



**HAL**  
open science

# Propriétés rhéologiques et perméabilité à l'oxygène des milieux biologiques : diffusion de l'oxygène des érythrocytes aux tissus

Dominique Dumas

► **To cite this version:**

Dominique Dumas. Propriétés rhéologiques et perméabilité à l'oxygène des milieux biologiques : diffusion de l'oxygène des érythrocytes aux tissus. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1997. Français. NNT : 1997NAN19010 . tel-01748600

**HAL Id: tel-01748600**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748600v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I  
1997

---

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 4 novembre 1997  
pour obtenir le titre de



DOCTEUR DE L'UNIVERSITE  
HENRI-POINCARÉ NANCY I

Spécialité : Génie Biologique et Médical  
U.F.R. Sciences Médicales

par  
Dominique DUMAS

PROPRIETES RHEOLOGIQUES ET PERMEABILITE A L'OXYGENE DES  
MILIEUX BIOLOGIQUES.

Diffusion de l'oxygène des érythrocytes aux tissus

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs :



Docteur Jean Claude VOEGEL, Directeur de Recherche de l'INSERM, Strasbourg  
Professeur René SANTUS, Muséum d'Histoire Naturelle, INSERM, Paris

Juges :

Docteur Marie-Laure VIRIOT, Directeur de Recherche du CNRS, Nancy  
Docteur Sylvaine MULLER, Chargé de Recherche de l'INSERM, Nancy  
Docteur Francis BAROS, Chargé de Recherche du CNRS, Nancy  
Professeur Jean-François STOLTZ, Directeur de Thèse, Vandoeuvre-lès-Nancy

Travail de thèse effectué au sein du

Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie  
EAD 1728 - MERS et équipe FR CNRS-UHP-INPL-CHU W0070

Faculté de Médecine-Hématologie-Bâtiment E-Brabois  
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy

sous la direction de Monsieur le Professeur STOLTZ

## AVANT-PROPOS

*A mes juges :*

**Madame le Docteur M.L. VIRIOT,**

Pour l'attention qu'elle a manifesté et pour les discussions et remarques intéressantes et constructives qu'elle m'a apportées, je lui exprime mes remerciements et ma profonde gratitude.

**Madame le Docteur S. MULLER,**

Elle m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury. Pour son aide et ses nombreux conseils, je la remercie vivement.

**Monsieur le Docteur F. BAROS,**

Je lui exprime ma plus vive reconnaissance pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de faire partie du jury ainsi que pour ses conseils éclairés dans le domaine de la fluorescence.

*A mon directeur de recherche et chef de service :*

**Monsieur le Professeur J.F STOLTZ,**

Il a assuré la direction de cette thèse que j'ai eu plaisir à mener. Je vous adresse mes remerciements pour m'avoir donné la possibilité de poursuivre les études que nous avons entreprises. Soyez assuré de ma reconnaissance et de tout mon respect.

*A mes rapporteurs :*

**Monsieur le Professeur R. SANTUS,**

Il m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

**Monsieur le Docteur J.C. VOEGEL,**

Je le remercie vivement pour l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail en acceptant d'en être le rapporteur.

Je tiens également à remercier toutes celles et ceux qui ont participé à ce travail :

**M. GENTILS ET G. CAUCHOIS**, pour les mesures de rhéologie sanguine, leur entière disponibilité et leur gentillesse.

**C. WENDLING** pour son amitié, son soutien et ses encouragements.

**J. DIDELON** pour son soutien, son aide et sa bonne humeur.

**F. GOUIN**, pour ses participations aux diverses expériences réalisées dans le domaine de la fluorescence.

**JC HUMBERT, V. LATGER**, Gilles, Doris et Françoise pour leur participation aux expériences de cytométrie en flux et leur bonne humeur (Service Cytologie, CHUR Nancy-Brabois).

Madame le Professeur **RJ. VALVERDE (Nita)** et Monsieur le Professeur **RF. RASIA (Tito)**, pour leurs conseils et leur amitié argentine.

Madame le Docteur **V.REGNAULT**, pour ses conseils.

Ainsi que Madame Donner, Monsieur Maugras, Thierry, Francine, Walter, Xang, Sun, Lalie, Séverine, Christelle, Marie-Christiane etc. pour leur participation de près ou de loin au travail et pour leur sympathie.

