue à sa valeur pré-hémodilution dans les deux cas. Dans les vingt premières minutes suivant l'échange transfusionnel, la volémie évolue de manière semblable pour les deux HBOCs. A partir du temps t=60 min, on observe une diminution du volume sanguin dans le groupe de l' $\alpha\alpha$ -Hb ; un phénomène du même ordre se produit plus tardivement, au temps t=120 min, dans le groupe Hb-Dex-BTC.

Au regard de ces résultats, il semble donc difficile d'établir un lien entre les modifications de volémie et les variations de pression artérielle avec les solutions testées.

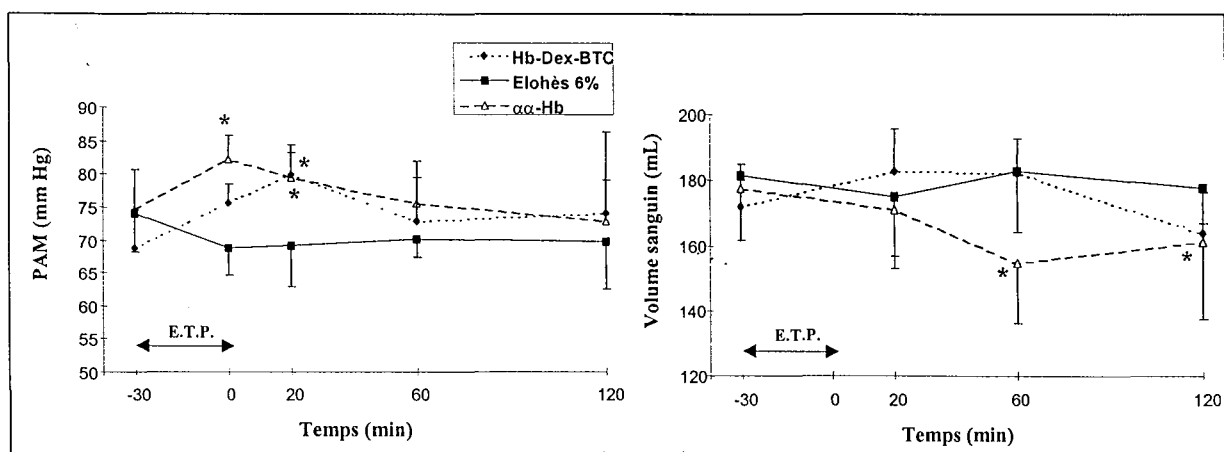


Figure 74. Evolution de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la volémie chez le lapin après hémodilution par échange transfusionnel partiel (ETP) avec Elohes[®] 6% (n=4), Hb-Dex-BTC (n=5) et $\alpha\alpha$ -Hb (n=5). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

* : $P < 0,05$ pré-ETP vs. les différents temps post-ETP.

1.5 - Conclusions

1.5.1 - *Sur la méthode*

Nous avons obtenu, sur l'ensemble des animaux (n=28), une valeur moyenne de la volémie (avant échange transfusionnel) équivalente à 6,74% du poids corporel, donc très proche des données de la littérature, généralement 6,5% (Mitruka BM. *et al.*, 1977). La figure 75 montre que les valeurs de volume sanguin en fonction du poids corporel sont réparties de manière homogène et traduit donc la bonne reproductibilité de la méthode.

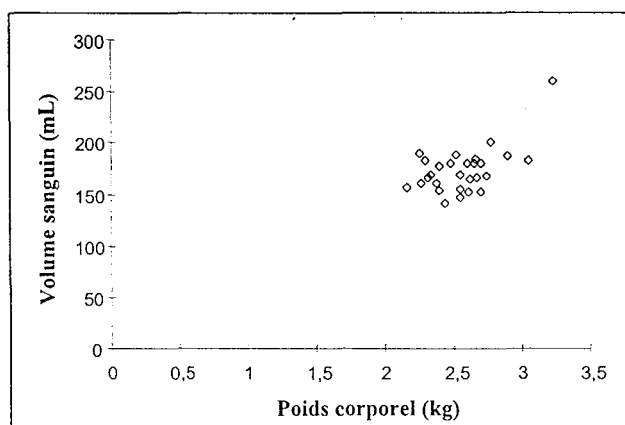


Figure 75. Représentation graphique de la volémie en fonction du poids corporel chez le lapin. Résultats obtenus sur l'ensemble des animaux (n=28).

1.5.2 - Sur les données

Cette deuxième série de manipulations a permis de retrouver des valeurs de volémie après ETP avec Hb-Dex-BTC et Elohès® similaires à celles obtenues au cours de la mise au point de la méthode.

Des travaux *in vitro* ont montré l'influence de la nature de la modification chimique apportée à l'hémoglobine sur la pression osmotico-colloïdale des solutions et l'hypothèse d'un effet sur la répartition des fluides dans l'organisme a été proposée (Vandegriff KD. *et al.*, 1997). La comparaison de deux HBOCs dans notre modèle n'a pas révélé, dans les 20 premières minutes suivant l'ETP, d'expansion volémique plus marquée pour Hb-Dex-BTC que pour $\alpha\alpha$ -Hb, qui possède pourtant la pression oncotique la plus importante. En revanche, le maintien de la volémie s'est révélé moins durable avec l' $\alpha\alpha$ -Hb, puisque l'on observe une diminution du volume sanguin dès 60 minutes. Des résultats similaires ont été obtenus avec l' $\alpha\alpha$ -Hb dans un modèle de mesure du volume sanguin chez le rat après échange transfusionnel isovolémique de 50%, par une technique de dilution du bleu Evans (Migita R. *et al.*, 1997). Dans cette étude, les auteurs ont montré que le volume sanguin est plus élevé

chez les animaux traités avec de l'hémoglobine conjuguée au PEG, du fait de la forte pression oncotique de la solution, que chez les animaux traités avec l' $\alpha\alpha$ -Hb.

La diminution de volume sanguin observée dans le groupe $\alpha\alpha$ -Hb peut provenir d'une extravasation des molécules d'hémoglobine modifiée qui constituent la solution. Ce phénomène a été décrit depuis longtemps dans la littérature et il est établi que le taux d'extravasation est plus important pour les hémoglobines de petite taille que pour les hémoglobines conjuguées ou polymérisées (Abassi Z. *et al.*, 1997 ; Nakaï K. *et al.*, 1996 ; Nakaï K. *et al.*, 1998). Cette hypothèse permet d'expliquer que, dans le cas de l' $\alpha\alpha$ -Hb, la volémie diminue plus rapidement que pour Hb-Dex-BTC. Cette différence d'évolution pourrait donc être le fait de la nature chimique et de la demi-vie plasmatique de ces deux solutions. Nous avons en effet estimé la demi-vie de l' $\alpha\alpha$ -Hb à 4 heures et celle de Hb-Dex-BTC à 6 heures dans les expérimentations décrites précédemment (voir figure 57).

En dépit d'effets différents des deux solutions d'hémoglobine testées sur la volémie, notre modèle ne permet pas d'affirmer que ces solutions modifient la pression artérielle et plus généralement l'hémodynamique via un mécanisme impliquant leurs caractéristiques oncotiques. L'implication d'autres mécanismes a été étudiée au moyen de modèles différents ; ces travaux sont présentés dans les paragraphes suivants.

2 - Comportement rhéologique de trois solutions d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC, $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™) en situation d'hémodilution chez le lapin

Comme nous l'avons annoncé au chapitre précédent, l'hémodilution conduit à des modifications importantes des paramètres hémorhéologiques pouvant expliquer en partie les changements hémodynamiques observés. Afin de mieux définir l'impact des propriétés rhéologiques des solutions d'hémoglobine testées dans notre modèle, nous avons analysé, par des méthodes *ex vivo*, la viscosité cinématique des solutions, la viscosité du mélange sang/solution d'hémoglobine et les paramètres d'agrégation et de déformabilité des globules rouges en situation d'hémodilution.

2.1 - Rappels d'hémorhéologie

La rhéologie est la science des déformations et de l'écoulement de la matière et l'hémorhéologie étudie les propriétés rhéologiques du sang. Le sang est constitué de globules

rouges, de plaquettes et de globules blancs en suspension dans le plasma. Normalement, ce sont les hématies qui, par leur nombre, déterminent les propriétés rhéologiques du sang. Les plaquettes se déplacent à la même vitesse que les globules rouges alors que les globules blancs, du fait de leur tendance à adhérer aux parois vasculaires, se déplacent plus lentement que les hématies. Le comportement rhéologique des globules rouges est lié à deux de leurs propriétés, l'agrégabilité et la déformabilité.

Dans tous les microvaisseaux, sauf dans les artérioles et les capillaires où les contraintes exercées par le flux sont trop fortes, les globules rouges s'agrègent réversiblement entre eux pour former des rouleaux, pouvant eux-mêmes être organisés en réseaux. Cette agrégation provoque à la fois le rassemblement des hématies dans l'axe de l'écoulement du sang et la formation d'une couche plasmatique périphérique dépourvue de cellules qui joue le rôle de lubrifiant.

L'hématie est pourvue à la face interne de sa membrane d'un cytosquelette constitué d'actine et de spectrine qui lui permettent de se déformer pour traverser les capillaires dont le diamètre peut atteindre 3 à 4 μm .

L'augmentation de l'agrégabilité (diabète, hypertension) et la diminution de la déformabilité (drépanocytose) érythrocytaires sont à l'origine d'une diminution de débit microcirculatoire (Chabanel A. *et al.*, 1995). L'analyse de ces deux paramètres pourrait donc contribuer à expliquer les modifications hémodynamiques engendrées par les solutions d'hémoglobine.

La viscosité, autre paramètre pouvant être impliqué (cf. relation de Poiseuille), est définie comme la caractéristique qu'ont les fluides d'engendrer des forces de cisaillement lorsqu'ils sont mis en mouvement. Elle traduit la résistance de friction que le fluide en mouvement oppose à une force de cisaillement. On distingue les fluides newtoniens pour lesquels la viscosité est constante et la vitesse de déformation proportionnelle à la contrainte de cisaillement et les fluides non newtoniens pour lesquels la viscosité est fonction de la contrainte de cisaillement.

Dans ce travail, nous avons mesuré la viscosité selon les méthodes décrites ci-dessous :

- d'une part pour des fluides newtoniens, le plasma, l'albumine, l'Elohès® 6% et les solutions d'hémoglobine,
- et d'autre part pour un non newtonien, le sang en présence ou non de ces substituts.

2.2 - Matériels et méthodes

2.2.1 - *Appareils de mesure de la viscosité*

Deux types de mesures de viscosité ont été réalisées, selon la catégorie du fluide étudié. Pour les mesures de la viscosité (dite cinématique) des fluides newtoniens testés, un viscosimètre automatique à capillaire (Viscomatic VCD, AMTEC, Villeneuve-Loubet, France) a été utilisé. La viscosité cinématique correspond au rapport de la viscosité dynamique du fluide et de sa masse volumique. Le viscosimètre mesure automatiquement le temps d'écoulement d'un fluide dans un capillaire calibré entre deux repères définis optiquement. Cette mesure du temps est équivalente, à une constante près, à la mesure de la viscosité cinématique ν exprimée en centiStokes (cSt).

Pour les mesures de viscosité du sang avant et après hémodilution (fluide non newtonien), un rhéomètre rotatif (Low Shear 30, Contraves, Zürich, Suisse) fonctionnant d'après le principe de Couette (figure 76) a été utilisé. Le fluide est placé entre deux cylindres coaxiaux, de hauteur identique h et de rayons R et r , dans un espace annulaire d'épaisseur e très petite ($e \ll R$). Si le cylindre extérieur tourne à une vitesse Ω , le cylindre intérieur finit par tourner à la même vitesse angulaire au bout d'un temps donné et, pour l'arrêter, il faut lui appliquer un couple C de sens opposé au déplacement. Au sein de l'espace annulaire, le fluide se déplace à une vitesse non uniforme, la paroi du cylindre extérieur et les couches lui adhérent se déplaçant à la même vitesse. Les couches intermédiaires se déplacent avec des vitesses u proportionnelles à leur distance de la paroi du cylindre intérieur. Connaissant le couple de réaction C nécessaire à immobiliser le cylindre intérieur, on en déduit la force correspondante :

$$F = C / r = \mu.R.\Omega.S / e$$

S étant la surface de frottement et μ , la viscosité dynamique du fluide.

L'expérience de Couette montre que l'on obtient finalement une relation entre la viscosité dynamique (en Pa.sec), τ , la contrainte de cisaillement (en sec^{-1}) et γ , le gradient de vitesse de cisaillement :

$$\mu = \tau / \gamma$$

Pour nos mesures, nous avons utilisé un gradient de vitesse couvrant une plage de 0,5 à 128 sec^{-1} , valeurs extrêmes mimant respectivement les conditions d'écoulement dans les vaisseaux

de faible calibre (petites artères et artéριοles) et dans les vaisseaux de conductance (grosses artères).

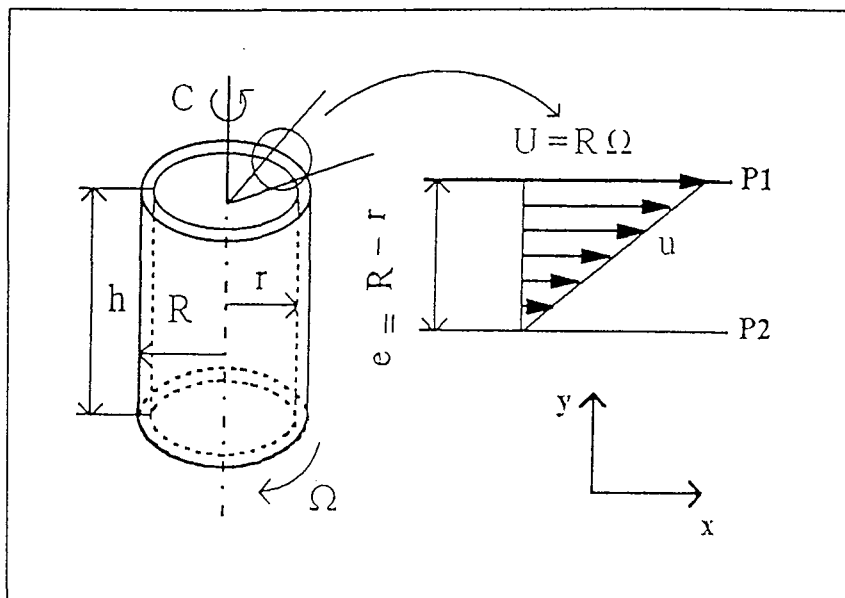


Figure 76. L'expérience de Couette. D'après René F., La rhéologie en biotechnologie. *Biofutur* 1997;167:3-7. Explications dans le texte.

2.2.2 - Appareil de mesure de l'agrégabilité des globules rouges

L'agrégabilité des globules rouges, en présence ou non des solutions utilisées pour l'hémomodulation, a été déterminée au moyen d'un érythro-agrégamètre (SEFAM, Vandœuvre-lès-Nancy, France) dont le principe est basé sur l'analyse de la lumière rétrodiffusée par une suspension sanguine éclairée par un faisceau laser (Donner M. *et al.*, 1988). L'appareil consiste en un viscosimètre de type Couette transparent éclairé par une diode laser émettant dans le proche infra-rouge. La vitesse de rotation du cylindre extérieur est réglable et permet d'appliquer des vitesses de cisaillement variables. L'agrégation érythrocytaire est étudiée par une approche statique permettant de déterminer la cinétique d'agrégation à l'arrêt. Pratiquement, le sang est soumis à une vitesse de cisaillement d'un niveau tel que les hématies sont dissociées et orientées. L'intensité du flux lumineux rétrodiffusé est notée. La contrainte étant stoppée brusquement, on enregistre une augmentation puis une diminution de l'intensité du flux. A partir de la courbe obtenue (figure 77), on peut déterminer le temps primaire (t_A) correspondant à la réorganisation des hématies juste après l'arrêt du cylindre (inverse de la pente de la courbe entre 0,5 et 2 secondes après la fin de l'arrêt du cisaillement), le temps final

(t_F) correspondant à l'agrégation complète des hématies (lorsque la lumière rétrodiffusée ne varie plus) et l'indice d'agrégation à 10 secondes ou S_{10} (rapport de la surface au-dessus la courbe pendant les 10 premières secondes suivant l'arrêt du cisaillement à la surface totale durant cette période). Cet indice augmente avec la vitesse d'agrégation érythrocytaire.

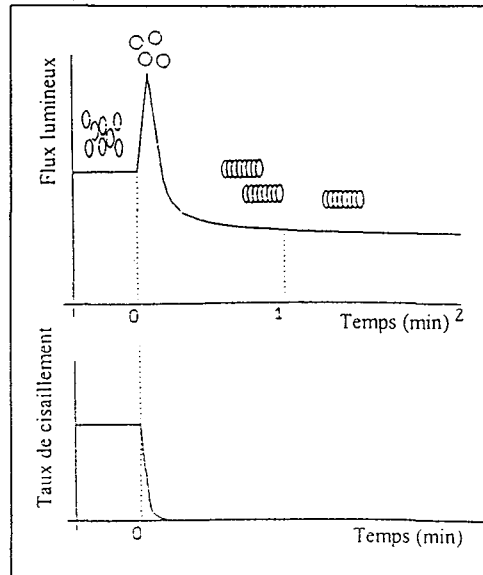


Figure 77. Principe de la détermination des paramètres de la cinétique d'agrégation. D'après Donner M. *et al.*, 1988).

2.2.3 - Appareil de mesure de la déformabilité des globules rouges

La déformabilité des globules rouges, en présence ou non des solutions utilisées pour l'hémomodulation, a été déterminée au moyen d'un ektacytomètre de type LORCA (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer, AMC, Amsterdam, Pays-Bas). L'ektacytométrie nécessite le même montage que l'érythro-agrégamétrie. Un rayon laser traverse une suspension sanguine diluée au $1/200^e$ placée dans le viscosimètre et le rayon diffracté par les hématies est visualisé sur un écran. Au repos, l'image diffractée est circulaire et lorsqu'on impose une vitesse de cisaillement, les hématies se déforment et l'image devient elliptique. Le rapport entre le grand axe et le petit axe de l'ellipse ou index d'élongation donne la mesure de la déformabilité érythrocytaire. Ce rapport augmente avec la vitesse de cisaillement.

2.2.4 - Protocole expérimental

Pour cette étude, des lapins mâles néo-zélandais blancs de 2,4 à 2,7 kg (élevage La Garenne, Villey-Saint-Etienne, France) ont été utilisés. Avant les manipulations, les lapins ont séjourné en animalerie avec accès à la boisson et à la nourriture *ad libitum*. A la fin des expérimentations, les lapins ont été euthanasiés par injection i.v. de pentobarbital sodique

(Sanofi Santé Animale, France) en excès, conformément aux règles d'éthique précédemment énoncées.

Les animaux ont été instrumentés avec un cathéter artériel carotidien selon le protocole décrit dans l'article joint en annexe 3 et répartis de façon aléatoire selon la solution infusée. Quatre solutions ont été utilisées pour l'hémodilution : albumine et Elohès 6% pour les solutions de référence et Hb-Dex-BTC et Hemolink™ pour les HBOCs. Leurs caractéristiques sont celles qui ont été présentées au chapitre précédent (voir tableaux IV et V, pages 114 et 122). L'hémodilution a conduit à une réduction de l'hématocrite artériel à 30%.

Les manipulations ont consisté à mesurer les différents paramètres hémorhéologiques décrits ci-dessus sur des échantillons de sang artériel prélevé sur EDTA 5% (poids/volume) à différents temps post-hémodilution (30, 90 et 180 minutes). Pour chaque individu, les valeurs post-hémodilution ont été comparées à celles obtenues avec du sang contrôle, provenant de la dilution du sang de l'animal avec son propre plasma pour atteindre une valeur d'hématocrite de 30%. Cette opération permet de comparer les paramètres dans des conditions similaires.

2.3 - Résultats

2.3.1 - Agrégabilité érythrocytaire

L'analyse de l'agrégabilité érythrocytaire par l'indice à 10 secondes (S_{10}) montre une différence marquée entre l'influence de la solution Hb-Dex-BTC et celles des trois autres produits (figure 78). L'augmentation de la valeur de S_{10} avec Hb-Dex-BTC indique que l'agrégation érythrocytaire est plus rapide que dans les conditions normales en présence de cette solution. A l'inverse, l'agrégation est plus lente dans le cas des solutions d'albumine, d'Elohès® et à un degré moindre avec la solution d'Hemolink™.

Ces résultats sont confirmés par la mesure du t_f (figure 78) qui indique que l'agrégation complète des hématies est atteinte plus rapidement que dans les conditions normales avec la solution Hb-Dex-BTC et, inversement, plus lentement avec les autres solutions.