Je remercie également Monsieur le Professeur **BOISSEAU** pour nous avoir cédé la lignée cellulaire ECV 304 et Monsieur le Docteur **SCHOONEMAN** pour nous avoir permis d'utiliser les produits sanguins provenant de l'E.T.S Nancy-Brabois.

*A Nadine, Amandine et Julien,*

*A mes parents,*

*A ma famille,*

*A mes amis.*

# SOMMAIRE



INTRODUCTION GENERALE	1
<b>PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>6</b>
<b><u>I.1) Transport et distribution de l'oxygène par le système circulatoire</u></b>	<b>6</b>
<b>I.1.1) Le système circulatoire</b>	<b>6</b>
I.1.1.1) Anatomie descriptive du système circulatoire	6
I.1.1.2) Ecoulement du sang dans le système circulatoire	7
a) Le système à haute pression	8
b) Le système à basse pression	8
b1) La circulation capillaire	8
b2) Mécanisme de la circulation capillaire	9
b3) La perméabilité capillaire	9
c) Régulations particulières	10
c1) La circulation coronaire	10
c2) La circulation cérébrale	10
c3) Les vasa-vasorum	11
I.1.1.3) Rhéologie dans le système circulatoire	11
a) Définition	11
b) Conditions d'écoulement du sang dans le système circulatoire	12
c) Rhéologie et microcirculation	13
I.1.1.4) Vasomotricité	15
a) Définition et rôle	15
b) Régulation de la vasomotricité	15
I.1.1.5) Les constituants des compartiments traversés par l'oxygène	16
a) Le plasma	16
b) L'érythrocyte	17
c) Les cellules endothéliales vasculaires	22
<b>I.1.2) Le transport de l'oxygène des poumons aux tissus</b>	<b>24</b>
I.1.2.1) Transport global de l'oxygène des poumons aux hématies	24
a) La surface de séparation gaz-sang	25
b) Ecoulement de l'air dans les poumons	26
c) Vaisseaux sanguins et débits sanguins	26
d) Le transfert alvéolo-capillaire	27
d1) Transfert membranaire des gaz alvéolaires	27
d2) Cas des shunts intrapulmonaires	29



e) Fixation hémoglobine-oxygène	29
e1) L'hémoglobine	31
e2) Substituts de la fonction de transfert d'oxygène	32
e3) Fixation de l'oxygène à l'hémoglobine	32
e4) Transport facilité en présence d'hémoglobine ou de myoglobine	33
I.1.2.2) Transport global de l'oxygène aux tissus par le système circulatoire	33
a) Pression partielle en oxygène du sang artériel ( $PaO_2$ )	35
b) Rapport entre la concentration en oxygène inspiré ( $FIO_2$ ) et la $PaO_2$ .	35
I.1.2.3) Libération de l'oxygène	37
a) Diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène	38
b) Augmentation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène	38
c) Intérêt clinique de la $PaO_2$ .	38
I.1.2.4) Diffusion de l'oxygène dans les tissus	39
a) Diffusion facilitée en présence de myoglobine	39
b) Evaluation de l'état d'oxygénation tissulaire	40
b1) La pression partielle en $O_2$	42
b2) Le contenu en $O_2$ du sang	41
b3) L'affinité de l'hémoglobine pour l' $O_2$	42
I.1.2.5) Les types d'échange de l'oxygène au niveau cellulaire	42
a) La diffusion	42
b) La convection	43
c) Description de modèles de diffusion de l'oxygène	43
d) Exemple de paramètres affectant la diffusion de l'oxygène dans la membrane érythrocytaire	44
I.1.2.6) Mécanismes cardiopulmonaires de compensation de l'hypoxémie	45
a) Les chémorécepteurs (corps neuroépithéliaux)	45
b) Développement d'une circulation collatérale en cas d'ischémie	46
<b>I.1.3) Etat des connaissances et problématique posée</b>	<b>48</b>
<b><u>I.2) Choix de la méthode de dosage de l'oxygène moléculaire</u></b>	<b>49</b>
<b>I.2.1) Cahier des charges des contraintes expérimentales</b>	<b>50</b>
<b>I.2.2) Méthodes d'investigation : méthodologie</b>	<b>51</b>
I.2.2.1) La polarographie	51
a) Principe	52
b) Applications	52
c) Avantages	52
d) Inconvénients	52