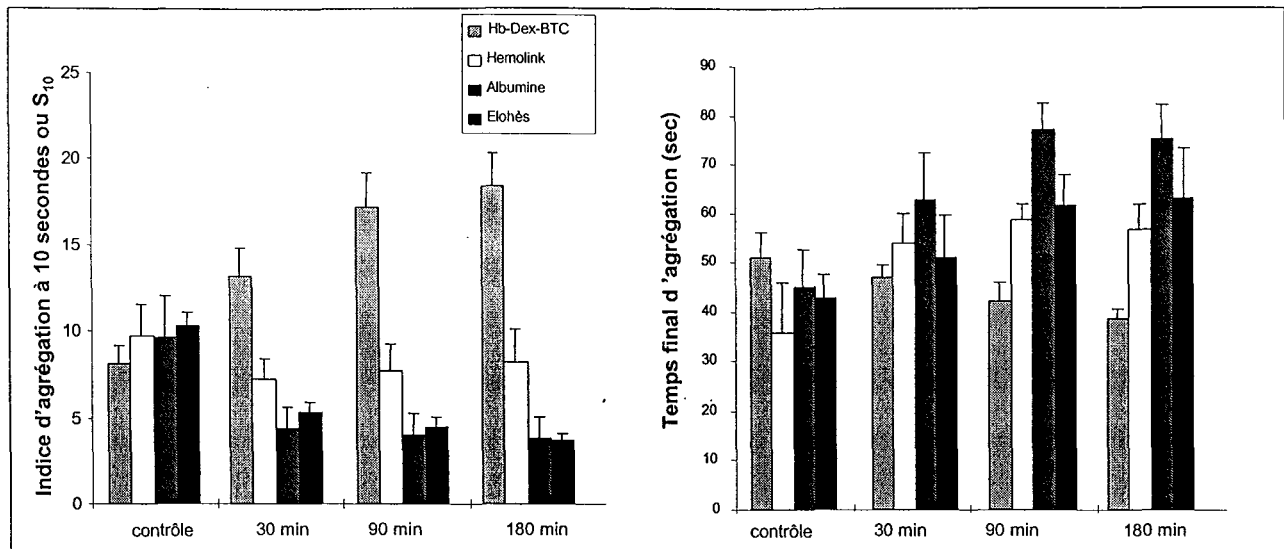


Figure 78. Variations de l'indice d'agrégation à 10 secondes (S_{10}) et du temps final d'agrégation après hémodilution avec Hb-Dex-BTC (n=6), HemolinkTM (n=6), albumine (n=5) et Elohès (n=6). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm 1 e.s.m.

Les résultats suggèrent donc que les deux solutions d'hémoglobine perfusées ont un effet inverse sur les paramètres de l'agrégation érythrocytaire. Une hyper-agrégabilité érythrocytaire a déjà été observée en présence de macromolécules (dextran 80, haptoglobine, fibrinogène) et pourrait en partie expliquer les résultats obtenus avec Hb-Dex-BTC (Weng X. *et al.*, 1996). Elle serait due à des mécanismes spécifiques, c'est-à-dire des interactions des macromolécules en suspension avec les récepteurs membranaires des globules rouges, et à des mécanismes non spécifiques, comme des modifications de l'adhésion par insinuation de macromolécules entre érythrocytes adjacents (Weng X. *et al.*, 1996). L'effet hyper-agrégant n'est pas anodin puisqu'il peut conduire à des modifications telles que :

- une diminution du débit sanguin dans les vaisseaux post-capillaires,
- une diminution de l'hématocrite dans les capillaires,
- une augmentation de la résistance périphérique,
- une détérioration des apports en oxygène aux tissus,
- une tendance au développement de thromboses veineuses,
- des modifications d'autres paramètres rhéologiques, à savoir déformabilité érythrocytaire et viscosité (Stoltz J-F. *et al.*, 1999).

Ce dernier point va être envisagé dans les paragraphes suivants.

2.3.2 - Déformabilité érythrocytaire

Les mesures de l'index d'élongation à différentes vitesses de cisaillement (0,2-128 sec^{-1}) n'ont révélé aucune différence avant et après hémodilution, quelle que soit la solution administrée. Ces observations sont résumées dans la figure 79 avec l'exemple de deux valeurs de cisaillement, correspondant à l'écoulement sanguin dans des vaisseaux de gros et de faible calibres. On observe que dans les conditions de contrôle, l'index d'élongation varie proportionnellement avec la vitesse de cisaillement (0,52 pour 17 sec^{-1} et 0,6 pour 53 sec^{-1}). A la suite de l'injection des solutions, la déformabilité érythrocytaire n'est pas influencée, quelles que soient les conditions d'écoulement considérées.

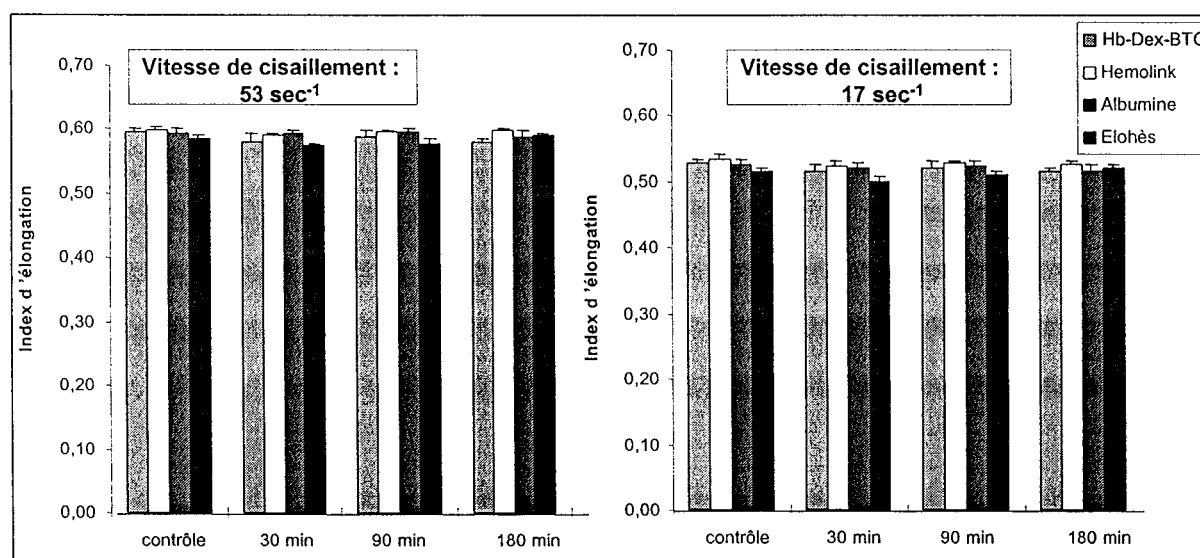


Figure 79. Déformabilité érythrocytaire mesurée par l'index d'élongation à deux vitesses de cisaillement (53 et 17 sec^{-1}) à différents temps post-hémodilution. Les valeurs sont données en moyenne \pm 1 e.s.m., avec n=5 pour chaque groupe.

Ces résultats montrent que les solutions testées n'ont pas d'influence sur la déformabilité érythrocytaire en situation d'hémodilution. Ils suggèrent en particulier que les changements d'agrégation observés avec Hb-Dex-BTC n'interviennent pas sur ce paramètre rhéologique.

Nous allons à présent envisager l'effet des solutions sur la viscosité cinématique et dynamique.

2.3.3 - Viscosité cinématique

Les résultats de ces mesures sont présentés dans les tableaux IV et V (pages 114 et 122). Ainsi, on peut répartir les solutions en deux catégories, les solutions Hemolink™ et d'albumine qui ont des viscosités à 37°C comparables à celle du plasma de lapin (environ 0,9

cSt) et les solutions Hb-Dex-BTC et Elohès® qui possèdent des viscosités supérieures, proches de 2 cSt.

2.3.4 - Viscosité dynamique

Le rhéogramme A de la figure 80 indique qu'aux vitesses de cisaillement élevées (128 sec^{-1}), conditions mimant l'écoulement dans les vaisseaux de conductance, la viscosité du sang hémodilué est peu différente d'un groupe à l'autre. Au contraire, aux faibles vitesses de cisaillement ($0,2 \text{ sec}^{-1}$), conditions mimant l'écoulement dans les vaisseaux de résistance, la viscosité du sang hémodilué est fonction de la viscosité intrinsèque des solutions administrées (voir tableaux IV et V, pages 114 et 122). On peut classer les solutions selon la séquence suivante :

Hb-Dex-BTC > Elohès > Hemolink™ > Albumine.

L'analyse *ex vivo* de la viscosité montre qu'il existe une différence significative ($P < 0,001$, test PLSD Fischer) entre la solution Hb-Dex-BTC et les trois autres solutions, différence qui est surtout marquée pour la plus faible vitesse de cisaillement (rhéogrammes B,C et D de la figure 80).

Ces résultats suggèrent que l'effet de la viscosité intrinsèque des solutions est différent selon les conditions d'écoulement et que la solution d'Hb-Dex-BTC induit les plus importantes modifications rhéologiques après hémodilution. Ceci peut s'expliquer par l'influence de cette solution sur l'agrégation érythrocytaire puisque nous avons vu que la solution d'Hb-Dex-BTC favorise ce phénomène.

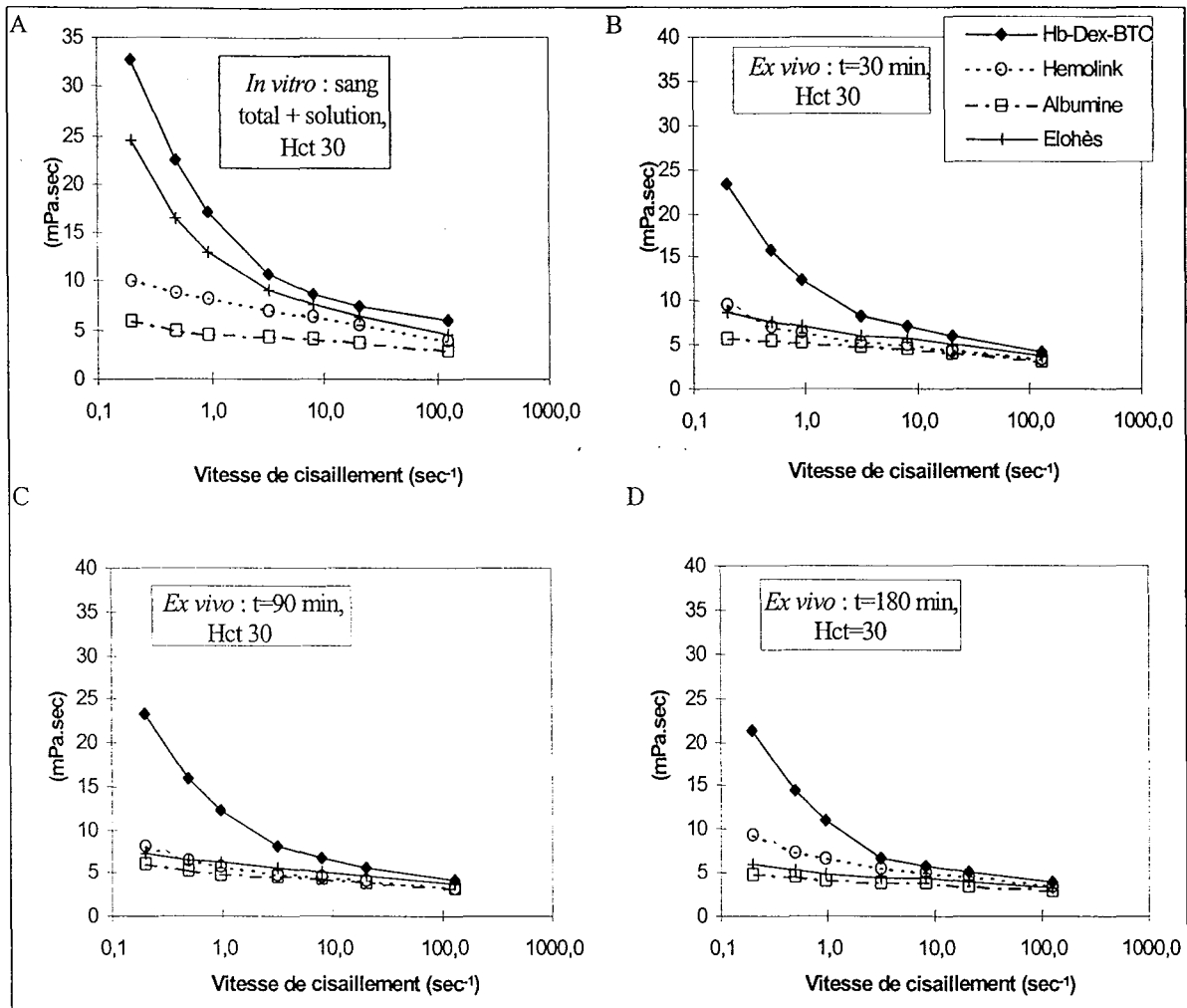


Figure 80. Variations de la viscosité dynamique du sang hémodilué (hématocrite 30%), exprimée en mPa.sec, en fonction de la vitesse de cisaillement *in vitro* et *ex vivo*. Les valeurs sont exprimées en moyenne, avec n=7 pour Elohès[®] et n=6 pour Hb-Dex-BTC, albumine et Hemolink[™].

2.4 - Conclusions

L'étude montre que les propriétés hémorhéologiques *ex vivo* du sang artériel sont diversement affectées par les solutions dans une situation d'hémodilution similaire. Ceci suggère donc que les solutions induisent par elles-mêmes des effets sur le comportement rhéologique des cellules sanguines, et que ceux-ci ne sont pas seulement le résultat de la réduction de l'hématocrite. Il n'est toutefois pas possible d'établir un lien direct entre les changements rhéologiques et les modifications macrohémodynamiques sur la base de cette étude. Pour des conditions d'hémodilution semblables (hématocrite 30%), nous avons en effet observé:

- des variations de pression et de résistance similaires pour les solutions de référence alors que leurs viscosités intrinsèques diffèrent ;

- des variations de pression et de résistance similaires pour les solutions d'hémoglobine alors que leurs viscosités intrinsèques diffèrent.

Il semble donc que l'impact des propriétés rhéologiques des solutions d'hémoglobine soit masqué par leurs effets sur le tonus vasculaire puisque nous avons obtenu :

- des variations de pression et de résistance opposées avec la solution d'albumine d'une part et les solutions $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™ d'autre part, alors que leurs viscosités intrinsèques sont similaires ;

- et des variations de pression et de résistance inverses entre Hb-Dex-BTC et Elohès® alors que leurs viscosités intrinsèques sont similaires.

Il serait donc intéressant de parvenir à définir l'impact des propriétés rhéologiques des solutions sur l'écoulement sanguin dans les vaisseaux de plus faible calibre, et donc au final sur l'oxygénation tissulaire, en particulier, dans le cas de la solution Hb-Dex-BTC qui modifie de manière importante l'agrégation érythrocytaire et la viscosité du sang. La réponse à cette question nécessite sans doute le recours à d'autres méthodologies car les phénomènes hémorhéologiques microcirculatoires sont influencés par des facteurs liés à l'hémodilution, mais aussi par le pouvoir oxyphorique des solutions d'hémoglobine (Intaglietta M. *et al.*, 1996). Il a par exemple été montré qu'à hémocrite 30% et en présence de solutions d'hémoglobine ($\alpha\alpha$ -Hb et bovine polymérisée), la densité des capillaires fonctionnels diminue par un effet "micro-hémocrite" dû à l'hémodilution. Parallèlement, dans les mêmes conditions, une constriction artériolaire immédiate et transitoire survient, d'après les auteurs, en réponse à un apport d'oxygène excessif par rapport à la demande métabolique (Botzlar A. *et al.*, 1996 ; Nolte D. *et al.*, 1997a ; Nolte D. *et al.*, 1997b).

L'influence des propriétés rhéologiques des HBOCs sur l'hémodynamique est complexe car elle fait intervenir plusieurs mécanismes interdépendants qui, de plus, se traduisent différemment selon le lit vasculaire considéré. Elle ne se traduit toutefois pas au niveau de la macrocirculation et ne constitue donc pas un élément permettant d'expliquer les variations hémodynamiques observées. L'implication d'autres mécanismes a été étudiée et est proposée dans les paragraphes qui suivent.

3 - Interaction d'une solution d'hémoglobine modifiée (Hb-Dex-BTC) avec l'endothélium vasculaire, mise en évidence par une méthode immunohistochimique chez le cobaye

L'un des mécanismes permettant d'expliquer l'effet presseur de l'hémoglobine acellulaire est son interaction avec le monoxyde d'azote, NO. De nombreux auteurs en ont apporté la preuve expérimentale et ont conclu que cette interaction se situait dans la lumière vasculaire et dans l'espace sous-endothélial en raison de l'extravasation de l'hémoglobine acellulaire (Abassi Z. *et al.*, 1997 ; Nakai *et al.*, 1998). Toutefois, l'interaction de l'hémoglobine au sein même de la cellule endothéliale n'a, à notre connaissance, jamais été envisagée. Or, cette proposition pourrait permettre d'expliquer l'interaction de l'hémoglobine acellulaire avec d'autres facteurs endothéliaux, tels que l'endothéline-1 et les dérivés de l'acide arachidonique.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons cherché à détecter la présence d'hémoglobine dans la paroi de l'aorte de cobayes ayant subi un échange transfusionnel de 50% de leur volume sanguin avec une solution d'hémoglobine humaine modifiée chimiquement, Hb-Dex-BTC. Dans un second temps, nous avons voulu vérifier si l'interaction Hb-NO était requise pour qu'une éventuelle pénétration de l'hémoglobine dans la cellule endothéliale ait lieu. Pour ce faire, les animaux ont été traités au L-NAME, inhibiteur spécifique de la voie de synthèse de NO, préalablement à l'administration de la solution d'Hb-Dex-BTC.

3.1 - Matériels et méthodes

La méthode est présentée dans l'article joint en annexe 4.

Un protocole d'immuno-marquage en trois étapes a été appliqué à des portions d'aorte fixées *in situ* 30 minutes après la fin de l'échange transfusionnel, temps pour lequel l'effet hypertenseur de la solution d'hémoglobine est maximal (figure 1 de l'article). Des anticorps primaires anti-hémoglobine ont été obtenus après immunisation de lapins néo-zélandais, selon une technique éprouvée au laboratoire. Par des méthodes ELISA, nous avons montré que ces anticorps étaient spécifiques à l'hémoglobine humaine, aucune réaction croisée avec l'hémoglobine de cobaye n'ayant été observée.

Les étapes du protocole ont consisté successivement en :

- l'application de l'anticorps primaire (dilué au 1:200^e) sur les coupes d'artères prétraitées au sérum de chèvre afin de minimiser la fixation non spécifique ;
- l'incubation des préparations en présence d'un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre l'anticorps primaire (IgG de chèvre anti-IgG de lapin) ;
- l'incubation des préparations en présence d'avidine conjuguée à la phosphatase alcaline qui permet le marquage du complexe anticorps primaire/anticorps secondaire.

Pour visualiser ce complexe, le *p*-nitrophényl phosphate, substrat de la phosphatase alcaline, a été ajouté. Pour terminer, les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline afin de contraster les détails nucléaires.

3.2 - Résultats

Cette étude a permis de mettre clairement en évidence la présence d'hémoglobine à l'intérieur des cellules endothéliales à la suite de l'injection d'un HBOC (figure 2 de l'article). Le léger marquage obtenu dans l'adventice serait le fait de la révélation d'hémoglobine dans les nombreux *vasa vasorum* qui y débouchent (figure 2A). Enfin, la présence d'hémoglobine n'a pas été révélée dans la média à ce temps.

Le prétraitement des animaux avec une dose de L-NAME permettant de bloquer totalement la synthèse endothéliale de NO, s'est avéré sans effet sur la pénétration de l'hémoglobine, montrant ainsi que l'interaction Hb-NO n'est pas requise pour l'internalisation de l'hémoglobine (figure 2B).

3.3 - Conclusions

Ces résultats proposent une nouvelle orientation dans l'approche des mécanismes impliqués dans l'effet vasoconstricteur des solutions à base d'hémoglobine. Ils suggèrent en effet que l'interaction de l'hémoglobine avec NO peut se produire sur le lieu de production de ce dernier, la cellule endothéliale, et pas seulement sur les sites d'action (lumière vasculaire et média où il active la guanylyl cyclase) comme il a été proposé. De plus, la présence d'hémoglobine acellulaire au sein de la cellule endothéliale pourrait expliquer son interaction avec un autre facteur de régulation du tonus vasculaire, l'endothéline-1 (ET-1). Il a en effet été démontré, chez l'animal et lors d'essais cliniques, que la concentration plasmatique d'ET-1 est augmentée, sans toutefois que le mécanisme sous-jacent puisse être éclairci (Saxena *et al.*,

1998). La pénétration d'hémoglobine dans la cellule endothéliale pourrait ainsi être à l'origine de cette stimulation de la synthèse de l'ET-1 par action directe.

La présence d'hémoglobine acellulaire au sein de la cellule endothéliale implique au moins deux mécanismes possibles d'internalisation, l'endocytose ou la transcytose (capture via le système vésiculaire de transport transendothélial). L'existence d'un récepteur membranaire nécessaire au mécanisme d'endocytose a déjà été mise en évidence sur des cellules endothéliales d'artères cérébrales bovines en culture (Machi T. *et al.*, 1996) ; il s'agirait selon ces travaux d'une molécule membranaire de 94,5 kDa capable de se lier spécifiquement à l'hémoglobine libre. Dans une étude récente, Legrand S. *et al.* ont par ailleurs mis en évidence, par une technique de microscopie de fluorescence 3-D, la capture d'hémoglobine conjuguée ou polymérisée (Hb-Dex-BTC et Hemolink™) par des cellules endothéliales humaines en culture et ont proposé l'intervention d'une voie de transcytose (Legrand S. *et al.*, 1999). Notre étude ne permettant pas pour l'instant de préjuger de l'importance de l'un de ces mécanismes par rapport à l'autre, il convient de considérer les deux mécanismes hypothétiques.

4 - Influence de trois solutions d'hémoglobine (Hb-Dex-BTC, $\alpha\alpha$ -Hb et Hemolink™), mise en évidence par une étude morphodynamique sur des artérioles mésentériques de rat

Le réseau microcirculatoire, situé à l'interface entre vasomotricité, rhéologie et oxygénation, est de ce fait un élément clé du contrôle de l'hémodynamique et par conséquent de la compréhension des mécanismes potentiellement impliqués dans l'effet presseur des solutions d'hémoglobine. Toutefois, l'abord expérimental de la microcirculation est encore récent et quelques auteurs seulement se sont attachés à montrer l'impact de l'hémoglobine acellulaire sur les microvaisseaux.

Nous avons pour notre part voulu étudier l'influence des trois HBOCs testés précédemment sur la tonicité des vaisseaux microcirculatoires et ceci a été réalisé par morphométrie dynamique, dans un modèle éprouvé d'exploration du réseau mésentérique chez le rat (Doutremepuich F. *et al.*, 1998).

4.1 - Description du modèle expérimental

Les manipulations présentées dans ce paragraphe ont été réalisées en collaboration avec les Drs. E. Belougne-Malfatti et O. Aguejouf au sein du laboratoire d'Hématologie du Pr. C. Doutremepuich, Faculté de Pharmacie, Université Victor Segalen - Bordeaux II. Dans une étude préliminaire, nous avons tenté d'adapter la méthode décrite ci-dessous à l'un des modèles animaux déjà utilisé dans ce travail, à savoir le cobaye Hartley. Toutefois, ce modèle a du être abandonné en raison de difficultés techniques liées à cette espèce animale.

Les expérimentations ont donc été effectuées sur des rats Wistar mâles de 387 ± 28 g (élevage Depré, Saint-Doulchard, France). Les animaux ont été répartis de manière aléatoire en quatre groupes dans lesquels nous avons comparé les effets des solutions Hb-Dex-BTC (n=3), $\alpha\alpha$ -Hb (n=4) et Hemolink™ (n=3) et d'une solution de référence, Elohès® 6% (n=3). Les caractéristiques physico-chimiques de ces solutions ont été présentées dans les tableaux IV et V (pages 114 et 122). A la fin des expérimentations, les animaux ont été euthanasiés par administration d'une dose létale d'anesthésique, selon les règles d'éthique précitées.

Les rats ont été anesthésiés par injection i.m. de thiopental sodique (Nesdonal® , Specia, France) à la dose de 200 mg/kg. Après incision médiane de la région du cou, la veine jugulaire gauche a été dégagée afin d'y introduire un cathéter souple en polyéthylène de diamètre interne 0,3 mm (Merck-Clévenot, France) rempli de sérum physiologique et servant à l'administration des solutions. Une laparotomie médiane a ensuite été effectuée et le mésentère a été dégagé puis placé sur la platine d'un microscope inversé (Axiovert 10, Zeiss, Allemagne) dont le grandissement oculaire est de 100. Une artériole mésentérique de calibre compris entre 15 et 25 μm a été sélectionnée et l'évolution de son diamètre exact a été enregistrée au moyen d'un dispositif constitué d'une caméra CCD couleur (DXC 107P, Sony, Japon), d'un moniteur couleur (Trinitron Color Video Moniteur PVM 1442 QM, Sony, Japon) et d'un magnétoscope (Samsung, Japon). La caméra est dotée d'un système de contrôle automatique de la vitesse d'obturation de la luminosité permettant d'obtenir une exposition stable et le moniteur est équipé d'un tube image à grille ultrafine qui offre une définition élevée. Le montage est proposé dans la figure 81.

Après une période de référence d'une minute durant laquelle le diamètre artériolaire a été enregistré, les solutions ont été infusées en bolus par le cathéter veineux sous un débit d'environ 1mL/min et à une dose correspondant à une hypervolémie de 10%, soit $2,5 \pm 0,2$ mL. Le diamètre artériolaire a ensuite été suivi sur une période de cinq minutes.

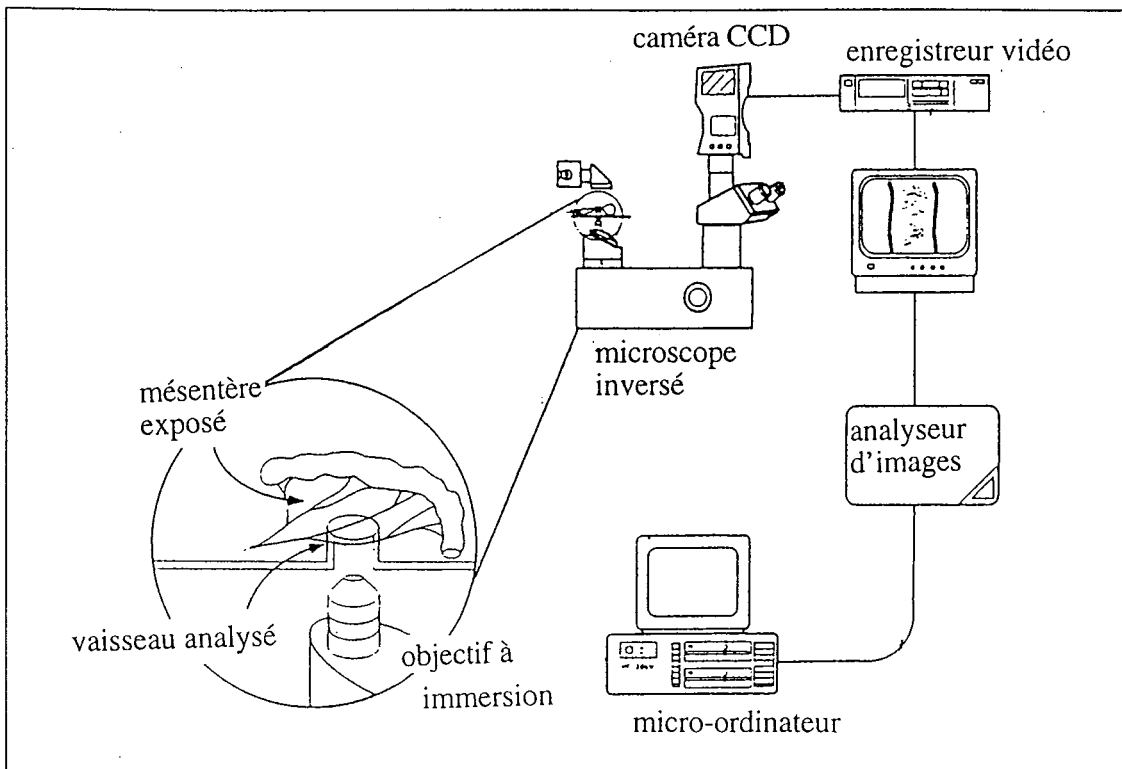


Figure 81. Dispositif expérimental utilisé pour l'analyse de morphométrie dynamique.

Les enregistrements recueillis ont été traités en temps différé au moyen d'un système d'analyse d'images Starwise (Imstar, France), composé d'une unité centrale équipée du logiciel Morphostar (version 5.5k), d'une caméra CCD noir et blanc (Burle, USA), d'un moniteur de contrôle et d'un magnétoscope adapté aux spécificités du logiciel (modèle AG-7350, Panasonic, Japon). A l'aide du système d'analyse d'images, les diamètres vasculaires avant et après l'injection des solutions ont été quantifiés pour chaque animal. Pour ce faire, l'analyseur d'images prend une série de photographies à partir de l'enregistrement vidéo à raison d'un cliché toutes les 5 secondes. A partir de la première image numérisée, le logiciel Morphostar différencie la lumière du vaisseau de la couche des cellules endothéliales en fonction du contraste de l'image et du flux sanguin. L'expérimentateur peut alors positionner, perpendiculairement au grand axe du vaisseau, un repère qui servira à la détermination du diamètre interne. Ce traitement est ensuite appliqué de façon automatique et itérative pour chaque image et les valeurs de diamètre artériolaire sont calculées sur la totalité de l'enregistrement.

Pour chacun des groupes d'animaux traités, les résultats ont été donnés en moyenne \pm 1 e.s.m, calculée sur les périodes pré- et post-injection, et en pourcentages de variations par

rapport à la période pré-injection. Au regard du nombre limité d'animaux composant les groupes, aucune étude statistique n'a été envisagée.

4.2 - Résultats

Les résultats présentés dans la figure 82 indiquent que les modifications de diamètre des artéριοles sont d'amplitude limitée (moins de 10%) mais variable d'un groupe de traitement à l'autre.

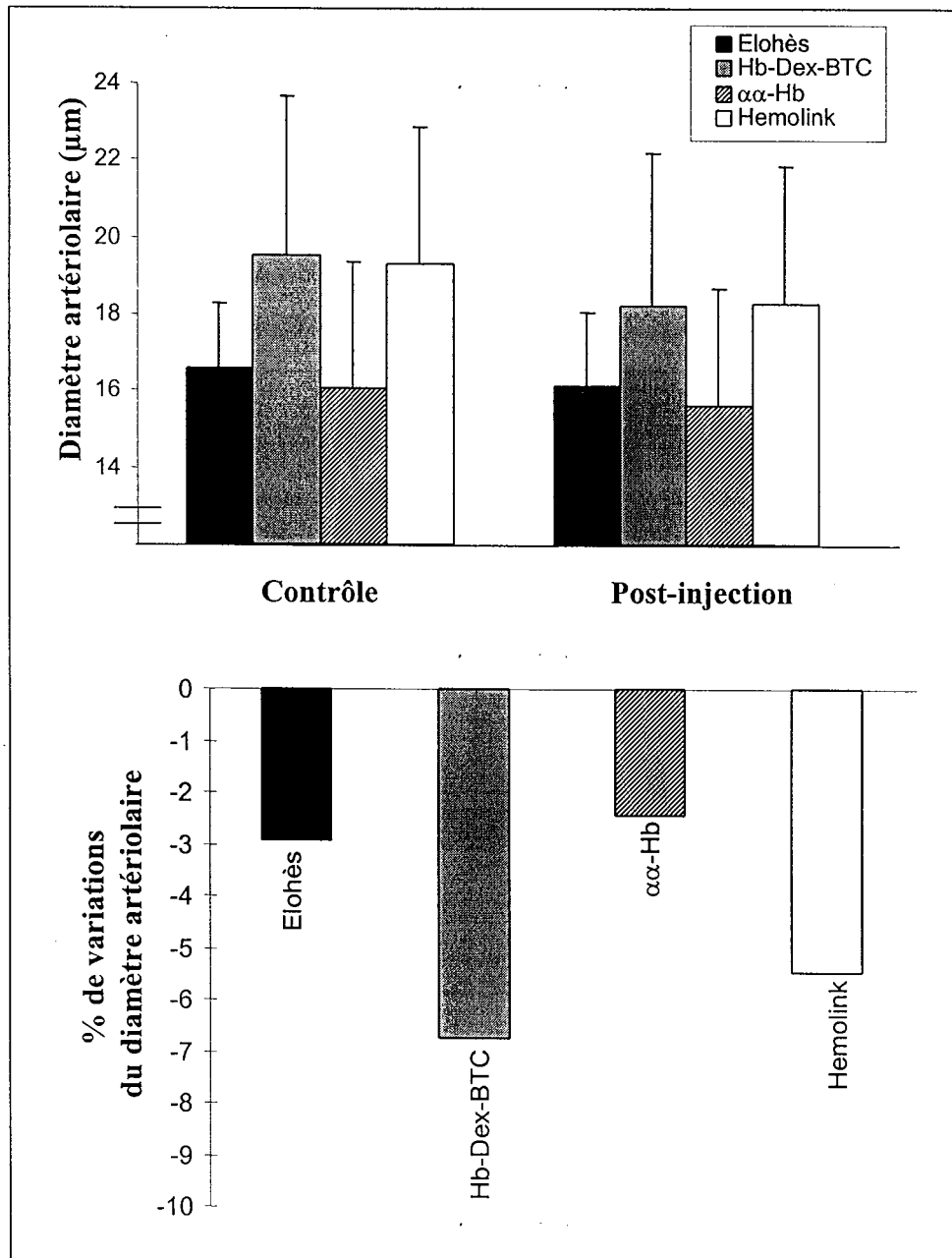


Figure 82. Variations à court terme du diamètre d'artéριοles mésentériques de rat à la suite de l'injection des solutions Elohés (n=3), Hb-Dex-BTC (n=3), αα-Hb (n=4) et Hemolink (n=3).

Pour chacune des solutions testées, on observe une diminution du diamètre artériolaire qui pourrait traduire une vasoconstriction. Celle-ci pourrait être la conséquence d'une amélioration de l'oxygénation, induite par la réduction de viscosité faisant suite à l'hémodilution. Cette diminution est environ deux fois plus importante avec les solutions Hb-Dex-BTC et Hemolink™ qu'avec Elohès® et $\alpha\alpha$ -Hb, ce qui indique qu'il existe un effet propre des produits injectés sur le tonus des artérioles, indépendamment des paramètres rhéologiques. On observe en effet des variations de diamètre différentes entre des produits de viscosité intrinsèque proche (Hb-Dex-BTC et Elohès®). Cette différence d'effet pourrait être liée aux propriétés oxyphoriques des solutions d'hémoglobine, en accord avec la théorie d'autorégulation qui propose que le débit artériolaire est modifié par des variations du diamètre vasculaire afin d'adapter en permanence l'apport en oxygène à la demande des tissus (Intaglietta M. *et al.*, 1996). Des travaux complémentaires sur un nombre d'animaux plus important devraient être envisagés afin de confirmer ces premières observations.

4.3 - Conclusions

L'amplitude limitée des variations observées sur des artérioles de faible diamètre (15-25 μm) peut soulever des questions quant à la pertinence du choix de ces vaisseaux pour mener à bien les objectifs de ce travail. En effet, il est évident que des artérioles de plus gros calibre (40-60 μm) sont capables de subir des modifications morphométriques plus importantes et donc mieux adaptées à notre étude. Toutefois, les impératifs inhérents à cette technique de microscopie, en particulier l'épaisseur de la paroi vasculaire, nous ont limité dans le choix des vaisseaux. Il serait donc intéressant de pouvoir mener une étude du même type dans un modèle expérimental permettant d'analyser des vaisseaux de diamètre plus élevé, tel que celui décrit par Kerger H. *et al.* (Kerger H. *et al.*, 1997a) et utilisé par différentes équipes (Nolte D. *et al.*, 1997a ; Sakai H. *et al.*, 1998).

Dans ce modèle, nous n'avons pas pu suivre en parallèle les variations de pression artérielle, mais différentes études ont montré qu'à la dose administrée (entre 0,2 à 0,25 g d'hémoglobine), les solutions à base d'hémoglobine induisent une hypertension chez le rat anesthésié (Faivre B., 1993 ; Gulati A. *et al.*, 1995 ; Moisan S. *et al.*, 1998 ; Adamson JG. *et al.*, 1998).

En tenant compte de ces restrictions, il convient de noter que dans leur ensemble, nos résultats montrent une diminution immédiate du diamètre artériolaire après injection des

solutions. Celle-ci s'est avérée plus marquée avec Hb-Dex-BTC et Hemolink™ qu'avec $\alpha\alpha$ -Hb. Ce phénomène ne peut être corrélé, en l'état des travaux, aux propriétés rhéologiques ou aux capacités oxyphoriques des produits. Il semble toutefois que ces observations confirment les effets des HBOCs sur la vasomotricité artériolaire, tels qu'il ont été décrits dans d'autres modèles (Nolte D. *et al.*, 1997a ; Kerger H. *et al.*, 1997).

5 - Annexe 4

L'article cité dans le texte est présenté ci-après.

Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs

BÉATRICE FAIVRE-FIORINA, ALEXIS CARON, CÉLINE FASSOT, ISABELLE FRIES, PATRICK MENU, PIERRE LABRUDE, AND CLAUDE VIGNERON
Laboratoire d'Hématologie-Physiologie, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy 1, F-54001 Nancy Cedex, France

Faivre-Fiorina, Béatrice, Alexis Caron, Céline Fassot, Isabelle Fries, Patrick Menu, Pierre Labrude, and Claude Vigneron. Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 276 (*Heart Circ. Physiol.* 45): H766–H770, 1999.—The endothelium is the production site of several potent vasoactive factors that contribute to the modulation of the vascular tone. Because hemoglobin-based oxygen carriers (HBOC) have been demonstrated to cause vasoconstriction and thereby increase arterial pressure by interacting with endothelium-derived factors such as nitric oxide and endothelin-1, we hypothesized that hemoglobin could penetrate into the endothelial cells. Therefore, we investigated the presence of hemoglobin into guinea pig aortic endothelial cells by immunohistochemical staining after exchange transfusion with a hemoglobin-based oxygen carrier. Despite the large molecular size of HBOC due to chemical modifications designed to prevent hemoglobin subunit dissociation and extravascular leakage, hemoglobin was detectable by immunohistochemical staining into the endothelial cells. These findings suggest that the vascular endothelial cells could uptake hemoglobin by endocytosis mechanisms or could help hemoglobin to cross the endothelial barrier toward media by transcytosis mechanisms. These findings are very important to lead future investigations to the mechanisms by which HBOC cause vasoconstriction.

endothelium; hemoglobin-based oxygen carriers; immunohistochemistry

PRECLINICAL DATA on various chemically or genetically modified hemoglobins developed as hemoglobin-based oxygen carriers (HBOC) have demonstrated their efficacy in ensuring oxygen transport and maintenance of the circulating volume (21, 22). However, these blood substitutes cause side effects among which increased blood pressure (10–50 mmHg) was reported in both preclinical and clinical studies (5, 6, 15). This pressure effect explained by systemic vasoconstriction is thought to be due essentially to scavenging of the vasodilating substance nitric oxide (NO) by free hemoglobin in the vascular lumen and/or by penetration into the vascular

wall. Both the ferrous and ferric iron of the heme and the thiols of the β -93 cysteine residues are likely to react with NO, thus causing a decrease in the steady-state level of biologically active endothelium-derived NO in the blood (7, 19). However, the NO-scavenging action of free hemoglobin cannot fully account for the vasoconstriction elicited by HBOC, because other elements of the regulation of the vascular tone have been demonstrated to be influenced by free hemoglobin (16). Although the mechanisms are not known, peripheral vascular α -adrenergic receptors, endothelin-1 production/release, and increased O₂-carrying capacity of blood have been proposed to be involved in the HBOC pressor effect (2, 6, 18, 20). Few authors reported that free hemoglobin could cross the endothelial barrier by getting between the endothelial cells and could cause vasoconstriction by interacting with NO before it could stimulate its target hemoprotein, guanylate cyclase, in smooth muscle cells (13). However, this hypothesis does not take into account the interaction of hemoglobin with other regulatory elements such as endothelin-1. To induce vasoconstriction via these mechanisms, hemoglobin should indeed penetrate into the endothelial cell by mechanisms such as endocytosis.

Therefore, we investigated this penetration by immunohistochemical techniques in guinea pig arteries perfused in vivo with a HBOC. In addition, to evaluate whether the Hb-NO interaction is a prerequisite for this potential penetration, the effect of pretreatment with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a specific inhibitor of the NO synthesis pathway, has been studied.

METHODS

Experimental models. The experiments were conducted in male Hartley VAF guinea pigs (300–350 g, Charles River, St. Aubain les Elbeuf, France), an animal model for which the principal hemostatic characteristics (platelet function, responsiveness to ADP, arachidonic cascade) appeared to most closely resemble to those of humans (9, 17). With the guinea pigs under general anesthesia with halothane (Belamont, France, 1% in 95% O₂-5% CO₂), we inserted a polyethylene tube into the left femoral artery and tunneled it subcutaneously to emerge at the top of the back. The animals were treated with penicillin (200,000 U/kg im) and heparin (150 U/kg iv). An isovolemic exchange transfusion of 50% of the estimated blood volume was performed via the femoral artery

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

tube without inducing significant hemodynamic disturbances as described by Faivre et al. (3). The animals were randomly allocated to one of the experimental groups consisting of hemodilution with a HBOC (described below) (*groups I and II*; $n = 5$ and $n = 3$, respectively), with the same HBOC 2 min after pretreatment with L-NAME (20 mg/kg body wt, Fluka Chemica, Switzerland) (*group III*, $n = 3$), and with a control solution of human albumin (*group IV and V*, $n = 5$ and $n = 3$, respectively).

In *groups I and IV*, the right carotid artery was cannulated and connected to a pressure transducer (Viggo-Spectramed, France) to measure the pulsatile arterial pressure (in mmHg) during the first hour before exchange transfusion (baseline) and for 3 h after exchange. This transducer was connected to a computer for on-line data acquisition at a rate of 75 Hz (Acqknowledge hardware and software, Biopac Systems).