e) Valeurs liées	53
I.2.2.2) L'oxymétrie	54
a) Principe	54
b) Applications	54
c) Avantages	55
d) Inconvénients	55
e) Valeurs liées	56
f) Cas de l'oxymètre de pouls	57
I.2.2.3) La résonance para électronique et la spectroscopie dans le proche Infra-Rouge	58
I.2.2.4) La luminescence (fluorescence-phosphorescence)	58
a) Principe	59
b) Applications	60
c) Avantages	60
d) Inconvénients	60
e) Valeurs liées	60
I.2.2.5) La microscopie quantitative (cytométrie par analyse d'image)	61
a) Principe de la microscopie quantitative	61
b) Applications	61
c) Avantages	61
d) Inconvénients	62
I.2.2.6) Choix de la méthodologie	62
<b><u>I.3) Capteurs optiques</u></b>	63
<b>I.3.1) Principe des capteurs optiques</b>	64
<b>I.3.2) Capteurs optiques de l'oxygène basé sur la fluorescence</b>	64
I.3.2.1) Historique	64
I.3.2.2) Détermination du contenu en oxygène par une technique de fluorescence	65
a) Méthode liée à la concentration en NADH	65
b) Méthode liée à l'inhibition de fluorescence par l'oxygène	65
<b>I.3.3) La fluorescence</b>	67
I.3.3.1) Généralités	67
a) Quelques propriétés des fluorochromes utilisés	68
a1) Ecart de Stokes	68
a2) Coefficient d'extinction	68
a3) Rendement quantique	68
a4) Photostabilité	69
b) Interactions avec des constituants endogènes ou exogènes	69
b1) Fluorescence intrinsèque	69
b2) Rôle de la concentration et effet de filtre interne	70

c) Les modes de résolution de la fluorescence	70
c1) Résolution spatiale : anisotropie de fluorescence	70
c2) Résolution statique : intensité de fluorescence	70
c3) Résolution temporelle : durée de vie de fluorescence	71
d) Intensité ou durée de vie ?	72
<b>I.3.4) Phénomènes d'inhibition de la fluorescence</b>	<b>73</b>
I.3.4.1) Généralités	73
I.3.4.2) Inhibition de type statique	73
I.3.4.3) Inhibition de type dynamique	73
I.3.4.4) Transfert d'énergie	74
I.3.4.5) Les inhibiteurs de fluorescence	74
I.3.4.6) Inhibition de la fluorescence par l'oxygène	75
<b><u>I.3.5) Détermination des paramètres liés à la diffusion de l'oxygène</u></b>	<b>76</b>
I.3.5.1) Généralités	76
I.3.5.2) Constante bimoléculaire $k_q$ et diffusibilité de l'oxygène	76
I.3.5.3) Coefficient de diffusion de l'oxygène	78
a) Equation de Smoluchowski	79
b) Equation de Stokes-Einstein	80
c) Equation de Einstein-Smoluchowski	80
<b>DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES</b>	<b>81</b>
<b><u>II.1) Matériels d'origine biologique</u></b>	<b>81</b>
<b>II.1.1) Hématies</b>	<b>81</b>
<b>II.1.2) Plasma</b>	<b>81</b>
<b>II.1.3) Cellules endothéliales</b>	<b>82</b>
II.1.3.1) Culture cellulaire	82
II.1.3.2) Supports de culture "in vitro"	83
II.1.3.3) Entretien de la culture	83
II.1.3.4) Concentration et viabilité cellulaire	84
II.1.3.5) Culture en boîtes	84
II.1.3.6) Culture sur lamelles couvre-objets rondes	87
<b><u>II.2) Matériels et méthodes</u></b>	<b>85</b>
<b>II.2.1) Incorporation de cholestérol</b>	<b>86</b>
II.2.1.1) Principe	86
II.2.1.2) Incorporation de cholestérol dans les hématies	87
II.2.1.3) Incorporation de cholestérol dans les cellules endothéliales	87