Groups II, III, and V were used for immunohistochemical experiments. One hour after the beginning of the exchange transfusion (~30 min after the end of exchange) when arterial pressure was maximal (cf. Fig. 1), a fixing aqueous solution (1.94 × 10⁻² M picric acid, acetic acid 6.7%, formaldehyde 10.7%, absolute ethylic alcohol 52.8%) was perfused for 30 min in situ from the right carotid artery to the left femoral artery. The following technique was described by Zarins et al. (23), but the perfusion way was modified to wash and rapidly fix the abdominal aorta with the bloodstream. This technique makes it possible to keep the structural integrity of the vascular wall and to limit the detachment and the alteration of the endothelial barrier. Rings of abdominal aorta were collected, kept in the fixing solution, and then included into paraffin. The rings were cut into 5- and 10-μm sections and stained according to the immunohistochemical protocol described in *Immunohistochemical staining*.

Solutions. A human HBOC prepared as described by Prouchayret et al. (14) by chemical modification of human stroma-free hemoglobin [dextran 10-benzene-tetracarboxylate (Dex-BTC-Hb), 8 ± 0.5 g/dl, pH 7.4, supplied by Pasteur-Mérieux, sérums et vaccins, Marcy l'Etoile, France] was used. Briefly, Dex-BTC-Hb has a mean molecular mass of 300 kDa (none at 32 kDa, 64 kDa < 5%, 64–500 kDa > 90%, more than 500 kDa < 5% determined on HPLC columns TSKG3000SW and TSKG4000SW, Varian LC 5020), physiological O₂ affinity [P₅₀ = 21.7 ± 0.4 mmHg, $n = 1$, 7 ± 0.05, Hemox Analyzer (TCS Medical Product)] in a bis-Tris buffer (pH 7.4 at 37°C), pyrogen-free, endotoxin-free (<0.5 EU/ml), and a half-life of 9.5 ± 0.5 h in guinea pigs. Neither vascular leakage nor hemoglobinuria was found in guinea pigs (10). The study of the dissociation state of plasma Dex-BTC-Hb in vivo, determined with HPLC (column TSKG3000SW on Varian LC 5020) in phosphate buffer pH 7.2 (flow rate 1 ml/min, 403 nm), demonstrated a very slow dissociation because >70% of circulating Dex-BTC-Hb had a molecular mass > 64 kDa during the first 24 h after the exchange transfusion (4). Purified human albumin was used as a control solution (5 g/dl, pH 7.6) and was supplied by Pasteur-Mérieux sérums et vaccins. Both solutions were dissolved in Tyrode medium (in mM: 6.7 glucose, 141.0 Na⁺, 5.0 K⁺, 2.5 Ca²⁺, 1.1 Mg²⁺, 115.8 Cl⁻, 0.8 phosphates, and 30.0 carbonates).

Immunohistochemical staining. The presence of HBOC inside guinea pig aortic endothelial cells was assessed using a three-step indirect immunoassay protocol, which, using avidin-biotin complex, is a powerful detection system. Primary antibodies were obtained from New Zealand White rabbits immunized with Dex-BTC-Hb according to Bleeker's protocol (1). With the use of ELISA methods, primary antibodies against HBOC have been demonstrated to be specific to

human hemoglobin, and no cross-reactions have been found with guinea pig hemoglobin. Before addition of the primary antibody on hydrate deparaffinized sections, 5% normal goat serum was added to minimize nonspecific protein bindings. After the addition of the primary antibody, rabbit anti-human modified hemoglobin, at a dilution of 1:200, sections were incubated 30 min at room temperature. Control sections were exposed to normal dilute rabbit serum. After we rinsed the sections with phosphate-buffered saline (PBS), sections were incubated 30 min at room temperature with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG covalently linked to biotin, Microm, France). After being rinsed with PBS, sections were incubated 30 min at room temperature with avidin conjugated to alkaline phosphatase and were then rinsed with PBS. The alkaline phosphatase was visualized 15 min at room temperature using a medium containing *p*-nitrophenylphosphate as the substrate. Sections were counterstained with hematoxylin to enhance nuclear detail.

Data analysis. Mean arterial pressure (MAP) was calculated as one-third (systolic pressure - diastolic pressure) + diastolic pressure and expressed as means ± SE. Statistical comparisons were made before (baseline) and after exchange transfusion ($t = 15, 30, 60, 120$, and 180 min) for *groups I and III* using analysis of variance for repeated measures. Comparisons between *groups I and III* were made for each time, using analysis of variance for repeated measures with Bonferroni-Dunn correction. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Figure 1 shows the variations of MAP with time in *groups I and IV* before exchange transfusion (baseline) and 15, 30, 60, 120, and 180 min after the end of the exchange transfusion. The exchange transfusion was achieved in 25 ± 5 min. With HBOC, MAP increased maximally and significantly ($P < 0.05$) immediately after the end of exchange transfusion. The increase lasted 60 min, and then MAP progressively decreased and was not significantly different from baseline values after this time. With albumin, MAP was unchanged

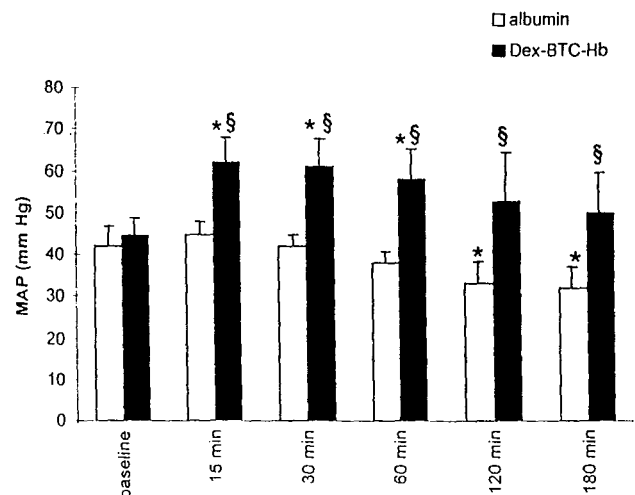


Fig. 1. Variation of mean arterial pressure (MAP) with time expressed as means ± SE after hemodilution with albumin ($n = 5$) or hemoglobin-based O₂ carriers (HBOC) dextran 10-benzene-tetracarboxylate (Dex-BTC-Hb) ($n = 5$). * $P < 0.05$ time vs. baseline. § $P < 0.05$ HBOC vs. albumin.

during the first hour following the end of exchange transfusion and a moderate fall in MAP appeared after 120 min.

Considering these results, we collected rings of abdominal aorta when HBOC-induced pressor effect was maximal, 30 min after the end of exchange transfusion. At the same time, MAP was unchanged with albumin. Figure 2 illustrates the immunohistochemical staining in the vascular wall and particularly in the endothelium of abdominal aorta perfused with HBOC (Fig. 2A), with HBOC after pretreatment with L-NAME (Fig. 2B), and with albumin (Fig. 2C). Figure 2, A and B, reveals positive immunohistochemical staining into the endothelial cells and in the adventitia. The endothelial cells' cytoplasm was strongly stained in HBOC groups. The pretreatment with L-NAME did not seem to limit the endothelial uptake of hemoglobin. Moreover, we observed systematically large amounts of hemoglobin pasted onto the endothelial membrane that were not removed by the fixation technique. In the adventitia, the staining was due to HBOC staying in vasa vasorum. In the media, no staining was observed. As expected, no staining was revealed in the aortic vascular wall of albumin-hemodiluted animals.

DISCUSSION

The present study is, to our knowledge, the first to report the presence of free hemoglobin in endothelial cells in the early time following administration of a HBOC.

The penetration of hemoglobin in the subendothelial space and between the smooth muscle cells has been proposed to explain *in vitro* and *in vivo* the vasoconstriction elicited by HBOC (11). As a result, hemoglobin could interact with some of the mechanisms involved in the regulation of the vascular tone. In this study, we confirm that HBOC induce an immediate increase in MAP, and we propose that it would be due to the rapid penetration of hemoglobin into the endothelial cells, because hemoglobin was detected there 30 min after the end of the exchange transfusion. At this time, the pressor effect of hemoglobin was maximal (Fig. 1), and the plasma concentration of human hemoglobin was high, ~3 g/dl (10). The progressive decrease in MAP after 120 min could be due to experimental conditions, such as anesthesia influence, rather than to the disappearance of the pressor effect of HBOC, because a decrease in MAP was also observed with albumin after this time. Therefore, the rings of abdominal aorta were collected at $t = 30$ min to be sure that the pressor effect of HBOC was maximal. In abdominal aorta, immunohistochemical staining was aimed to detect human hemoglobin contained in HBOC in the vascular wall. The advantage of fixing arteries *in situ* by perfusion of a fixing solution is to remove blood entirely from the lumen of large arteries. However, with this technique blood was not removed from capillaries and vasa vasorum of large arteries adventitia. The absence of staining in the vascular wall of aorta perfused with albumin (Fig. 2C, group V) indicates that no cross-reaction occurred between primary antibodies anti-human hemo-

globin and guinea pig blood in the vasa vasorum of large arteries. Therefore, we can assume that the staining obtained in the adventitia (Fig. 2, A and B) with the HBOC was due to human hemoglobin from HBOC in the numerous vasa vasorum. In addition, because HBOC contained in circulating blood was removed from the lumen during the fixation, Fig. 2A clearly shows that human hemoglobin was present in the intima and more specifically into the endothelial cells. Besides, Fig. 2B shows that human hemoglobin seems to be able to be fixed on the abluminal endothelial membrane.

The presence of human hemoglobin in these cells will have to be discussed. It is known that HBOC generates an increase of the endothelial heme oxygenase activity and a higher endothelial heme content than with unmodified hemoglobin (HbA₀) in cultured aortic endothelial cells (11, 12). These results involved the oxidation and the catabolism of hemoglobin before the endothelial heme uptake. In our study, we demonstrated that at least the antigenic globin moiety of hemoglobin was present early in endothelial cells. Thus heme and globin can penetrate in endothelial cells. Because catabolism of hemoglobin and release of heme are relatively slow mechanisms, the presence of the globin moiety into endothelial cells in the early times following HBOC administration should demonstrate the presence of the whole molecule of hemoglobin and the ability of endothelial cells to take up modified hemoglobin. The pretreatment with L-NAME at a dose for which the NO synthesis was fully inhibited did not limit the uptake of hemoglobin by endothelial cells. This result brings about the hypothesis that the Hb-NO interaction is not a prerequisite for endothelial uptake of hemoglobin. Besides, in the presence of L-NAME, the removal of hemoglobin was impaired, indicating that hemoglobin seems to be fixed at the abluminal side of the endothelial membrane. So when the NO synthesis is blocked, hemoglobin could be fixed more easily on the endothelial membrane.

In all cases, two uptake mechanisms are possible. First, hemoglobin could penetrate into the cytoplasm of the endothelial cells by endocytosis; in this case the presence of a specific receptor to hemoglobin on the membrane is required. Such a hemoglobin-binding molecule (94.5 kDa) has been found on the membrane of cultured bovine endothelial cells (8), and the presence of such a receptor seemed to be confirmed by our results. Second, hemoglobin could be trapped by a vesicular system of transendothelial transport, which is known to be involved in the transport of light lipoprotein. Because our results did not permit us to reject this hypothesis, both mechanisms have to be considered.

In perspective, considering our results, it appears that despite the chemical modifications applied to hemoglobin that were aimed to increase the molecular weight, thus prevent the subunit dissociation, and thereby the extravascular leakage, hemoglobin was detected in endothelial cells. This suggests that the studies describing the pressor effect of HBOC, which

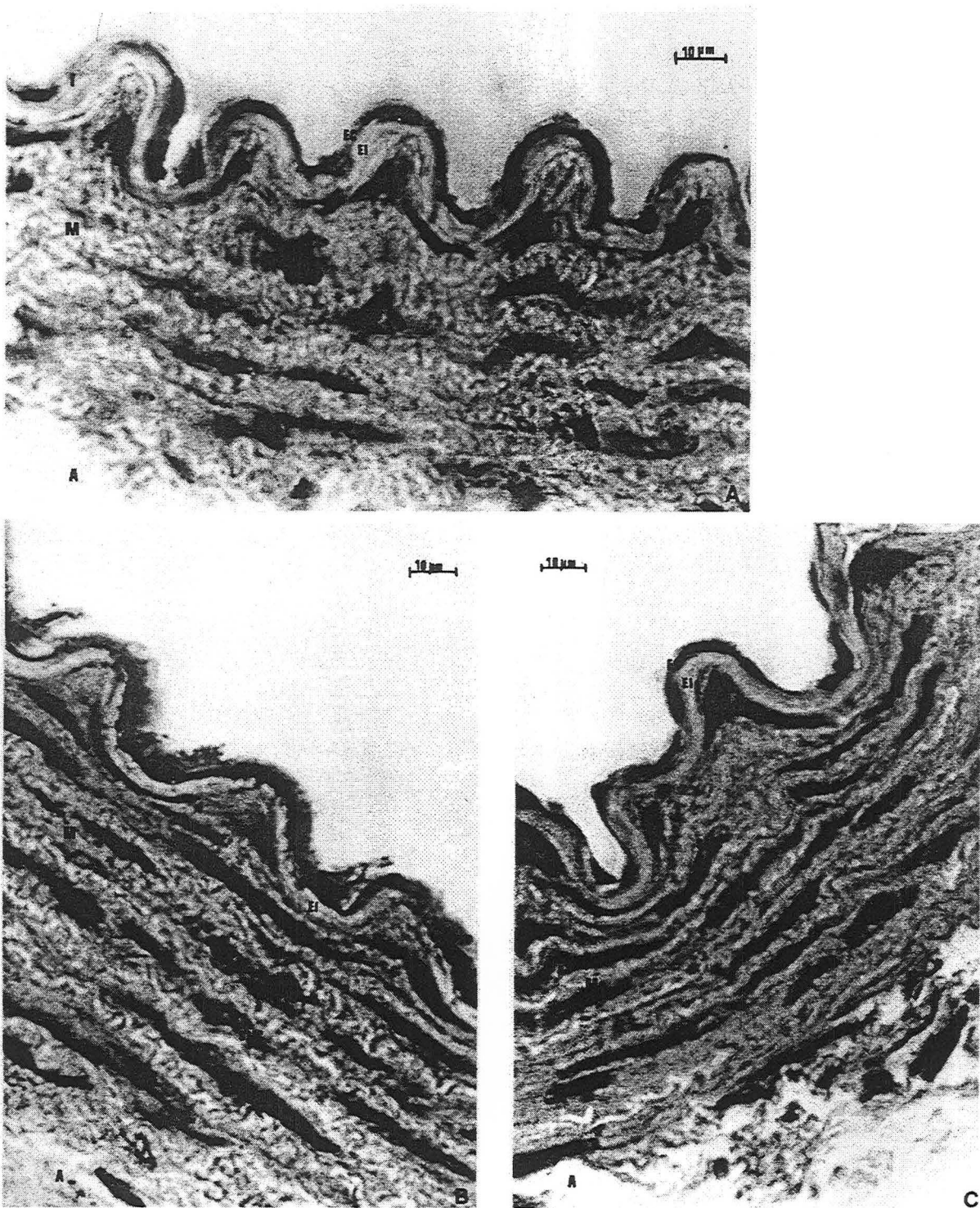


Fig.2. Immunohistochemical staining for human hemoglobin inside aortic vascular wall of guinea pig perfused with HBOC: without N^G , -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) pretreatment (A), with L-NAME pretreatment (B); or with albumin (C). Red staining represents human hemoglobin molecule. Nuclei counterstained with hematoxylin appear blue. A, B, and C: x 1,000. I, intima; M, media; A, adventicia; EI, elastica interna; EC, endothelial cell; SMC, smooth muscular cell.

hypothesized that the interactions of hemoglobin with the mechanisms of regulation of the vascular tone are confined in the subendothelial space or media, have to be newly considered. Thus hemoglobin could scavenge NO directly at the site of its synthesis (endothelial cells) and would prevent it from diffusing to vascular smooth muscle cells where it acts. In addition, hemoglobin could interfere with endothelin-1 synthesis as has been previously described (2, 6, 18). However, numerous questions have to be resolved: How does hemoglobin penetrate into endothelial cells? How long does hemoglobin stay in endothelial cells? Is the duration of the pressor effect of hemoglobin dependent on the presence of hemoglobin into endothelial cells? Do endothelial cells release hemoglobin in the media? Because the pressor effect is immediate, do endothelial cells instantaneously take up hemoglobin from the lumen?

Address for reprint requests: B. Faivre-Fiorina, Laboratoire Hématologie-Physiologie, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy 1, 5-7 rue Albert Lebrun, B.P. 403, F-54001 Nancy Cedex, France.

Received 6 April 1998; accepted in final form 9 October 1998.

REFERENCES

- Bleeker, W., L. M. Zappeij, P. J. Den Boer, and J. C. Bakker. Evaluation of the immunogenicity of polymerized hemoglobin solutions in a rabbit model. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 23: 461-468, 1995.
- Cocks, T. M., E. Malta, S. J. King, R. L. Woods, and J. A. Angus. Oxyhaemoglobin increases the production of endothelin-1 by endothelial cells in culture. *Eur. J. Pharmacol.* 196: 177-182, 1991.
- Faivre, B., P. Menu, P. Labrude, M. Grandgeorge, and C. Vigneron. Methemoglobin formation after administration of hemoglobin conjugated to carboxylate dextran in guinea pigs. Attempts to prevent the oxidation of hemoglobin. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 551-558, 1994.
- Faivre, B., P. Menu, P. Labrude, and C. Vigneron. Do the dissociation of the Dex-BTC-Hb and its oxidation influence the P₅₀ in vivo in guinea pig? *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 97-98, 1994.
- Gulati, A., A. P. Sen, A. C. Sharma, and G. Singh. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am. J. Physiol.* 273 (*Heart Circ. Physiol.* 42): H827-H836, 1997.
- Gulati, A., A. C. Sharma, and G. Singh. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit. Care Med.* 24: 137-147, 1996.
- Kosaka, H., and A. Seiyama. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 749-752, 1996.
- Machi, T., N. F. Kassel, Y. Tanaka, S. Hudson, G. A. Lehman, and T. P. Harrison. Hemoglobin damages the cultured endothelial cell monolayer from bovine cerebral arteries. *Fukuoka Acta Med.* 87: 189-196, 1996.
- Manning, P. J., E. Wagner, and J. E. Harkness. Biology and diseases of guinea pigs. In: *Laboratory Animal Medicine*, edited by J. G. Fox, B. J. Cohen, and F. M. Loew. London: Academic, 1984, p. 149-181.
- Menu, P., B. Faivre, P. Labrude, P. Riffard, M. Grandgeorge, and C. Vigneron. Human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran as a potential red blood cell substitute. II. Pharmacotoxicological evaluation. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 543-549, 1994.
- Motterlini, R., R. Foresti, K. Vandegriff, M. Intaglietta, and R. M. Winslow. Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin. *Am. J. Physiol.* 269 (*Heart Circ. Physiol.* 38): H648-H655, 1995.
- Motterlini, R., R. Foresti, K. Vandegriff, and R. M. Winslow. The autoxidation of alpha alpha cross-linked hemoglobin: a possible role in the oxidative stress to endothelium. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 23: 291-301, 1995.
- Nakai, K., O. Toshio, I. Sakuma, K. Akama, Y. Kobayashi, S. Tokuyama, A. Kitabatake, Y. Nakazato, T. A. Takahashi, and S. Sadayoshi. Inhibition of endothelin-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28: 115-123, 1996.
- Prouchayret, F., G. Fasan, M. Grandgeorge, C. Vigneron, P. Menu, and E. Dellacherie. A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. I. Preparation, purification and characterization. In: *Blood Substitutes and Oxygen Carriers*, edited by T. M. S. Chang. Hong Kong: Marcel Dekker, 1993, p. 144-147.
- Reah, G., A. R. Bodenham, A. Mallick, E. K. Daily, and R. J. Przybelski. Initial evaluation of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) as a vasopressor in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 25: 1480-1488, 1997.
- Rohlf, R. J., E. Bruner, A. Chiu, A. Gonzales, M. L. Gonzales, D. Magde, M. D. Magde, K. D. Vandegriff, and R. M. Winslow. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 273: 12128-12134, 1998.
- Roux, S., J. P. Carreaux, P. Hess, L. Falivene, and J. P. Clozel. Experimental carotid thrombosis in the guinea pig. *Thromb. Haemost.* 71: 252-256, 1994.
- Schultz, S. C., B. Grady, F. Cole, I. Hamilton, and X. Burhop. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 122: 301-308, 1993.
- Stamler, J. S., L. Lia, J. P. Eu, T. J. McMahon, I. T. Demchenko, J. Bonaventura, K. Gernert, and C. A. Piantadosi. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276: 2034-2037, 1997.
- Tsai, A. G., H. Kerger, and M. Intaglietta. Microvascular oxygen distribution: effects due to free hemoglobin in plasma. In: *Blood Substitutes. New Challenges*, edited by R. M. Winslow, K. D. Vandegriff, and M. Intaglietta. Berlin: Birkhäuser, 1996, p. 124-131.
- Waschke, K. F., T. Frietsch, M. Quintel, C. Lenz, and A. Rebel. Hemoglobin solutions. *Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.* 111: 259-263, 1997.
- Winslow, R. M. Blood substitutes. *Sci. Med.* March/April: 54-63, 1997.
- Zarins, C. K., K. E. Taylor, R. A. Bomberger, and S. Glagov. Endothelial integrity at aortic ostial flow dividers. *Scan. Electron Microsc.* 3: 249-254, 1980.