<b>II.2.2) Fixation des hématies au glutaraldéhyde</b>	87
<b>II.2.3) Mesure de la résistance à l'hémolyse (fragilité osmotique)</b>	88
<b>II.2.4) Mesure de la déformabilité des hématies</b>	88
<b>II.2.5) Préparation des membranes d'érythrocytes</b>	89
II.2.5.1) Tampons	89
II.2.5.2) Hémolyse hypotonique rapide	90
<b>II.2.6) Mesure de la fluidité membranaire</b>	90
II.2.6.1) Mesure des anisotropies de fluorescence	90
a) Principe	90
b) Réactifs et sondes fluorescentes utilisés	91
c) Protocole de marquage	93
c1) Marquage des hématies intactes avec les acides stéariques 6AS et 12AS	93
c2) Marquage des membranes d'hématies avec le DPH et le TMA-DPH	93
c3) Marquage d'une monocouche de cellules endothéliales	93
d) Appareillage	93
d1) Mesure en cuve sur des suspensions : hématies et membranes	93
d2) Mesure sur lamelle : monocouche de cellules endothéliales	94
II.2.6.2) Mesure de la formation d'excimères intermoléculaires de dérivés du pyrène	94
a) Principe	94
b) Mesure	94
<b>II.2.7) Dosages biochimiques</b>	95
II.2.7.1) Protéines membranaires	95
a) Méthode de Lowry	95
a1) Principe	95
a2) Réactifs et protocole	96
b) Méthode à l'acide bicinchoninique	96
b1) Principe	97
b2) Réactifs et protocole	97
c) Choix de la méthode de dosage des protéines et du standard	97
II.2.7.2) Extraction du cholestérol membranaire	98
a) Principe	98
b) Réactifs et protocole	98
II.2.7.3) Dosage du cholestérol	99
a) Principe	99
b) Réactifs et protocole	99
II.2.7.4) Dosage de l'hémoglobine membranaire résiduelle	100
a) Principe	100
b) Réactifs et protocole	100
II.2.7.5) Composition biochimique des suspensions de plasma	101

II.2.8) Viscosité des solutions de glycérol et des plasmas sanguins	101
<b>II.2.9) Etalonnage du mélangeur de gaz avec une électrode à oxygène</b>	103
II.2.9.1) Description des appareils	103
II.2.9.2) Mesure de la linéarité de la réponse des débitmètres	104
<b>II.2.10) Expériences d'inhibition de fluorescence par l'oxygène</b>	105
II.2.10.1) Configurations matérielles et mesure des signaux de fluorescence	105
a) Mesure du signal de fluorescence dans une cuvette à circulation en quartz dans une cuvette	105
b) Mesure dans une chambre d'analyse en "configuration microscopie"	105
b1) Inhibition de fluorescence par l'oxygène des dérivés pyréniques dans les cellules endothéliales en "configuration microscopie"	108
b2) Inhibition de fluorescence du Ru(phen) par l'oxygène dans les cellules endothéliales en configuration microscopie	108
b3) Inhibition de fluorescence du Ru(phen) par l'oxygène dans un gel de gélatine en "configuration microscopie"	109
II.2.10.2) Réactifs et sondes fluorescentes	110
a) Formules chimiques	110
b) Concentrations en sondes fluorescentes	110
b1) Dérivés pyréniques: PBA, PDA, P <sub>10</sub> DA, P <sub>10</sub> DA-Chol	111
b2) Dérivé du ruthénium (Ru(phen))	113
b3) Protocole de marquage	115
b31) Solutions de glycérol dans l'eau distillée	115
b32) Suspensions de plasmas sanguins humains	115
b33) Suspensions d'érythrocytes humains	115
b34) Suspensions de membranes d'érythrocytes humains	117
b35) Suspensions de cellules endothéliales humaines	117
b36) Monocouche de cellules endothéliales humaines	117
II.2.10.3) Mesure des intensités et détermination des durées de vie	117
a) Mesure des intensités de fluorescence	119
a1) Mesure à l'aide d'un photomultiplicateur	119
a2) Mesure à l'aide d'une caméra CCD (Coupled Charge Device)	119
b) Détermination des durées de vie de fluorescence	122
b1) Fluorimétrie de phase	122
b11) Montage expérimental	123
b12) Fonctionnement	124
b13) Détermination des durées de vie	125
b2) Boxcar	128
b21) Montage expérimental	128
b22) Excitation avec un laser pulsé	128
b23) Signal de déclenchement par une photodiode	130
b24) Retard par rapport au signal de déclenchement	130