Discussion

DISCUSSION

En introduction à ce chapitre, il convient de noter que les modifications hémodynamiques enregistrées sur l'animal entier sont le résultat de plusieurs mécanismes dont certains ne peuvent être parfaitement contrôlés et définis par l'expérimentateur. Pour cette raison, nous ne pourrions être exhaustif dans cette discussion. Nous tenterons cependant d'apporter des éléments d'explication en tenant compte à la fois des observations issues des études expérimentales décrites aux chapitres précédents et des données de la littérature.

Sans prétendre reproduire une situation clinique, le modèle d'échange transfusionnel partiel choisi a donné l'opportunité de comparer plusieurs solutions d'hémoglobine dans des conditions d'hémodilution proches de celles pour lesquelles plusieurs HBOCs sont en cours d'évaluation clinique. Nous avons fixé le volume sanguin échangé à 20% de la masse sanguine totale afin de réduire l'hématocrite à environ 30%, valeur classiquement recherchée lors d'une hémodilution intentionnelle (Spahn DR. *et al.*, 1994). Dans cette étude, aucun déséquilibre acido-basique (pH, PO₂, PCO₂) n'a été observé au niveau artériel systémique quelque soit la solution infusée. Il est probable qu'une hémodilution plus drastique aurait permis de mettre en avant l'avantage des HBOCs par rapport aux substituts plasmatiques courants en terme d'oxygénation tissulaire.

Dans ce modèle d'échange transfusionnel partiel, nous pouvons considérer schématiquement que les paramètres hémodynamiques sont influencés par deux grands types de facteurs, ceux liés à l'hémodilution elle-même et ceux liés aux propriétés pharmacologiques des solutions. De plus, les données doivent être analysées de manière distincte selon la nature de la solution injectée (solution transportant ou non l'oxygène) et ses caractéristiques physico-chimiques. Les différents facteurs qui seront abordés au cours de cette discussion sont résumés dans la figure 83. La finalité de ce schéma est de souligner la pluralité des mécanismes potentiellement impliqués dans le modèle, la pluralité de leur mode d'action et de leur répartition le long de l'arbre vasculaire, et la pluralité de leurs interrelations. Nous allons détailler ces divers mécanismes et essayer de comprendre dans quelle mesure ils ont pu être impliqués dans nos expérimentations.

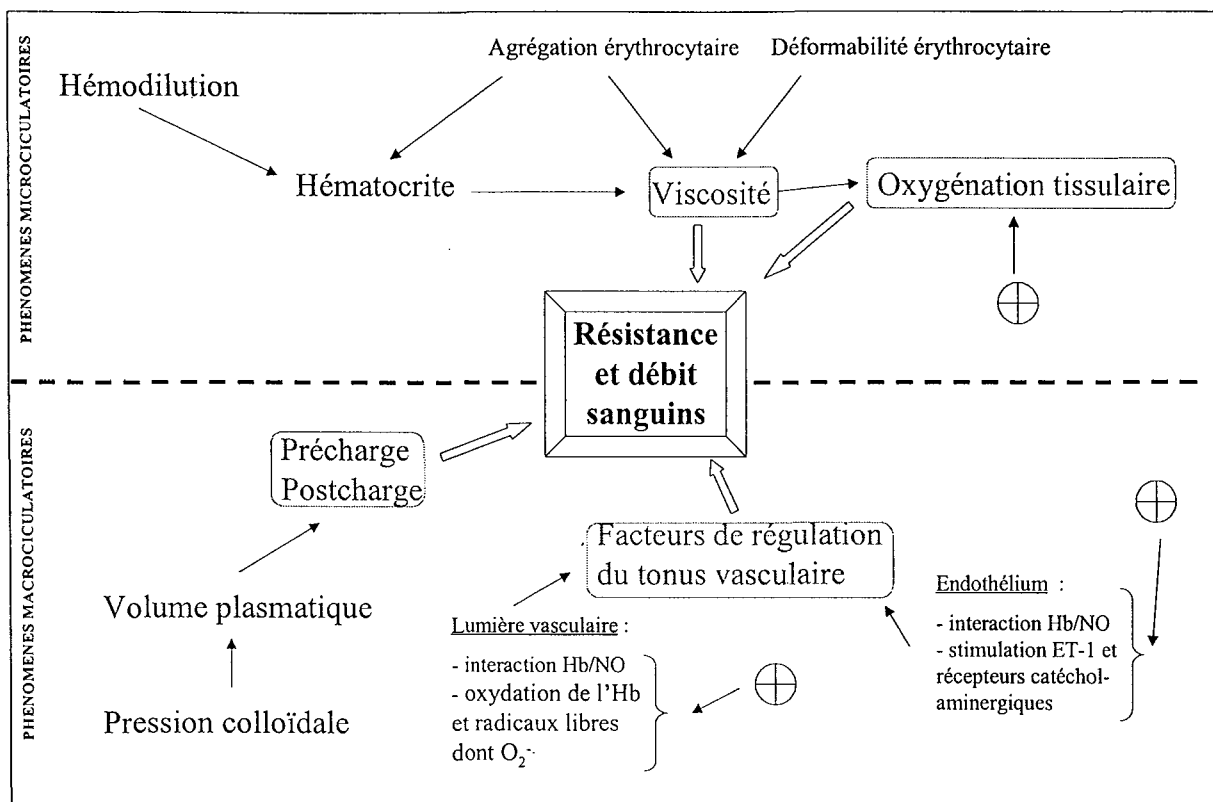


Figure 83. L'influence possible des différents mécanismes impliqués dans les modifications hémodynamiques consécutives à l'injection i.v. d'hémoglobine acellulaire en solution et de leurs interrelations.

⊕ : hémoglobine

Nous avons pu confirmer les nombreuses données de la littérature indiquant qu'à l'inverse des substituts plasmatiques (albumine et HEA) qui n'induisent que très peu de changements hémodynamiques, les HBOCs provoquent des modifications aiguës de l'homéostasie cardiovasculaire résultant d'une vasoconstriction (Spahn DR *et al.*, 1994 ; Dietz NM. *et al.*, 1997). Plusieurs observations ont permis de mettre en évidence, dans le modèle d'hémodilution proposé, une action vasoconstrictrice plus ou moins transitoire des trois HBOCs testés :

- une augmentation de la pression artérielle moyenne,
- une augmentation de la résistance périphérique,
- une diminution de l'indice de pulsatilité.

Nous précisons ici que l'augmentation de la résistance périphérique n'est pas le seul fait de la diminution de débit sanguin aortique inhérente au modèle puisque ce phénomène ne s'est pas produit pour les solutions d'albumine et d'HEA. De plus, la diminution transitoire de la fréquence cardiaque témoigne indirectement de l'effet vasoconstricteur des solutions

d'hémoglobine. Il s'agirait d'un mécanisme réflexe visant à corriger les variations de pression perçues par les barorécepteurs, même si une action directe des solutions d'hémoglobine sur la fréquence cardiaque n'est pas à exclure (Moisan S. *et al.*, 1998).

Les mesures de débit sanguin ont toutefois montré qu'il est difficile de localiser les sites de cette action de l'hémoglobine acellulaire sur le tonus vasculaire, puisque les débits évoluent différemment selon le vaisseau considéré (aorte, artère rénale et artère fémorale). La mesure de la distensibilité aortique au moyen du coefficient de distensibilité n'a par exemple pas révélé de variation significative de la vasomotricité de l'aorte abdominale après la perfusion des solutions d'hémoglobine. L'absence d'homogénéité des effets des solutions d'hémoglobine sur les débits sanguins régionaux a d'ailleurs été décrite dans d'autres modèles (Ulatowski J. *et al.*, 1996b ; Loeb A. *et al.*, 1997 ; Noone RB. *et al.*, 1998 ; Gulati A. *et al.*, 1998). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette disparité de réponse, parmi lesquelles figurent la distribution inégale des récepteurs catécholaminergiques et l'importance variable de l'activité de la NO synthase endothéliale (NOS_e) selon les lits vasculaires (Pickelmann S. *et al.*, 1998 ; Dietz NM. *et al.*, 1997 ; Persson PB., 1996 ; Ferrer M. *et al.*, 1995). En effet, comme nous le verrons plus loin, l'implication de ces deux éléments de régulation du tonus dans l'action vasopressive de l'hémoglobine a déjà été démontrée, avec l'exemple de la DCLHb™ (ou $\alpha\alpha$ -Hb) pour ce qui est des récepteurs α -adrénergiques (Sharma AC. *et al.*, 1995a ; Gulati A. *et al.*, 1994) et avec plusieurs autres solutions d'hémoglobine pour ce qui est de l'interaction Hb/NO (Nakai K. *et al.*, 1996 ; Dietz NM. *et al.*, 1997). Enfin, la différence de perméabilité des vaisseaux des différents organes peut également jouer un rôle dans la non-homogénéité des effets des solutions sur les débits sanguins régionaux.

Si les mécanismes susceptibles d'être à l'origine de l'action vasopressive des HBOCs sont nombreux, nous pouvons toutefois exclure l'intervention de plusieurs facteurs dans le modèle proposé, tels que la pureté, le taux d'endotoxines ou le taux d'hémoglobine non modifiée des solutions injectées (Everse J. *et al.*, 1997 ; Lee R. *et al.*, 1995 ; Yoshida M. *et al.*, 1995 ; Zuckerman SH. *et al.*, 1997). Les solutions utilisées ont en effet été purifiées et possèdent des taux faibles d'endotoxines et d'hémoglobine libre qui sont donc peu susceptibles d'engendrer des altérations hémodynamiques.

Dans le modèle proposé, nous pouvons par ailleurs écarter la participation des éléments de régulation du tonus vasculaire pH-dépendants puisque d'un groupe à l'autre nous n'avons pas observé de différence acido-basique.

La participation des récepteurs α -adrénergiques à l'action vasopressive de la DCLHb™ a été mise en évidence depuis plusieurs années mais n'a, à notre connaissance, jamais été vérifiée pour d'autres solutions d'hémoglobine. D'après ces travaux, la DCLHb™ induirait une potentialisation des récepteurs adrénnergiques α_1 et α_2 chez le rat (Gulati A. *et al.*, 1994 ; Sharma AC. *et al.*, 1995a). La sensibilisation des récepteurs α s'exercerait selon un mécanisme incertain qui peut être soit direct, ce qui nécessite le passage d'hémoglobine au-delà de la barrière endothéliale pour atteindre les cellules musculaires lisses sur lesquelles ils se situent, soit indirect par interaction avec d'autres mécanismes vasoactifs. En l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons pas exclure l'implication de ces mécanismes dans notre étude.

Les données sur la production massive d'anion superoxyde provenant de l'auto-oxydation de l'hémoglobine acellulaire dans le milieu plasmatique laissent supposer que cette espèce peut jouer un rôle dans l'action vasoconstrictrice des HBOCs, en plus de sa toxicité liée à sa structure radicalaire (Alayash AI., 1998 ; Everse J. *et al.*, 1997 ; Talarico T. *et al.*, 1998). En effet, l'anion superoxyde peut inhiber la fonction vasorelaxante de NO en réagissant avec lui pour former l'anion peroxy-nitrite, espèce ionique impliquée dans divers processus physiopathologiques comme l'ischémie-reperfusion (Beckman JS. *et al.*, 1996). Cette hypothèse n'ayant pas été vérifiée dans notre travail, nous ne pouvons écarter l'éventualité de sa participation.

L'inhibition de la fonction vasodilatatrice de NO par l'hémoglobine acellulaire (hème et résidu cystéine $\beta 93$) a clairement été mise en évidence *in vitro* et reste le mécanisme primordial pour de nombreux auteurs, bien que la divergence des résultats de certaines études rende délicate la confirmation de ce mécanisme *in vivo*, et nécessite pour le moins qu'il soit reconsidéré. Il est évident que la diversité des modèles expérimentaux proposés pour aborder la question peut en partie expliquer la discordance des données de la littérature. La complexité de la biologie de NO et la rareté des outils adaptés à la quantification de l'interaction Hb/NO *in vivo* ajoutent également à la difficulté de la compréhension de ce mécanisme. Les quelques exemples qui suivent permettent d'illustrer cet état de fait.

Des auteurs ont souligné le rôle essentiel de l'interaction Hb/NO dans l'action vasopressive de la DCLHb™ chez le rat (Sharma AC. *et al.*, 1995b ; Katsuyama SS. *et al.*, 1994), alors que, dans un modèle très semblable, d'autres ont montré que cette interaction ne permettrait d'expliquer que partiellement son effet presseur et ont suggéré que des mécanismes alternatifs seraient également impliqués (Moisan S. *et al.*, 1998 ; Sen AP. *et al.*, 1998).

Dans des expérimentations non présentées dans ce travail, et selon le protocole d'hémodilution décrit précédemment, nous avons utilisé une solution de Ringer-lactate (Bieffe Medital, France) contenant une dose de L-NAME permettant d'inhiber complètement la biosynthèse de NO (20 mg/kg de poids corporel) afin de comparer ses effets à ceux des solutions d'hémoglobine. L'hypothèse à vérifier était la suivante : si le piégeage de NO par l'hémoglobine acellulaire est responsable des modifications hémodynamiques obtenues avec les HBOCs, le même type de changement devrait être observé avec un inhibiteur de la NOSe. Ces travaux ont abouti à la mise en évidence d'un effet vasoconstricteur plus marqué que dans le cas des HBOCs, avec notamment une réduction du débit sanguin aortique, rénal et fémoral hors de la limite de résolution de l'appareillage Doppler pulsé. Cette observation confirme l'idée énoncée par plusieurs auteurs que le seul mécanisme du piégeage de NO par l'hémoglobine ne peut pas rendre compte de la totalité des variations hémodynamiques observées.

Nous avons également comparé, dans notre modèle d'échange transfusionnel partiel chez le lapin anesthésié, l'effet de l'injection d'Hb-Dex-BTC avec ou sans administration simultanée de L-arginine (200 mg/kg, i.v.), le précurseur de la synthèse de NO. Dans ces conditions, nous n'avons observé aucune différence significative de pression artérielle moyenne, résistance périphérique ou de fréquence cardiaque entre les deux groupes (figure 84).

De même, chez le cobaye anesthésié ayant subi un choc hémorragique sévère et traité avec de l'hémoglobine humaine non modifiée en présence ou non de L-arginine (200 mg/kg, i.v.), l'augmentation de pression artérielle et de résistance s'est avérée identique (Caron A. *et al.*, 1996). A l'inverse, dans une étude menée chez le rat, Katsuyama SS. *et al.* ont montré que le prétraitement des animaux avec une dose de L-arginine identique à celle que nous avons utilisée permettait de diminuer significativement l'effet presseur de la solution de

DCLHb™ (Katsuyama SS. *et al.*, 1994), et soulignaient l'implication d'un mécanisme NO-dépendant.

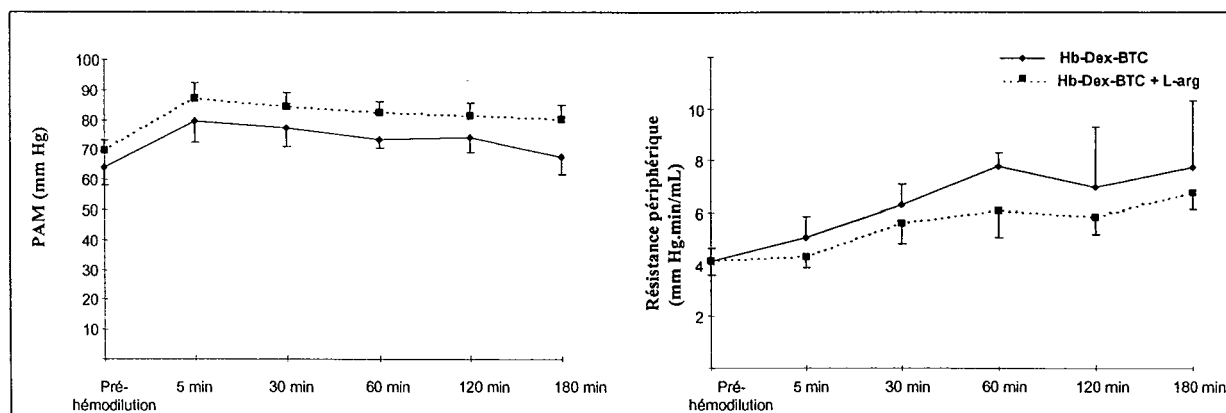


Figure 84. Variations de la pression artérielle moyenne (PAM) et de la résistance périphérique chez des lapins anesthésiés après échange transfusionnel (20%) avec Hb-Dex-BTC en présence ou non de L-arginine (200 mg/kg, i.v.).
n=5 pour chaque groupe, valeurs moyennes ± 1 e.s.m.

L'hypothèse de l'existence d'un lien direct entre l'affinité de l'hémoglobine (sous forme oxygénée) pour NO et l'augmentation de la pression artérielle a été testée par différentes équipes. Là encore, des résultats discordants ont été obtenus. Dans leur modèle d'échange transfusionnel partiel chez le rat, Rohlf's RJ. *et al.* ont en effet montré l'absence de corrélation entre l'affinité pour NO de six solutions d'hémoglobine et leur action sur la pression artérielle (Rohlf's RJ. *et al.*, 1998). Toutefois, dans cette étude les auteurs ont utilisé des solutions composées de molécules d'hémoglobine modifiée présentant des propriétés physiques différentes et il n'est pas à exclure que des facteurs tels que la masse et la dimension moléculaires puissent être à l'origine de ces observations. A l'inverse, Doherty DH. *et al.* ont mis en évidence un lien direct entre les deux paramètres, en utilisant des hémoglobines recombinantes ne différant entre elles que par leur affinité pour NO (Doherty DH. *et al.*, 1998).

L'implication *in vivo* de l'interaction entre l'hémoglobine acellulaire et la voie de régulation du tonus vasculaire NO-dépendante apparaît donc aujourd'hui de plus en plus discutée, voire minimisée. Une meilleure connaissance de l'action de l'hémoglobine sur la biologie de l'endothélium vasculaire, structure privilégiée de la synthèse de substances vasoactives (dont NO), permettrait probablement d'apporter de nouveaux éléments de réponse. Au regard des conclusions de nos travaux sur la pénétration intra-endothéliale de

l'hémoglobine acellulaire, il nous semble en effet nécessaire de considérer l'interaction de l'hémoglobine avec le compartiment vasculaire, non plus seulement au niveau de la lumière vasculaire, de l'espace sous-endothélial et de la média, comme ce fut essentiellement le cas jusqu'à présent (Gould SA. *et al.*, 1998a), mais également au niveau de la cellule endothéliale elle-même. La mise en évidence de la pénétration d'une hémoglobine conjuguée telle que Hb-Dex-BTC au sein de la cellule endothéliale permettrait notamment d'expliquer pourquoi la polymérisation de l' $\alpha\alpha$ -Hb (poly- $\alpha\alpha$ -Hb) ne réduit pas l'ampleur de son effet vasoactif (Abassi Z. *et al.*, 1997). En effet, bien que la taille de la poly- $\alpha\alpha$ -Hb limite sa diffusion dans l'espace sous-endothélial, Abassi Z. *et al.* ont montré que ses effets sur la pression artérielle sont comparables à ceux de l' $\alpha\alpha$ -Hb, suggérant donc l'implication d'un mécanisme alternatif pour expliquer son effet presseur.

Il nous semble par ailleurs légitime de supposer que diverses substances vasoactives produites par la cellule endothéliale puissent être affectées directement ou indirectement par l'hémoglobine, même si peu de publications en font référence. Il a été démontré lors d'essais cliniques de phase II, que la concentration d'endothéline-1 plasmatique augmente de manière dose-dépendante à la suite de l'administration de DCLHb™ (Saxena R. *et al.*, 1998), conformément à ce qui avait été observé plus tôt chez le rat (Gulati A. *et al.*, 1996). Par contre, dans cette étude clinique, les taux plasmatiques d'autres substances vasoactives telles que vasopressine, rénine et catécholamines se sont révélés stables à la suite de l'injection de la solution d'hémoglobine.

La mise en évidence de la présence d'hémoglobine modifiée au sein de la cellule endothéliale *in vivo* est récente (voir publication en annexe 4) et soulève de nombreuses interrogations auxquelles des travaux complémentaires devront tenter de répondre afin de mieux définir comment ce mécanisme influence l'hémodynamique. En particulier, certains points de divergence persistent tels que l'absence de modification du tonus aortique observée dans notre étude par les mesures de distensibilité, alors que la présence d'hémoglobine dans les cellules endothéliales de ce même vaisseau a été révélée.