b25) Détection de la fluorescence par un photomultiplicateur	130
b26) Boxcar et système de Mesure couplé à un Microscope (MM)	131
b27) Boxcar et système de Mesure en Cuvette (MC)	131
b28) Détermination des durées de vie	132
b3) Comptage monophotonique par excitation pulsée	134
b31) Principe et montage expérimental	134
b32) Détermination des durées de vie	136
<b>II.2.11) Validation des paramètres de détermination des durées de vie</b>	<b>138</b>
II.2.11.1) Modulation de phase	138
a) Influence de la concentration en sonde dans un solvant (EtOH)	138
b) Influence de la concentration en sondes dans la membrane érythrocytaire	138
c) Influence du solvant et du lavage après marquage	138
d) Inhibition de fluorescence des dérivés stériques par l'oxygène	139
II.2.11.2) Comptage monophotonique	141
II.2.11.3) Boxcar MC et mesure sur une suspension cellulaire	142
a) Influence des filtres sur le signal de fluorescence	142
b) Influence de la concentration en sonde dans un solvant (EtOH)	144
II.2.11.4) Boxcar MM et mesure sur une monocouche cellulaire	145
a) Influence de l'objectif	145
b) Influence de la bague de correction plastique/verre de l'objectif	147
c) Influence de la mise au point/focalisation	147
d) Influence du nombre de cellules observées	148
e) Effet de l'état de confluence	149
f) Influence du temps d'exposition	150
II.2.11.5) Comparaison entre les techniques de détermination des durées de vie	151
II.2.11.6) Qualité des mesures	152
a) Fluorimétrie de phase	152
b) Système de type Boxcar	152
c) Comptage monophotonique	152
II.2.11.7) Précision des valeurs de $\tau_0$	153
<b>TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	<b>154</b>
<b><u>III.1) Effet de l'hémoglobine sur la fluorescence</u></b>	<b>154</b>
III.1.1) Influence du glutaraldéhyde sur la diffusion de l'oxygène dans les hématies	154

Article 1 :

**Effect of glutaraldehyde on hemoglobin-dependent quenching of pyrene fluorescence. Application to oxygen diffusion in erythrocyte. D Dumas, F Gouin, ML Viriot, JF Stoltz.**

III.1.2) Influence du taux d'hémoglobine résiduelle membranaire sur le signal de fluorescence 156

**III.2) Effet de la rigidification membranaire sur la diffusion de l'oxygène dans la membrane d'érythrocyte** 158

III.2.1) Influence du cholestérol sur la déformabilité et la fragilité osmotique 160

Article 2 :

**Influence du cholestérol sur la déformabilité cellulaire et la fragilité osmotique des hématies. D Dumas, J Didelon, JC Humbert, T Gigout, RJ Rasia, JF Stoltz.**

III.2.2) Influence du cholestérol sur la diffusion de l'oxygène dans la membrane d'érythrocytes. 162

III.2.2.1) Détermination du type d'inhibition en présence de cholestérol 162

Article 3 :

**Mesure de la diffusivité de l'oxygène par inhibition de fluorescence de sondes pyréniques dans la membrane d'érythrocyte enrichie en cholestérol. D Dumas, S Muller, F Baros, F Gouin, ML Viriot, A Taccoen, JF Stoltz.**

III.2.2.2) Fluidité membranaire et diffusion de l'oxygène dans la membrane érythrocytaire 164

Article 4 :

**Membrane fluidity and Oxygen Diffusion in Cholesterol-Enriched Erythrocyte Membrane. D Dumas, S Muller, F Gouin, F Baros, M-L Viriot, J-F Stoltz.**

**III.3) Effet de la viscosité plasmatique sur la diffusion de l'oxygène** 165

III.3.1) Influence de la viscosité de diverses solutions sur la diffusion de l'oxygène 165

III.3.2) Influence de la viscosité d'une solution de plasma sur la diffusion de l'oxygène 167

III.3.3) Discussion 169

**III.4) Diffusion de l'oxygène dans l'endothélium** 170

III.4.1) Effet du détachement des cellules endothéliales sur le phénomène d'inhibition de fluorescence des dérivés pyréniques 171

III.4.1.1) Spectres d'émission de fluorescence des dérivés pyréniques sur une suspension de cellules endothéliales 171

III.4.1.2) Détermination des durées de vie des dérivés pyréniques sur une suspension de cellules endothéliales par fluorimétrie de phase 173

III.4.1.3) Détermination des durées de vie des dérivés pyréniques sur une monocouche de cellules endothéliales par microscopie à fluorescence résolue dans le temps 174