Notre analyse de l'évolution de la volémie à la suite d'un échange transfusionnel isovolémique a montré que l'Hb-Dex-BTC a un effet comparable à celui d'une solution d'hydroxyéthylamidon qui est un substitut plasmatique couramment utilisé en situation clinique. Cette étude a également mis en évidence des effets sur la volémie sensiblement

différents entre deux types d'HBOCs que nous avons attribués aux différences de structure chimique des molécules d'hémoglobine en solution. Il semble en effet que la solution d'hémoglobine de masse moléculaire la moins élevée ($\alpha\alpha$ -Hb) soit sujette à une extravasation plus importante que l'hémoglobine conjuguée (Hb-Dex-BTC). Malgré des différences entre les deux modèles expérimentaux (animaux, solutions testées et volume sanguin échangé), nos résultats confirment ceux de Migita R. et coll. (Migita R. *et al.*, 1997). Dans les deux études, on observe une réduction sensible de la volémie dans les 120 minutes suivant un échange transfusionnel avec la solution d' $\alpha\alpha$ -Hb mais pas avec une solution d'hémoglobine de masse moléculaire élevée (Hb-Dex-BTC dans notre étude, hémoglobine conjuguée au PEG dans celle de Migita R. et coll.).

La finalité première de ce travail était de chercher un éventuel lien de cause à effet entre le volume sanguin post-hémodilution et les variations hémodynamiques, en partant de l'hypothèse selon laquelle deux solutions présentant des propriétés oncotiques différentes devraient affecter de manière différente la volémie et par voie de conséquence induire des changements hémodynamiques spécifiques. Cette étude n'a cependant pas permis d'affirmer qu'une telle corrélation existe ; nous pouvons même supposer que la relation de causalité puisse être inverse de celle énoncée, c'est-à-dire que l'augmentation de pression artérielle provoque des modifications de l'équilibre liquidien. En effet, il est établi que les phénomènes de transport liquidien à travers la paroi vasculaire sont modifiés par une augmentation aiguë de la pression transmurale, dans la mesure où celle-ci agit sur la filtration transmembranaire (Tedgui A., 1990). Ainsi, l'augmentation de pression artérielle à la suite de l'injection des HBOCs pourrait favoriser la fuite des molécules d'hémoglobine par extravasation et donc provoquer la diminution du volume sanguin circulant, comme nous l'avons observé pour l' $\alpha\alpha$ -Hb. A terme, cette extravasation pourrait provoquer un déséquilibre oncotique favorisant un appel liquidien vers les tissus (et la formation d'œdème), dans la limite du volume de diffusion de l'hémoglobine.

Ces résultats, bien que préliminaires, soulignent donc la nécessité de mieux appréhender les effets des HBOCs sur la régulation de la volémie afin de pouvoir comprendre dans quelle mesure ces phénomènes pourraient être responsables des modifications hémodynamiques.

Selon une hypothèse encore récente, l'effet vasoconstricteur des HBOCs pourrait trouver son origine dans les vaisseaux les plus périphériques du compartiment vasculaire et résulter d'un phénomène d'autorégulation propre à la microcirculation (Intaglietta M. *et al.*, 1996). Nos premières expérimentations dans un modèle d'hypervolémie légère (10%) chez le rat ont montré une légère constriction artériolaire sur des vaisseaux mésentériques de 15-25 μm . Le phénomène s'est révélé plus marqué chez les animaux traités avec Hb-Dex-BTC et Hemolink™ que chez ceux ayant reçu de l' $\alpha\alpha$ -Hb. D'autres travaux traitant cette hypothèse ont permis de montrer chez le hamster, qu'à la suite de l'injection de DCLHb™ en condition hypervolémique ou en situation d'hémodilution normovolémique, le réseau microcirculatoire contribue activement à une augmentation de la pression artérielle, par constriction artériolaire et par diminution de la fréquence et de l'amplitude de la vasomotricité spontanée des artérioles. Selon les auteurs, l'effet vasopresseur immédiat et transitoire serait dû aux vaisseaux de moins de 40 μm (20% de réduction du diamètre), alors que l'effet à plus long terme serait dû à ceux dont le diamètre est supérieur à 40 μm (Nolte D *et al.*, 1997a). Dans les mêmes conditions, le diamètre des veinules demeure inchangé. Enfin, en situation de traitement d'une hémorragie sévère, ni la pression artérielle, ni les paramètres morphométriques artériolaires ne sont modifiés. Dans une autre étude, Kerger H. *et al.* ont, quant à eux, mis en évidence une diminution du diamètre des artérioles les plus larges chez le hamster en situation de choc hémorragique traité par la solution Hemolink™ et ce, sans variation de la pression artérielle (Kerger H. *et al.*, 1997b). A la vue de ces conclusions, on constate que les mécanismes vasoconstricteurs impliqués à ce niveau de l'arbre vasculaire sont complexes et dépendent sans doute de la nature de la solution d'hémoglobine et de la localisation des vaisseaux de résistance considérés.

Ce serait un apport excédentaire d'oxygène aux tissus par rapport à la demande métabolique, dû à l'augmentation de la capacité oxyphorique du sang mêlé à l'hémoglobine acellulaire, qui entraînerait une constriction artériolaire immédiate visant à adapter la perfusion locale à la demande métabolique des tissus (Intaglietta M. *et al.*, 1996 ; Page TC. *et al.*, 1998). De ce constat, naît une question qui nous semble importante et qui a été évoquée dans l'article joint en annexe 5. Il convient de s'interroger sur les conséquences de l'effet vasoconstricteur des solutions d'hémoglobine, en particulier dans les situations d'hypoxie ou d'anoxie. Si ces produits représentent un avantage par rapport aux solutés de remplissage dépourvus de capacité oxyphorique, comme cela a été montré en conditions ischémiques avec

la DCLHb™ (Nolte D. *et al.*, 1997b) et à la suite d'une hémorragie sévère traitée avec de l'hémoglobine recombinante rHb 1.1 (Stetter *et al.*, 1998), encore faut-il que cet apport bénéfique en terme d'amélioration de l'oxygénation tissulaire ne soit pas masqué par ses effets vasoconstricteurs délétères (Winslow RM. *et al.*, 1998). Cette question nous semble être un élément déterminant qui pourrait conditionner les applications thérapeutiques futures des solutions à base d'hémoglobine.

Plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'effet hypertenseur de l'hémoglobine acellulaire dans des situations pathologiques caractérisées par une hypotension, telles que le choc hypovolémique et le choc septique (Reah G. *et al.*, 1997 ; Sielenkämper AW *et al.*, 1997 ; Fischer SR. *et al.*, 1998). Les travaux les plus avancés sont des essais cliniques de traitement du choc septique avec une hémoglobine pyridoxylée conjuguée au PEG, la PHP® (Kilbourn RG. *et al.*, 1997). Toutefois, ceux-ci ne permettent pas de tirer à l'heure actuelle de conclusions définitives sur l'apport de cette solution d'hémoglobine dans cette approche thérapeutique. Des travaux antérieurs réalisés dans un modèle ovin de choc septique n'avaient déjà pas permis de mettre en évidence le bénéfice de ce produit sur la vasoconstriction pulmonaire caractéristique de cette pathologie (Fischer SR. *et al.*, 1997). Par ailleurs, des résultats contradictoires ont été rapportés quant au pronostic du choc septique (amélioration, absence d'effet ou, au contraire, exacerbation) lors de l'association d'autres solutions d'hémoglobine que la PHP® et d'endotoxines bactériennes (White CT. *et al.*, 1986 ; Griffiths E. *et al.*, 1995 ; Otterbein L. *et al.*, 1995 ; Langermans JAM. *et al.*, 1996 ; Su D. *et al.*, 1997). Il semble que l'hémoglobine injectée en grandes quantités puisse alors conduire à une amplification de l'état de choc car elle s'avère être alors une source de nutriments pour les bactéries ferri-dépendantes (Bornside GH. *et al.*, 1970). Il a également été montré chez la souris que l' $\alpha\alpha$ -Hb favorise la désagrégation des endotoxines, stimulant ainsi leur activité biologique et conduisant à terme à une mortalité plus élevée que chez les animaux non traités (Su D. *et al.*, 1997). Ces résultats divergents font ressortir les nombreuses difficultés restant à résoudre avant d'aboutir à une mise à profit effective de l'action vasopressive de l'hémoglobine en solution.

La comparaison des effets de trois solutions d'hémoglobine dans notre modèle d'hémodilution a montré qu'elles exercent chacune une action différente sur les paramètres biochimiques plasmatiques et sanguins, et que cette action est directement liée aux

caractéristiques propres des produits injectés. Dans cette étude, nous avons bénéficié des apports des nombreux travaux antérieurs dans le domaine de la chimie de l'hémoglobine qui ont permis d'aboutir à la synthèse de produits aux caractéristiques physico-chimiques satisfaisantes, en particulier pour ce qui concerne la pureté et les taux de metHb, rHb et HbO₂. Ainsi, les taux de metHb, forme de l'hémoglobine impropre au transport de l'oxygène et toxique à forte concentration sanguine (au-delà de 1,5% chez l'homme), sont relativement faibles pour les trois produits ; de plus, ils diminuent rapidement dans les 180 minutes suivant l'injection. Cette réduction de la metHb est observée dès l'administration des solutions et par la suite s'effectue de manière dose-dépendante par des voies de catabolisme que nous avons déjà évoquées (annexe 3). La question de la capacité d'élimination de la metHb par l'organisme reste toutefois un élément sensible à considérer dans l'évaluation future des HBOCs car il est probable que, lors d'une injection d'hémoglobine plus massive que celle proposée dans ce travail, certains mécanismes de réduction puissent être pris en défaut. De plus, des concentrations élevées d'hémoglobine plasmatique constituent pour d'autres raisons un réel problème à l'heure où plusieurs HBOCs sont en phase clinique d'évaluation, puisqu'elles interfèrent avec certains automates de routine utilisés en hématologie (Ali ACY. *et al.*, 1997 ; Callas DD. *et al.*, 1997 ; Moreira PL. *et al.*, 1997 ; Sarkozi L. *et al.*, 1997).

Par ailleurs, nous avons montré la stabilité de la structure des molécules modifiées chimiquement durant les 180 minutes de suivi post-hémodilution, pour les trois solutions. La mesure des taux d'hémoglobine plasmatique totale nous a permis d'estimer les demi-vies plasmatiques des solutions à 4, 6 et 7 heures respectivement pour $\alpha\alpha$ -Hb, Hb-Dex-BTC et Hemolink™. Ces différences, qui semblent s'expliquer par la taille des molécules en solution et donc par leur propension à quitter le compartiment vasculaire par extravasation et/ou filtration rénale, ont été largement rapportées dans les divers modèles expérimentaux proposés dans la littérature.

En dépit de ces variations des propriétés physico-chimiques des trois solutions testées, nous n'avons observé que peu de différences quant à leur influence sur les paramètres hémodynamiques durant les 180 minutes de suivi post-hémodilution. Un nombre d'animaux trop faible peut expliquer en partie ce manque de discrimination statistique entre les effets des trois solutions. Il est toutefois probable qu'en dépit de concentrations initiales différentes, à de

telles concentrations plasmatiques (environ 5000 fois les valeurs physiologiques), les solutions induisent effectivement des modifications hémodynamiques identiques, en raison d'une "saturation" des mécanismes sur lesquels elles agissent. Ainsi, au niveau macrohémodynamique, la principale différence observée est un effet hypertenseur et bradycardisant plus transitoire pour Hemolink™ que pour les deux autres hémoglobines modifiées. Indépendamment de tout jugement sur la valeur ou l'efficacité des trois produits testés dans notre travail, cette observation soulève des interrogations sur les mécanismes à l'origine de la levée de l'hypertension. Une correction de type baroréflexe a déjà été évoquée et constitue probablement un élément efficace de contrôle de la pression. Toutefois, ce seul mécanisme ne permet d'expliquer que partiellement le retour progressif de la pression à des valeurs basales. Si l'on admet que le piégeage de NO par l'hémoglobine est un des facteurs déterminants de l'effet presseur, il est probable que les effets de cette interaction s'estompent au cours du temps par renouvellement de la quantité de NO. Les travaux de Abassi Z. *et al.* ont en effet montré qu'il existe une amplification de l'expression de la NOSe dans des cellules endothéliales aortiques de rats normovolémiques ayant reçu une solution saline, de l'hémoglobine humaine non modifiée (HbA₀), de l' $\alpha\alpha$ -Hb ou de la poly- $\alpha\alpha$ -Hb, entre 120 et 200 minutes après perfusion (Abassi Z. *et al.*, 1997). Cette hypothèse n'exclut pas la participation des formes non endothéliales (inductibles) de la NOS dans le maintien de la pression sanguine mais les mécanismes exacts d'un tel contrôle restent à confirmer par des études complémentaires.

L'étude hémorhéologique a mis clairement en évidence que dans nos conditions expérimentales l'Hb-Dex-BTC induit une augmentation de la viscosité sanguine et de l'agrégabilité érythrocytaire par rapport à la solution Hemolink™, augmentation qui pourrait diminuer son efficacité au niveau microcirculatoire. La modification de l'agrégabilité pourrait notamment favoriser le passage des érythrocytes organisés en rouleaux et en réseaux par des "shunts" entre artérioles et veinules qui diminuent la densité des capillaires fonctionnels et donc l'oxygénation tissulaire. Du fait de l'intérêt particulier des solutions transportant l'oxygène par rapport aux substituts plasmatiques classiques dans cette zone essentielle du compartiment vasculaire, cet aspect pourrait être un facteur limitant de son utilisation, notamment dans des situations hypoxiques ou anoxiques comme nous l'avons déjà évoqué. Pourtant certains auteurs ont montré l'effet bénéfique des solutions de viscosité élevée par rapport à celles de faible viscosité dans des situations d'hémodilution extrêmes (réduction

d'hématocrite au-delà de 60%) en termes d'oxygénation tissulaire (Winslow RM. *et al.*, 1998). Le maintien de la viscosité sanguine à une valeur proche de la normale permet dans de telles conditions, de conserver la densité des capillaires fonctionnels et donc de préserver l'apport d'oxygène. Cette hypothèse reste à vérifier dans le cas de l'Hb-Dex-BTC par des analyses conjuguant rhéologie et oxygénation tissulaire.

Comme nous avons essayé de le souligner dans cette discussion, de nombreux points d'interrogation persistent quant aux mécanismes à l'origine des effets vasoconstricteurs des solutions d'hémoglobine à court terme. Des facteurs tels que l'interaction de l'hémoglobine avec les thrombocytes, les leucocytes et/ou les macrophages circulants n'ont pas été abordés dans ce travail, mais leur implication n'en est pas pour autant à exclure. Par exemple, les effets de l'hémoglobine acellulaire sur le taux sérique de thromboxane A₂, puissant vasoconstricteur synthétisé par les thrombocytes et les macrophages activés pourraient être envisagés.

Enfin, si nous nous sommes focalisés ici sur les seuls effets cardiovasculaires des HBOCs, leur influence dans les domaines immunologique, hématologique ou encore digestif demeurent autant de sujets d'investigation qui pourraient conditionner l'évolution thérapeutique future de ces produits.

Annexe 5

L'article cité dans la discussion est présenté ci-après.

Potential effect of hemoglobin solutions on blood components

The article of Stetter et al.¹ in *TRANSFUSION* presented potential benefits of a recombinant hemoglobin solution, rHb 1.1, for use in transfusion. The authors studied the influence of that solution on blood rheologic properties in vitro. Of particular interest, they reported that red cell aggregation and deformability were not altered. Simulating blood volume replacement under conditions after blood loss was more beneficial with rHb 1.1 than with other substitutes tested. However, the hemodilution model that they used was remote from the reality of hemorrhagic shock, in which the red cell-to-plasma ratio remains constant, regardless of the volume of blood lost.

In studies not cited by Stetter et al., we showed that other Hb-based oxygen carriers induced more rheologic changes in vitro, especially in the presence of free Hb and Hb chemically modified by covalent dextran fixation to increase vascular lifespan (Dex-BTC-Hb, Pasteur Merieux, Marcy l'Etoile, France) than did tests performed with plasma substitutes commonly used in clinical practice: 6-percent hydroxyethyl starch 200 (60 g/L, Elohes Biosedra, Louviers, France), modified fluid gelatin (30 g/L, Plasmion Bellon Rhone Poulenc Rover, Neuilly-sur-Seine, France), dextran 40 (35 g/L, Plasmacair, Baxter Healthcare, Sevres, France), and human albumin (50 g/L). We noted that the viscosity and cellular aggregation of a red cell substitute mixture under continuous agitation remained stable over 6 hours of the experiment. Simulating 30-percent hemodilution also revealed increased viscosity and a slightly increased aggregating effect of Dex-BTC-Hb, modified fluid gelatin, and hydroxyethyl starch. In a recent study, we confirmed these rheologic results (aggregation, viscosity, deformability) in hemodiluted rabbits (Fig. 1).

In considering the clinical potential of this new class of substitutes, it is important to note that a high vascular concentration of free Hb induces more than rheologic changes. Infusing Hb solutions induces transient vascular hypertension and systemic vasoconstriction as a result of modifications of some mechanisms involved in the basal regulation of vascular tone.³ Likewise blood flow is modified by the presence of the Hb-based oxygen carrier, especially by the increase in plasma viscosity and red cell aggregation.

In conclusion, we believe that a proposal for the clinical use of Hb-based oxygen carriers must be reconciled with observations that the transient presence of high plasma concentrations of Hb disrupts both the vascular tonus control mechanisms and the blood rheologic behavior. The question, therefore, is whether the deleterious effects of the systemic vasoconstriction induced by free Hb override the

potential improvements of tissue oxygenation and blood rheology.

Patrick Menu, PhD

Alexis Caron, PhD

Beatrice Faivre-Fiorina, PhD

Department of Hematology and Physiology

School of Pharmacy

Henri Poincare University—Nancy I

Jean-Francois Stoltz, PhD

Department of Angiohematology-Hemorheology

School of Medicine

Henri Poincare University—Nancy I

54600 Vandoeuvre les Nancy Cedex

France

REFERENCES

1. Stetter MN, Baerlocher GM, Meiselman HJ, Reinhart WH. Influence of a recombinant hemoglobin solution on blood rheology. *Transfusion* 1997;37:1149-55.
2. Menu P, Donner M, Faivre B, et al. In vitro effect of dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin on human blood rheological properties. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1995;23:319-30.
3. Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1075-99.

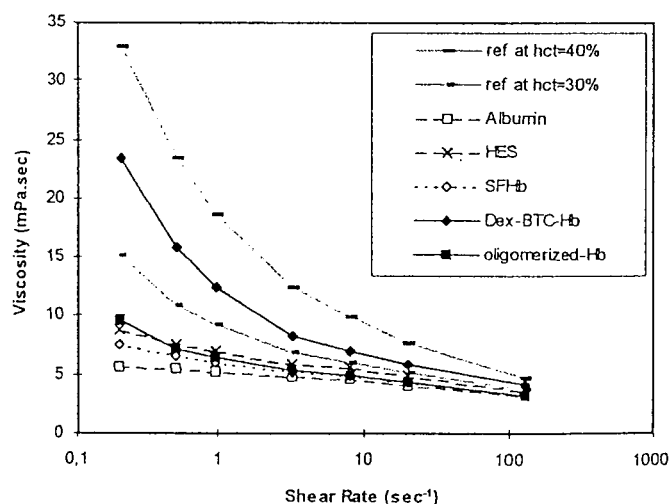


Fig. 1. Viscosity of 30-percent hemodiluted rabbit red cells according to shear rate. Samples were collected in 5-percent EDTA (wt/vol) 5 minutes after blood volume replacement with studied substitutes. Samples contained 35-percent red cells (vol/vol), 35-percent plasma and 30-percent (vol/vol) substitutes (2nd control) or substitutes, except for the first control, which was normal rabbit whole blood. HES = hydroxyethyl starch, SFHb = stroma-free Hb, ref = reference, Hct = hematocrit.

The above letter was sent to Drs. Reinhart and Meiselman, who offered the following reply.

We thank Menu et al. for their valuable comments regarding our study on the influence of rHb1.1 on blood rheology.¹ One of their concerns is that the hemodilution model we used was remote from the reality of hemorrhagic shock in which the red cell-to-plasma ratio remains constant, regardless of the volume of blood lost. We simulated the treatment of hemorrhagic shock (the rapid infusion of crystalloid and solutions that are always used before blood transfusion is available and that decrease the hematocrit) and not hemorrhagic shock itself, as we state throughout the text. We therefore think that our in vitro model is relevant to the emergency treatment of hemorrhagic shock. We fully agree that our in vitro results, albeit favorable, are by no means an invitation for uncritical clinical application. The compound should not be used outside well-designed, controlled clinical trials. There is indeed the concern about the binding of nitric oxide, the potent vasodilator released by endothelial cells, by Hb,² which results in vasoconstriction. It has to be seen if such vasoconstriction is deleterious, as stated by Menu et al., or if negligible in the case of hemorrhagic shock with already existing strong vasoconstriction response, or it may even be beneficial. Other problems may occur. Red cells contain an important buffer system, carbonic anhydrase, the enzyme that hydrates carbon

dioxide to bicarbonate. Hb solutions are devoid of carbonic anhydrase, and hence large fractions of free Hb may affect the acid-base equilibrium. All these aspects must be studied in vivo. Our in vitro work indicates, however, that, among the artificial oxygen carriers tested so far, rHb1.1 seems promising.