III.4.1.4) Discussion	175
III.4.2) Perméabilité à l'oxygène d'une monocouche de cellules endothéliales recouverte de plasma. Etude par inhibition de fluorescence du Ru(phen) par microscopie résolue dans le temps	179
III.4.2.1) Influence du gel	180
III.4.2.2) Influence de la concentration en Ru(phen) dans le gel	180
III.4.2.3) Influence d'un film de polymère (PLGA) déposé sur le gel	181
III.4.2.4) Temps de réponse du système	183
III.4.2.5) Influence d'une monocouche de cellules endothéliales cultivées sur un gel de gélatine.	185
III.4.2.6) Influence d'une monocouche de cellules endothéliales cultivées sur un gel de gélatine et recouverte de plasmas plus ou moins visqueux	185
III.4.2.7) Discussion	186
<b><u>III.5) Effet de la rigidification membranaire sur la diffusion de l'oxygène dans la membrane de cellules endothéliales humaines en culture</u></b>	188
Influence du cholestérol sur la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales à l'oxygène	
Article 5 :	
Effect of rigidification induced by cholesterol on oxygen permeability of cultured human endothelial cell monolayer. <u>D Dumas, M-L Viriot, J- F Stoltz</u>	199
<b><u>III.6) Discussion générale</u></b>	201
<b><u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u></b>	209
<b><u>ANNEXES</u></b>	210
<b><u>QUATRIEME PARTIE : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	223



## ANNEXES:

### A 1 : LA FLUORESCENCE

#### A1.1) Généralités

#### A1.2) Fluorimétrie résolue dans le temps : mesure des durées de vie de fluorescence à l'état excité

- a) Fluorimétrie de phase
- b) Boxcar
- c) Comptage monophotonique par excitation pulsée

#### A1.3) Polarisation de fluorescence

##### Article

**Interaction of a Phosphatidylcholine Derivative of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) with Intact Living Cells : Steady-State Fluorescence Polarization and Phase Fluorometry Studies.**

**L Miccoli, C Szczepaniak,**

**D Dumas, S Savonnière, S Muller, MC Carré and M Donner. Journal of Fluorescence (1993) 3,4, 251-255.**

### A.2: Le Fragilimètre

##### Article

**Development on an automated, slow dialysis device for measuring erythrocyte osmotic resistance. J Didelon, T Gigout, D Dumas, JC Humbert, G Gauchois, M Gentils, JF Stoltz. Innovation and technology in biology and Medicine (1996) 17, 4, 337-351.**

### A3 : La chambre de mesures

### A4 : Physique des gaz et métrologie

#### A4.1) Généralités

#### A4.2) Terminologie

#### A4.3) Valeurs mesurées

#### A4.4) Taux d'oxygène dans le sang

#### A4.5) Lois établies

### A5 : Microscopie quantitative (cytométrie par analyse d'image).

#### A5.1) Généralités

#### A5.2) Acquisition des images

#### A5.3) Amélioration d'images

#### A5.4) Paramètres fluorimétriques

#### A5.5) Analyse des données

#### A5.6) Type de capteurs utilisés

#### A5.7) Standardisation et normalisation

## ABREVIATIONS

Abs	Absorbance
Boxcar MC	Boxcar et système de mesure en Cuve
Boxcar MM	Boxcar et système de mesure couplé au microscope à fluorescence
CCD	Couple Charged Device
DI	Capacité de transfert pulmonaire
FIO <sub>2</sub>	Concentration en oxygène de l'air inspiré
Qc	Débit sanguin d'un capillaire pulmonaire
PBA	Acide 4-(1-pyrène) butyrique
PBS	Tampon Phosphate Isotonique
PDA	Acide 12-(1-pyrène) dodécanoïque
PaO <sub>2</sub>	Pression partielle artérielle en oxygène (sang)
PAO <sub>2</sub>	Pression partielle alvéolaire en oxygène (pulmonaire)
P <sub>10</sub> DA	Acide 10-(1-pyrène) décanoïque
P <sub>10</sub> DA-Chol	Acide 10-(1-pyrène)-10 ketodecanoyl-cholesterol
PM	Photomultiplicateur
Ru(phen)	Tris(1,10-phénantroline)ruthénium(II)chloride hydrate
Ru(Ph <sub>2</sub> phen)	Tris(4,7-diphényl-1,10-phénantroline)ruthénium(II)
SaO <sub>2</sub>	Saturation en oxygène
Tc	temps de séjour d'un globule rouge dans un capillaire pulmonaire
UV	Ultra-violet
VI	Volume de gaz en mL transféré dans le sang par minute