Walter H. Reinhart, MD
Internal Medicine, Kantonsspital,
CH-7000 Chur
Switzerland

Herbert J. Meiselman, ScD
Department of Physiology and Biophysics
University of Southern California
School of Medicine
Los Angeles, CA 90033

REFERENCES

1. Stetter MN, Baerlocher GM, Meiselman HJ, Reinhart WH. Influence of a recombinant hemoglobin solution on blood rheology. *Transfusion* 1997;37:1149-55.
2. Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998;391:169-73.

SUBMISSION OF LETTERS

Instructions for submission of letters can be found in the Detailed Instructions for Authors published on pages 113 to 119 of this issue. Submit letters to:

S. Gerald Sandler, MD,
Department of Laboratory Medicine/M-1306,
Georgetown University Medical Center,
3800 Reservoir Road, NW, Washington, DC 20007.

EDITOR'S NOTE: To permit timely publication of correspondence, the references have not been verified as they are for articles appearing in *TRANSFUSION*, and, therefore, the accuracy of references cited in Letters to the Editor is the sole responsibility of the authors. Payment is not required for submission of Letters to the Editor.

Conclusion

CONCLUSION

Depuis plus d'un demi-siècle, les recherches en vue de proposer une alternative à la transfusion de globules rouges se poursuivent. Aujourd'hui, au prix de multiples études et grâce à l'apport de nouvelles technologies, bon nombre de problèmes ont pu être surmontés et plusieurs solutions à base d'hémoglobine sont en passe de remplir la fonction de substitut érythrocytaire temporaire. Dans ce travail, nous avons pu montrer, à travers plusieurs modèles expérimentaux offrant l'opportunité de comparer différentes solutions d'hémoglobine, que chacun des trois HBOCs testés induit, selon sa formulation, des effets secondaires qui lui sont spécifiques et font que son utilisation et ses applications thérapeutiques lui sont propres. Cet état de fait rend ainsi difficile, voire utopiste, toute idée de standardisation des protocoles d'évaluation clinique de ces produits. Connaissant ces limitations, il conviendrait d'aboutir à une plus grande transparence dans les résultats fournis par les compagnies industrielles qui sont en attente d'une prochaine autorisation de mise sur le marché de leur(s) produit(s), comme il a été récemment suggéré par des responsables de la F.D.A. (IBC's 6th Annual Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, Washington, DC, USA, 20-21 Novembre 1998) et ce, en dépit des retombées économiques alléchantes dont elles pourraient bénéficier. De nouvelles approches expérimentales sont donc encore nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes responsables des effets de l'hémoglobine acellulaire sur le tonus vasculaire qui se traduisent par une élévation transitoire de la pression artérielle pouvant limiter le champ des applications thérapeutiques potentielles. En effet, il est impératif que l'action vasopressive des HBOCs soit contrôlée pour qu'elle ne masque pas, par ses effets délétères, l'apport que représentent ces produits en terme d'oxygénation tissulaire et de maintien de la volémie, tout particulièrement dans des conditions pathologiques extrêmes (ischémie, choc hypovolémique). Il nous semble notamment important de considérer dans un futur proche la question de l'interaction de l'hémoglobine acellulaire avec le compartiment vasculaire, plus seulement au niveau luminal ou sous-endothélial comme il est relaté dans la littérature, mais également au niveau de la cellule endothéliale. Les multiples fonctions de cette cellule en font en effet le véritable "cerveau" de l'homéostasie cardiovasculaire et sa localisation à l'interface entre vasomotricité, hémorhéologie, oxygénation tissulaire mais aussi vasotrophie, hémostasie et défense immunitaire, aspects non abordés dans ce travail, lui confère certainement un rôle essentiel dans les effets secondaires induits par les solutions d'hémoglobine.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abassi Z, Kotob S, Pieruzzi F, Abouassali M, Keiser HR, Fratantoni JC, Alayash AI. Effects of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. *J.Lab.Clin.Med.* 1997;129:603-610.

Adamson JG, Moore C. Hemolink™, an o-Raffinose Crosslinked Hemoglobin-Based Oxygen Carrier. In: *Blood substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, edited by TMS Chang. Karger Landes Systems, 1998, pp 62-81.

Alayash A, Fratantoni J, Bonaventura C, Bonaventura J, Cashon R. Nitric oxide binding to human ferrihemoglobins cross-linked either α or β subunits. *Arch.Biochem.Biophys.* 1993;303:332-338.

Alayash AI. Hemoglobin-based blood substitutes and mechanisms of toxicity. In: *Blood substitutes : Present and future perspectives*, edited by E. Tsuchida. Elsevier, Amsterdam, 1998, pp 201-210.

Alkjær C, Poston L. Effects of pH on vascular tension: Which are the important mechanisms ? *J.Vasc.Res.* 1996;33:347-359.

Ali ACY, Campbell JA. Interference of o-raffinose cross-linked hemoglobin with routine Hitachi 717 assays. *Clin.Chem.* 1997;43:1794-1796.

Aranow JS, Wang H, Zhuang J, Fink MP. Effect of human hemoglobin on systemic and regional hemodynamics in a porcine model of endotoxemic shock. *Crit.Care Med.* 1996;24:807-814.

Archer S. Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells. *J.Lab.Clin.Med.* 1996;127:524-529.

Baron J-F. Pharmacologie des hydroxyéthylamidons de bas poids moléculaire. *Ann.Fr.Anesth.Réanim.* 1992;11:509-515.

Bauer R, Walter B, Würker E, Kluge H, Zwiener U. Colored microsphere technique as a new method for quantitative-multiple estimation of regional hepatic and portal blood flow. *Exp.Toxic.Pathol.* 1996;48:415-420.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am.J.Physiol.* 1996;271:C1424-C1437.

Bemski G. Contribution of electron paramagnetic resonance to the studies of hemoglobin: the nitrosylhemoglobin system. *Mol.Biol.Reports* 1997;24:263-269.

Bennett MA, Watt PAC, Thurston H. Endothelium-dependent modulation of resistance vessel contraction : studies with N-nitro-L-arginine methyl ester and N-nitro-L-arginine. *Br.J.Pharmacol.* 1992;107:616-621.

- Birchard GF. Optimal hematocrit: theory, regulation and implications. *Am.Zool.* 1997;37:65-72.
- Bornside GH, Bouis PJ, Cohn I. Enhancement of *Escherichia coli* infection and endotoxic activity by hemoglobin and ferric ammonium citrate. *Surgery* 1970;68:350-355.
- Botzlar A, Nolte D, Messmer K. Effects of ultrapurified polymerized bovine hemoglobin on the microcirculation in striated muscle. *Eur.J.Med.Res.* 1996;1:471-478.
- Brugère H, Laurent J, Le Bars D, Malhouy G, Milhaud C, Schmitt S, Wintergerst J. Expérimentation animale : mode d'emploi. *INSERM ed., Chimie et Ecologie*, 1992, 153p.
- Cabrera C, Bohr D. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995;206:77-81.
- Callas DD, Clark TL, Moreira PL, Lansden C, Gawryl MS, Kahn S, Bernes EW, Jr. In vitro effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on routine chemistry, therapeutic drug, coagulation, hematology, and blood bank assays. *Clin.Chem.* 1997;43:1744-1748.
- Caron A, Faivre B, Menu P, Labrude P. Assessment of the vasoactive effects of Dextran-Benzene-Tetracarboxylate Hemoglobin, a potential red-cell substitute. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 1996;24:A315.
- Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider on efficacy evaluation of hemoglobin- and perfluorocarbon-based oxygen carriers. *Transfusion* 1994;34:712-713.
- Chabanel A, Chien S. Blood viscosity as a factor in human hypertension. In : *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Second Edition*. Edited by JH. Laragh and BM Brenner, Raven Press Ltd., New York, 1995, pp 365-376.
- Chang TMS. Modified hemoglobin-based blood substitutes: crosslinked, recombinant and encapsulated hemoglobin. *Vox Sang.* 1998;74(Suppl.2):233-241.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Lab.Animals* 1996;30:293-316.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Lab.Animals* 1997;31:1-32.
- Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Löffler B-M, Burri K, Cassal J-M, Hirth G, Müller M, Neidhart W, Ramuz H. Pharmacological Characterization of Bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J.Pharmacol.Exper.Ther.* 1994;270:228-235.

- Cocks TM, Malta E, King SJ, Woods RL, Angus JA. Oxyhaemoglobin increases the production of endothelin-1 by endothelial cells in culture. *Eur.J.Pharmacol.* 1991;196:177-182.
- Collins P, Burman J, Chung H-I, Fox K. Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries in vivo. *Circulation* 1993;87:80-85.
- D'Agnillo F, Chang TMS. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nature Biotechnol.* 1998;16:667-671.
- Davies MG., Hagen P-O. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann.Surg.* 1993;218:593-609.
- De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1982;222:166-173.
- Dieryck W, Pagnier J, Poyart C, Marden MC, Gruber V, Bournat P, Baudino S, Mérot B. Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature* 1997;386:29-30.
- Dietz NM, Joyner MJ, Warner MA. Blood substitutes: Fluids, drugs, or miracle solutions? *Anesth. Analg.* 1996;82:390-405.
- Dietz NM, Martin CM, Beltran-del-Rio AG, Joyner MJ. The effects of cross-linked hemoglobin on regional vascular conductance in dogs. *Anesth.Analg.* 1997;85:265-273.
- Doherty DH, Doyle MP, Curry SR, Vali RJ, Fattor TJ, Olson JS, Lemon DD. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nature Biotechnol.* 1998;16:672-676.
- Dohi Y, Hahn AWA, Boulanger CM, Bühler FR, Lüscher TF. Endothelin stimulated by angiotensin II augments vascular contractility of hypertensive resistance arteries. *Hypertension* 1992;19:131-137.
- Dohi Y, Kojima M, Sato K, Lüscher TF. Age-related changes in vascular smooth muscle and endothelium. *Drugs & Aging* 1995;7:278-291.
- Donner M, Siadat M, Stoltz J-F. Erythrocyte aggregation : approach by light scattering determination. *Biorheology* 1988;25:367-375.
- Doutremepuich F, Aguejouf O, Belougne-Malfatti E, Doutremepuich C. Fibrinogen as a factor of thrombosis : experimental study. *Thromb.Res.* 1998;90:57-64.
- Edouard A, Berdeaux A, Pennec J-M. Le baroréflexe artériel, signification physiologique, approche clinique. In: *Actualités en Anesthésie-Réanimation*. Arnette Ed. Paris 1985.
- Eriksson LEG. Binding of nitric oxide to intact human erythrocytes as monitored by electron paramagnetic resonance. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1994;203:176-181.

- Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic.Biol.Med.* 1997;22:1075-1099.
- Faivre B. Un transporteur d'oxygène à visée transfusionnelle : l'hémoglobine-dextrane 10-benzène-tétracarboxylate. Evaluation pré-clinique chez le cobaye. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine, 09-09-1993.*
- Feelisch M, te Poel M, Zamora R, Deussen A, Moncada S. Understanding the controversy over identity of EDRF. *Nature.* 1994;368:62-65.
- Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 1996;23:1082-1090.
- Fenoy FJ, Ferrer P, Carbonell L, Garcia-Salom M. Role of nitric oxide on papillary blood flow and pressure natriuresis. *Hypertension* 1995;25:408-414.
- Ferrer M, Encabo A, Conde MV, Marin J, Balfagon G. Heterogeneity of endothelium-dependent mechanisms in different rabbit arteries. *J.Vasc.Res.* 1995;32:339-346.
- Fischer SR, Bone HG, Powell WC, McGuire R, Traber LD, Traber DL. Pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate does not restore hypoxic pulmonary vasoconstriction in ovine sepsis. *Crit.Care Med.* 1997;25:1551-1559.
- Fischer SR, Bone HG, Harada M, Jourdain M, Traber DL. Nitric oxide scavengers in sepsis. *Sepsis* 1998;1:135-143.
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23:1121-1131.
- Frears W, Llave R, Jing M, Hart J, Mc Quillan P, Muldoon S. Contractile effects of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on isolated porcine blood vessels. *J.Lab.Clin.Med.* 1995;125(6):762-767.
- Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
- Gibson QH, Roughton FJW. The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *J.Physiol.* 1957;136:507-526.
- Goldman DW, Breyer RJ III, Yeh D, Brocney-Ryan BA, Alayash AI. Acellular hemoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium: a role for ferryl iron. *Am.J.Physiol.* 1998;275:H1046-H1053.
- Gonzalez P, Hackney AC, Jones S, Strayhorn D, Hoffman EB, Hughes G, Jacobs EE, Orringer EP. A phase I/II study of polymerized bovine hemoglobin in adult patients with sickle cell disease not in crisis at the time of study. *J.Invetig.Med.* 1997;45:258-264.

Gould S, Sehgal L, Sehgal L, Toyooka E, Moss G. Clinical experience with human polymerized hemoglobin. *Transfusion* 1993;33 (Supplement): S231.

Gould SA, Moss GS. Clinical development of human polymerized hemoglobin as a blood substitute. *World J.Surg.* 1996;20:1200-1207.

Gould SA, Moore EE, Moore FA, Haenel JB, Burch JM, Sehgal H, Sehgal L, DeWoskin R, Moss GS. Clinical utility of human polymerized hemoglobin as a blood substitute after acute trauma and urgent surgery. *J.Trauma* 1997;43:325-331.

Gould SA, Sehgal LR, Sehgal HL, DeWoskin R, Moss GS. The clinical development of human polymerized hemoglobin. In: *Blood substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, edited by TMS Chang. Karger Landes Systems, 1998a, pp 12-28.

Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, DeWoskin R, Moss GS The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *J.Am.Coll.Surg.* 1998b;187:113-122.

Greenburg AG, Kim HW. Hemoglobin mediated vasoactivity in isolated vascular rings. *Art.Cells Blood Subst.Immobil.Biotechnol.* 1995;23:303-309

Griffiths E, Cortes A, Gilbert N, Stevenson P, MacDonald S, Pepper D. Haemoglobin-based blood substitutes and sepsis. *Lancet* 1995;345:158-160.

Gulati A, Rebello S. Role of adrenergic mechanisms in the pressor effect of diaspirin cross-linked hemoglobin. *J.Lab.Clin.Med.* 1994;124:125-133.

Gulati A, Singh R, Chung SM, Sen AP. Role of endothelin-converting enzyme in the systemic hemodynamics and regional circulatory effects of proendothelin-1 (1-38) and diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. *J.Lab.Clin.Med.* 1995;126:559-570.

Gulati A, Sharma AC, Singh G. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit.Care Med.* 1996;24:137-147.

Gulati A, Sen AP, Sharma AC, Singh G. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am.J.Physiol.* 1997;273:H827-H836.

Gulati A, Sen AP. Dose-dependent effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on regional blood circulation of severely hemorrhaged rats. *Shock* 1998;9:65-73.

Guyton AC. The surprising kidney-fluid mechanism for pressure control : its infinite gain ! *Hypertension* 1991;18:49-53.

Haller H. Endothelial function. General considerations. *Drugs* 1997;53(Suppl 1):1-10.

- Hart JL, Jing M, Bina S, Frears W, Van Dyke RA, Mumdoon SM. Effects of halothane on EDRF/cGMP-mediated vascular smooth muscle relaxations. *Anesthesiology* 1993;79:323-331.
- Hart JL, Ledvina MA, Muldoon SM. Actions of diaspirin cross-linked hemoglobin on isolated rat and dog vessels. *J.Lab.Clin.Med.* 1997;129:356-363.
- Hartley CJ, Cole JS. An ultrasonic pulsed Doppler system for measuring blood flow in small vessels. *J.Appl.Physiol.*1974;37:626-629.
- Hatton DC, Brooks V, Qi Y, McCarron DA. Cardiovascular response to stress: baroreflex resetting and hemodynamics. *Am.J.Physiol.* 1997;272:R1588-R1594.
- Haywood JR, Schaffer RA, Fastenow C, Fink GD, Brody MJ. Regional blood flow measurement with pulsed Doppler flowmeter in conscious rat. *Am.J.Physiol.*1981;241:H273-H278.
- Heymann MA, Payne BD, Hoffman JIE, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 1977;20:55-79.
- Highsmith FA, Driscoll CM, Chung BC, Chavez MD, MacDonald VW, Manning JM, Lippert LE, Berger RL, Hess JR. An improved process for the production of sterile modified haemoglobin solutions. *Biologicals* 1997;25:257-268.
- Hsia J.C. Pasteurizable, freeze-driable hemoglobin-based blood substitute. US Pat. 4, 857, 636, Aug 15, 1989.
- Hughes GS, Antal EJ, Locker PK, Francom SF, Adams WJ, Jacobs EE, Jr. Physiology and pharmacokinetics of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in humans. *Crit.Care Med.* 1996;24:756-764.
- Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem.Pharmacol.*1991;41:485-490.
- Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc.Res.* 1996;32:632-643.
- Iwamoto J, Morin FC.III. Nitric oxide inhibition varies with hemoglobin saturation. *J.Appl.Physiol.* 1993;75:2332-2336.
- Janvier G, Annat G. Y a-t-il des limites à l'hémodilution ? *Ann.Fr.Anesth.Réanim.* 1995;14(Suppl.):9-20.
- Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996;380:221-226.

Jing M, Ling GSF, Bina S, Hart JL, Muldoon SM. Halothane attenuates nitric oxide relaxation of rat aortas by competition for the nitric oxide receptor site on soluble guanylyl cyclase. *Eur.J.Pharmacol.* 1998;342:217-224.

Joannides R, Haefeli WE, Linder L. *et al.* Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995;91:1314-1319.

Kanaide H. Endothelin regulation of vascular tonus. *Gen.Pharmacol.* 1996;27:559-563.

Kasper S-M, Walter M, Grüne F, Bischoff A, Erasmi H, Buzello W. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth.Analg.* 1996;83:921-927.

Kasper S-M, Grüne F, Walter M, Amr N, Erasmi H, Buzello W. The effects of increased doses of bovine hemoglobin on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth.Analg.* 1998;87:284-291.

Katsuyama SS, Cole DJ, Drummond JC, Bradley K. Nitric oxide mediates the hypertensive response to a modified hemoglobin solution (DCLHb) in rats. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech.* 1994;22:1-7.

Kerger H, Torres Filho IP, Rivas M, Winslow RM, Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular oxygen tension in conscious Syrian golden hamsters. *Am.J.Physiol.* 1997a;268:H802-H810.

Kerger H, Tsai AG, Saltzman DJ, Winslow RM, Intaglietta M. Fluid resuscitation with O₂ vs. non-O₂ carriers after 2 h of hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am.J.Physiol.* 1997b;272:H525-H537.

Kilbourn RG, DeAngelo J, Bonaventura J. Clinical effects of cell-free hemoglobin, a scavenger of nitric oxide, in septic shock. In: *Yearbook of intensive care and emergency medicine*. Ed: Vincent JL. Springer-Verlag (Berlin). 1997; pp 230-239.

Langermans JAM, Van der Hulst MEB, Bleeker WK. Safety evaluation of a polymerized hemoglobin solution in a murine infection model. *J.Lab.Clin.Med.* 1996;127:428-434.

Laurent S, Vanhoutte P, Cavero I, Chabrier PE, Dupuis B, Elghozi JL, Hamon G, Janiak P, Juillet Y, Kher A, Koen R, Madonna O, Maffrand JP, Pruneau D, Thuillez C. The arterial wall: a new pharmacological and therapeutical target. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 1996;10:243-257.

Lautt WW. Resistance or conductance for expression of arterial vascular tone. *Microvasc.Res.* 1989;37:230-236.

Lee R, Neya K, Svizzero TA, Vlahakes GJ. Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J.Appl.Physiol.* 1995;79:236-242.

- Leftheriotis G, Geraud JM, Preckel MP, Saumet JL. Cerebral blood flow and resistances during hypotensive haemorrhage in the rabbit: transcranial Doppler and laser-Doppler flowmetry. *Clin.Physiol.* 1995;15:537-545.
- Legrand S., Muller S., Faivre-Fiorina B., Menu P., Biro G., Stoltz J-F. Evidence for the uptake of two potential human hemoglobin-based oxygen carriers by endothelial cells. A 3-D fluorescence microscopy study. [Abstract] *Fundam.Clin.Pharm.* 1999: in press.
- Lehmann ED, Parker JR, Hopkins KD, Taylor MG, Gosling RG. Validation and reproducibility of pressure-corrected aortic distensibility measurements using pulse-wave-velocity doppler ultrasound. *J.Biomed.Eng.* 1993;15:221-228.
- Li JKJ. Laminar and turbulent flow in the mammalian aorta: Reynolds number. *J.Theor.Biol.* 1988;135:409-414.
- Lincoln J, Hoyle CHV, Burnstock G. Endothelium-derived nitric oxide. In : *Nitric oxide in health and disease*. Biomedical Research Topics, JA Lucy Ed. Cambridge University Press, 1997, pp 27-42.
- Loeb A, McIntosh LJ, Raj NR, Longnecker D. Regional vascular effects of rHb1.1, a hemoglobin-based oxygen carrier. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1997;30:703-710.
- Looker D, Abbott-Brown D, Cozart P, Durfee S, Hoffman S, Mathews AJ, Miller-Roehrich J, Shoemaker S, Trimble S, Fermi G, Komiyama NH, Nagai K, Stetler GL. A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* 1992;356:258-260.
- MacAllister RJ, Vallance P. The L-arginine : nitric oxide pathway in the human cardiovascular system. *J.Int.Fed.Clin.Chem.* 1996;8:152-158.
- Machi T, Yuichiro T, Hudson S, Lehman GA, Harrison TP. Hemoglobin damages the cultured endothelial cell monolayer from bovine cerebral arteries. *Fukuoka Acta Med.* 1996;87:189-196.
- Marchais SJ, Guerin AP, Pannier B, Delavaud G, London GM. Arterial compliance and blood pressure. *Drugs* 1993;46(Suppl. 2):82-87.
- Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J.Pharmac.Exp.Ther.* 1985;232:708-716.
- Menu P, Faivre B, Labrude P, Riffard P, Grandgeorge M, Vigneron C. Human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran as a potential red blood cell substitute. II. Pharmacotoxicological evaluation. *Biomat.Art.Cells Immob.Biotech.* 1994;22: 551-558.
- Michel CC. Starling: the formulation of his hypothesis of microvascular fluid exchange and its significance after 100 years. *Exp.Physiol.* 1997;82:1-30.

Michel JB. Rôle du monoxyde d'azote endothélial dans la régulation du tonus artériel. *Rev.Prat.* 1997;47:2251-2256.

Migita R, Gonzales A, Gonzales ML, Vandegriff KD, Winslow R. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J.Appl.Physiol.* 1997;82:1995-2002.

Mitruka BM, Rawnsley HM. In : *Clinical Biochemical and Hematological References Values in Normal Experimental Animals. Section II: Sample Collection, Preparation, and Preservation.* Ed. Masson Publishing USA Inc., 1977; pp 21-39.

Moisan S, Drapeau G, Burhop KE, Rioux F. Mechanism of the acute pressor effect and bradycardia elicited by diaspirin crosslinked hemoglobin in anesthetized rats. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1998;76:434-442.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.*1991;43:109-142.

Moreira PL, Lansden CC, Clark TL, Gawryl MS. Effect of Hemopure[®] on prothrombin time and activated partial thromboplastin time on seven coagulation analyzers. *Clin.Chem.* 1997;43:1792.

Muldoon SM, Ledvina MA, Hart JL, MacDonald VW. Hemoglobin-induced contraction of pig pulmonary veins. *J.Lab.Clin.Med.* 1996;128:579-584.

Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor function in humans. *Gastroenterology* 1995;109:1241-1248.

Nahon M, Sauvageon X. Solutés de remplissage vasculaire : place des HEA. *Urgence Pratique* 1995;12: 53-55.

Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, 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.

Nakai K, Sakuma I, Ohta T, Ando J, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA. Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *J.Lab.Clin.Med.* 1998;132:13-19.

Nelson D, Azari M, Brown R, Burhop K, Bush S, Catarello J, Chuang J, Downing C, Estep T, Loewen A, McClure K, McDaniel A, Michalek E, Mozier N, Rohn K, Spicuzza J, Zieske P, Zimmerman G. Preparation and characterization of diaspirin cross-linked hemoglobin solutions for preclinical studies. *Biomat.Artif.Cells Immobil.Biotech.* 1992;20:423-427.

Nelson DJ. Blood and Hemassist™ (DCLHb): Potentially a complementary team. In: *Blood substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, edited by TMS Chang. Karger Landes Systems, 1998, pp 39-57.

Nho K, Glower D, Bredehoeft S, Shankar H, Shorr R, Abuchowski A. PEG-bovine hemoglobin : safety in a canine dehydrated hypovolemic-hemorrhagic shock model. *Biomat.Art.Cells Immob.Biotech.* 1992;2-4:511-524.

Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, Bouskela E, Messmer K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: A study on safety and toxicity. *J.Lab.Clin.Med.* 1997a;130:314-327.

Nolte D, Steinhauser P, Pickelmann S, Berger S, Härtl R, Messmer K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on local tissue oxygen tension in striated skin muscle: An efficacy study in the hamster. *J.Lab.Clin.Med.* 1997b;130:328-338.

Noone RB, Mythen MG, Vaslef SN. Effect of $\alpha\alpha$ -crosslinked hemoglobin and pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate solutions on gastrointestinal regional perfusion in hemorrhagic shock. *J.Trauma* 1998;45:457-469.

Ohki N, Kimura T, Ogata Y. The reduction of methemoglobin in Neo Red Cell. *Art.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 1998;26:477-485.

Otterbein L, Sylvester SL, Choi AMK. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995;13:595-601.

Ovadia Z, Kornowski R, Gavish B, Chayen D, Walden R, Varda-Bloom N, Battler A, Eldar M. Noninvasive evaluating of microcirculatory hemodynamic changes during hemorrhage followed by saline or blood transfusion. *Shock* 1995;4:96-101.

Page TC, Light WR, Hellums JD. Prediction of microcirculatory oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures. *Microvasc.Res.* 1998;56:113-126.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.

Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependant relaxation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1988;153:1251-1256.

Persson PB. Modulation of the cardiovascular control mechanisms and their interaction. *Pharmacol.Rev.* 1996;76:193-244.

Pickelmann S, Nolte D, Leiderer R, Schültze E, Messmer K. Attenuation of postischemic reperfusion injury in striated skin muscle by diaspirin-cross-linked Hb. *Am.J.Physiol.* 1998;275:H361-H368.

Poyart C, Bursaux E. L'hémoglobine, le NO, les complexes protéiques nitrosylés et la régulation de la pression vasculaire. *Médecine/sciences* 1996;6-7:848-850.

Pries AR, Secomb TW, Sperandio M, Gaetgens P. Blood flow resistance during hemodilution : effect of plasma composition. *Cardiovasc.Res.* 1998;37:225-235.

Prouchayret F, Fasan G, Grandgeorge M, Vigneron C, Menu P, Dellacherie E. A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. I. Preparation, purification and characterisation. In: *Blood substitutes and oxygen carriers*, edited by T.M.S. Chang. Marcel Dekker, Inc. 1993; pp 144-147.

Przybelski RJ, Daily EK, Kisicki JC, Mattia-Goldberg C, Bounds MJ, Colburn WA. Phase I study of the safety and pharmacologic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin solution. *Crit.Care Med.* 1996;24:1993-2000.

Rao MJ, Schneider K, Chait BT, Chao TL, Keller H, Anderson S, Manjula BN, Kumar R, Acharya AS. Recombinant hemoglobin A produced in transgenic swine: structural equivalence with human hemoglobin A. *Art.Cells Blood Substit.Immob.Biotech.* 1994;22:695-700.

Rengasamy A, Johns RA. Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol.Pharmacol.*1993;44:124-128.

Reah G, Bodenham AR, Mallick A, Daily EK, Przybelski RJ. Initial evaluation of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb™) as a vasopressor in critically ill patients. *Crit.Care Med.* 1997;25:1480-1488.

Riess JG. Fluorocarbon-Based Oxygen-Delivery: Basic Principles and Product Development. In: *Blood substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, edited by TMS Chang. Karger Landes Systems, 1998, pp 101-126.

Richard V, Hogie M, Löffler BM, Thuillez C. Mise en évidence d'un rôle presseur de l'endothéline endogène après inhibition de la synthèse de monoxyde d'azote chez le rat. *Arch.Mal.Coeur* 1995;88:1213-1216.

Rioux F, Drapeau G, Marceau F. Recombinant human hemoglobin (rHb1.1) selectively inhibits vasorelaxation elicited by nitric oxide donors in rabbit isolated aortic rings. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1995a;25:587-594.

Rioux F, Petitclerc E, Audet R, Drapeau G, Fielding RM, Marceau F. Recombinant human hemoglobin inhibits both constitutive and cytokine-induced nitric oxide-mediated relaxation of rabbit isolated aortic rings. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1995b;24:229-237.

Rioux F, Drapeau G, Audet R, Burhop KE, Marceau F. Mechanism of the contractile effect of diaspirin-cross-linked hemoglobin in rat isolated aorta strip denuded of endothelium as revealed using an oil-immersion procedure. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1996;74:1171-1179.

Rohlfis RJ, Bruner E, Chiu A, Gonzales A, Gonzales ML, Magde D, Magde MD Jr, Vandegriff KD, Winslow RM. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J.Biol.Chem.* 1998;273:12128-12134.

Rosa J, Wajcman H, Blouquit Y. Hémoglobine. Editions Techniques. *Encycl.Méd.Chir.* (Paris-France), Hématologie, 13-000-S-10, 1993, 14p.

Rouvière R. Etude et développement d'un système de mesure de la vitesse de l'onde artérielle. *Mémoire de diplôme d'Ingénieur C.N.A.M., 15-05-1998.*

Rubinstein I, Gurbanov K, Hoffman A, Better OS, Winaver J. Differential effect of endothelin-1 on renal regional blood flow: Role of nitric oxide. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1995;26(Suppl.3):S208-S210.

Rudolph AS, Cliff RO, Klipper R, Goins B, Philipps WT. Circulation persistence and biodistribution of lyophilized liposome-encapsulated hemoglobin : An oxygen-carrying resuscitative fluid. *Crit.Care Med.* 1994;22:142-150.

Rudolph AS, Sulpizio A, Hieble P, MacDonald V, Chavez M, Feuerstein G. Liposome encapsulation attenuates hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segments. *J.Appl.Physiol.* 1997;82:1826-1835.

Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem.* 1997;8:23-30.

Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park S-I, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J.Biomed.Mater.Res.* 1998;40:66-78.

Sakas DE, Stranjalis G, Whittaker K, Whitwell HL. Perfluorochemical oxygen carriers: Potential uses in neurosciences. *Cerebrovasc.Brain Metab.Rev.* 1996;8:209-229.

Sarkozi L, Jacobs E, Clark T, Gawryl MS, Simson E. Effect of hemoglobin-based oxygen carrier-201 on common chemistry laboratory procedures. *Clin.Chem.* 1997;43:1792-1794.

Saxena R, Winjoud D, Man in 't Veld AJ, van den Meiracker AH, Boosma F, Przybelski RJ, Koudstaal PJ. Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on endothelin-1 and blood pressure in acute ischemic stroke in man. *J.Hypertension* 1998;16:1459-1465.

Scott MG, Kucik DF, Goodnough LT, Monk TG. Blood substitutes: evolution and future applications. *Clin.Chem.* 1997;43:1724-1731.

Sen AP, Dong Y, Saxena PR, Gulati A. Modulation of resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin by L-NAME in rats. *Shock* 1998;9:223-230.

Sharma AC, Gulati A. Yohimbine modulates diaspirin crosslinked hemoglobin-induced systemic hemodynamics and regional circulatory effects. *Crit.Care Med.* 1995a;23:874-884.

Sharma AC, Singh G, Gulati A. Role of NO mechanism in cardiovascular effects of diaspirin cross-linked hemoglobin in anesthetized rats. *Am.J.Physiol.* 1995b;269:H1379-H1388.

Shireman PK, Pearce WH. Endothelial cell function: Biologic and physiologic functions in health and disease. *Adv.Clin.Med.* 1996;166:7-13.

Shoemaker SA, Gerber MJ, Evans GL, Archer-Paik LE, Scoggin CH. Initial clinical experience with a rationally designed, genetically engineered recombinant human hemoglobin. *Art.Cells Blood Substit.Immob.Biotech.* 1994;22:457-465.

Sielenkämper AW, Chin-Yee IH, Martin CM, Sibbald WJ. Diaspirin crosslinked hemoglobin improves systemic oxygen uptake in oxygen supply-dependent septic rats. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1997;156:1066-1072.

Simoni J, Simoni G, Lox CD, Prien SD, Shires GT. Evidence for the direct inhibition of endothelin-1 secretion by hemoglobin in human endothelial cells. *ASAIO J.* 1995;41:M641-M651.

Sloand EM. Viral risks associated with blood transfusion. *Photochem.Photobiol.* 1997;65:428-431.

Sokolovsky M. Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGMP cascades. *Cell Mol. Neurobiol.* 1995;15:561-571.

Spahn DR, Leone BJ, Reves JG, Pasch T. Cardiovascular and coronary physiology of acute isovolemic hemodilution: a review of nonoxygen-carrying and oxygen-carrying solutions. *Anesth.Analg.* 1994;78:1000-1021.

Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997;276:2034-2037.

Standl T, Burmeister M-A, Horn E-P, Wilhelm S, Knoefel WT, Schulte am Esch J. Bovine haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver resection. *Br.J.Anaesth.* 1998;80:189-194.

Stetter MN, Baerlocher GM, Meiselman HJ, Reinhart WH. Influence of a recombinant hemoglobin solution on blood rheology. *Transfusion* 1997;37:1149-1155.

Stoltz J-F, Singh M, Riha P. Microrheological parameters. In : *Hemorheology in practice*. IOS Press Ohmsa, 1999:27-52.

Su D, Roth RI, Yoshida M, Levin J. Hemoglobin increases the mortality from bacterial endotoxin. *Infect.Immun.* 1997;65:128-1266.

Swan S, Halstenson CE, Collins AJ, Colburn WA, Blue J, Przybelski RJ. Pharmacologic profile of diaspirin cross-linked hemoglobin in hemodialysis patients. *Am.J.Kidney Dis.* 1995;26:918-923.

Szebeni J, Wassef NM, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in human serum by liposome-encapsulated haemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997;1285:127-130.

Tack I, Ader JL, Girolami JP. Monoxyde d'azote et rein. *La Revue du Praticien* 1997;47:1631-1636.

Talarico T, Swank A, Privalle C. Autoxidation of pyridoxalated hemoglobin polyoxyéthylène conjugate. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998;250:354-358.

Tedgui A. Transport de l'eau et des molécules dans la paroi artérielle. In : *Encyclopédie de l'artère*, Tome 3, Laboratoires Sandoz, 1990, pp14-19.

Tedgui A, Lévy B. Biologie de la paroi artérielle. Aspects normaux et pathologiques. Masson Ed. 1994, 87 p.

Toda N. Mechanisms of contracting action of oxyhemoglobin in isolated monkey and dog cerebral arteries. *Am.J.Physiol.* 1990;258:H57-H63.

Ulatowski JA, Bucci E, Nishikawa T. *et al.* Cerebral O₂ transport with hematocrit reduced by cross-linked hemoglobin transfusion. *Am.J.Physiol.* 1996a;270:H466-H475.

Ulatowski JA, Nishikawa T, Matheson-Urbaitis B, Bucci E, Traystman RJ, Koehler RC. Regional blood flow alterations after bovine fumaryl ββ-crosslinked hemoglobin transfusion and nitric oxide synthase inhibition. *Crit.Care Med.* 1996b;24:558-565.

Vallet B. Transport et utilisation de l'oxygène. In : *Physiologie en anesthésiologie*. Fondation européenne d'enseignement en anesthésiologie. Ed. Pradel, 1995: pp 119-137.

Vandegriff KD, McCarthy M, Rohlfs RJ, Winslow RM. Colloid osmotic properties of modified hemoglobins: chemically cross-linked versus polyethylene glycol surface-conjugated. *Biophys.Chem.* 1997;69:23-30.

Van Orden DE, Farley DB, Fastenow C, Brody MJ. A technique for monitoring blood flow changes with miniaturized Doppler flow probes. *Am.J.Physiol.* 1984;247:H1005-H1009.

Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, Roederer GO. Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation. *Am.J.Physiol.* 1996;271:H2346-H2352.

White CT, Murray AJ, Smith DJ, Greene JR, Bolin RB. Synergistic toxicity of endotoxin and hemoglobin. *J.Lab.Clin.Med.* 1986;108:132-137.

Winslow RM, K.W. Chapman. Pilot scale preparation of hemoglobin solutions. In: *Methods in Enzymology, Vol. 231, Hemoglobins, Part B: Biochemical and Analytical Methods*, ed. J. Everse, K.D. Vandegriff, R.M. Winslow: Academic Press, Orlando, 1994; pp 3-16.

Winslow RM, Gonzales A, Gonzales ML, Magde M, McCarthy M, Rohlfs RJ, Vandegriff KD. Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes in a rat hemorrhage model. *J.Appl.Physiol.* 1998; 85: 993-1003.

Yabuki A, Yamaji K, Ohki H, Iwashita Y. Characterization of a pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate as a physiologic oxygen carrier. *Transfusion* 1990;30:516-520.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.

Yoshida M, Roth R, Levin J. The effect of cell-free hemoglobin on intravascular clearance and cellular, plasma, and organ distribution of bacterial endotoxin in rabbits. *J.Lab.Clin.Med.* 1995;126:151-160.

Zuckerman SH, Evans GF, Bryan N. Interactions of recombinant (rHb1.1) and endotoxin in vivo : Effects on systemic tumor necrosis factor and interleukin-6 levels in lethal and sublethal murine models of endotoxemia. *J.Lab.Clin.Med.* 1997;130:427-433.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur DAUZAT Michel, Professeur, Laboratoire de Physiologie Cardiovasculaire,
Faculté de Médecine, Nîmes,**

**Monsieur MESSMER Konrad, Professeur, Institut für Chirurgische Forschung, München,
Allemagne**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur CARON Alexis

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE, une thèse intitulée :

**"Mise en évidence par ultrasonographie Doppler pulsé et analyse de l'effet
vasoconstricteur de trois solutions d'hémoglobine humaine modifiée
chimiquement".**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **"GENIE BIOLOGIQUE"**

Fait à Vandoeuvre le, **06 Mai 1999**

Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDOEUVRE CEDEX

*Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois*

.....
RÉSUMÉ : Plusieurs solutions à base d'hémoglobine sont actuellement évaluées en prospective transfusionnelle comme substituts sanguins potentiels. Selon sa formulation, chaque produit présente des propriétés physico-chimiques qui lui sont propres et est ainsi susceptible de modifier spécifiquement l'homéostasie cardiovasculaire. Nous avons comparé dans un modèle d'hémodilution isovolémique (hématocrite 30%), chez le lapin anesthésié, les effets hémodynamiques induits par trois solutions d'hémoglobine humaine modifiée chimiquement, une hémoglobine conjuguée au dextran-benzène-tétracarboxylate, ou Hb-Dex-BTC (en évaluation préclinique), une hémoglobine pontée, ou $\alpha\alpha$ -Hb, et une hémoglobine pontée polymérisée, ou Hemolink™ (toutes deux en essais cliniques). Nous avons analysé durant les 180 minutes suivant l'hémodilution, les variations de la pression artérielle moyenne, de la fréquence cardiaque, de la résistance périphérique, et des paramètres mesurés par ultrasonographie à effet Doppler pulsé, la vitesse sanguine aortique, rénale et fémorale, le coefficient de distensibilité aortique et l'indice de pulsatilité. Les résultats ont montré des augmentations de pression artérielle moyenne, de résistance périphérique et de l'indice de pulsatilité ainsi qu'une bradycardie, plus ou moins marquées et transitoires selon la solution d'hémoglobine, ce qui suggère un effet vasoconstricteur. Des études complémentaires, visant à mettre en évidence la pénétration de l'hémoglobine dans la cellule endothéliale *in vivo* et à évaluer les effets des solutions sur la volémie, sur les propriétés rhéologiques du sang et sur le tonus vasomoteur dans la microcirculation, nous ont permis de montrer et de discuter certains des mécanismes à l'origine de cette action vasoconstrictrice.

.....
Assessment by pulsed Doppler ultrasonography and analysis of the vasoactive effects induced by three chemically-modified human haemoglobin solutions.

.....
ABSTRACT : Several haemoglobin-based solutions are currently being evaluated as possible blood substitutes in transfusion medicine. The solutions have their own physico-chemical properties and are thus likely to induce specific changes in the cardiovascular balance. In anaesthetized rabbits subjected to normovolaemic haemodilution (hematocrit 30%), we compared the haemodynamic effects induced by three chemically-modified human haemoglobin solutions, dextran-benzene-tetracarboxylate-conjugated haemoglobin (Dex-BTC-Hb, in preclinical evaluation), cross-linked haemoglobin ($\alpha\alpha$ -Hb) and polymerized cross-linked haemoglobin (Hemolink™; both in clinical trials). During the 180-minute period following haemodilution, we assessed mean arterial pressure, heart rate, peripheral resistance and parameters obtained from pulsed Doppler ultrasonography, i.e. aortic, femoral and renal blood velocity, aortic distensibility and pulsatility index. The results showed the vasoconstrictive action of haemoglobin solutions through a rise in mean arterial pressure, peripheral resistance and pulsatility index, plus a bradycardia, which were transient and of varying degrees according to the infused solution. In order to emphasize some of the physiological mechanisms implied in this process and to discuss them, we carried out further experiments. We found that these mechanisms included the *in vivo* penetration of free haemoglobin into the endothelial cells and the effect of the solutions on volaemia, blood rheological properties and vasomotor tone in microcirculation.

.....
DISCIPLINE : Physiologie appliquée.

.....
MOTS-CLES : hémoglobine, transporteurs d'oxygène, hémodynamique, hémodilution, Doppler pulsé, echo-tracking, rhéologie, microcirculation.

.....
Laboratoire Hématologie-Physiologie, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy 1
5, rue Albert Lebrun, F-54001 Nancy.