## NOTATIONS

$\phi$	Rendement quantique de fluorescence
h	Constante de Planck (=6,626 10 <sup>-34</sup> J.s)
F	Intensité de fluorescence
F <sub>0</sub>	Intensité de fluorescence en absence d'oxygène
K <sub>sv</sub>	Constante de Stern-Volmer
$\tau$	Durée de vie de fluorescence (=1/k)
$\tau_0$	Durée de vie de fluorescence en absence d'oxygène
$\nu$	Fréquence d'un photon
K <sub>a</sub> , K <sub>f</sub> , K <sub>nr</sub> , K <sub>q</sub>	Constantes cinétiques relatives à l'absorption, la fluorescence, les transitions non radiatives, l'inhibition dynamique.
I <sub>e</sub>	Intensité de fluorescence de l'excimère (470nm)
I <sub>m</sub>	Intensité de fluorescence du monomère(376nm)
K <sub>s</sub>	Constante d'inhibition statique
K <sub>d</sub>	Constante d'inhibition dynamique
K <sub>q</sub>	Constante d'inhibition bimoléculaire (accessibilité)
k	Somme des constantes de vitesses de disparition de la molécule excitée (=1/ $\tau$ )
$\epsilon$	Coefficient d'extinction molaire
$\gamma$	Efficacité du processus d'inhibition de fluorescence
C/Pt	Rapport des concentrations de Cholestérol et des protéines
Pe	nombre de Peclet
Z	hindrance vasculaire
$\eta$	viscosité

*Introduction Générale*

L'oxygène d'origine pulmonaire traverse la membrane érythrocytaire avant de se fixer à l'hémoglobine et d'être libéré au niveau des tissus. Le transport et la libération de l'oxygène sont des phénomènes qui mettent en jeu des mécanismes physico-chimiques et mécaniques complexes.

Le transport global de l'oxygène, estimé par le débit moyen en hémoglobine dans les vaisseaux, a été très largement étudié en utilisant les paramètres rhéologiques macroscopiques du sang, c'est-à-dire principalement à partir de la viscosité plasmatique et de la viscosité sanguine.

Les propriétés rhéologiques microscopiques des cellules sanguines (agrégation et déformabilité) affectent également de manière importante le transport global en oxygène. En effet, dans la microcirculation, l'agrégation érythrocytaire est responsable des valeurs élevées de la viscosité sanguine aux faibles vitesses de cisaillement. De plus, dans un capillaire de diamètre inférieur à la taille d'une hématie, les propriétés élongationnelles des hématies soumises à un champ de cisaillement (déformabilité) modifient les vitesses locales et les temps de transit, c'est-à-dire l'intervalle de temps durant lequel a lieu la libération de l'oxygène (selon l'affinité Hb-O<sub>2</sub> et la pression partielle en O<sub>2</sub>).

Pour apprécier le degré d'oxygénation tissulaire, c'est-à-dire quantifier l'apport en oxygène des tissus, certains modèles ont été développés mais présentent souvent l'inconvénient d'être trop restrictifs au niveau des phénomènes pris en compte. Ainsi au niveau des modèles développés à ce jour, seuls les paramètres liés au transport global de l'oxygène et aux mécanismes de diffusion (libération de l'oxygène dans les capillaires) sont intégrés. Actuellement, les connaissances sur les phénomènes de diffusion et de convection qui régissent le transfert de l'oxygène à travers les diverses membranes biologiques traversées (hématies, cellules endothéliales...) ne permettent pas d'établir de modèles proches des données expérimentales.

Si les approches rhéologiques macroscopiques et microscopiques ont constitué l'essentiel des recherches sur le transport global de l'oxygène, l'aspect moléculaire, c'est-à-dire la fluidité membranaire des éléments figurés du sang, a été peu abordé. Les relations entre les paramètres rhéologiques microscopiques (agrégation et déformabilité) et les paramètres rhéologiques moléculaires (fluidité membranaire) ne permettent pas d'extrapoler les résultats des calculs du

transport global de l'oxygène aux phénomènes de diffusion membranaire de l'oxygène, puisque ne relevant pas du même niveau d'investigation.

Une approche plus fine au niveau moléculaire a été développée au Laboratoire d'Angio-Hématologie, en collaboration avec le Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie (GRAPP-DCPR URA 328 du CNRS, ENSIC-INPL, à Nancy). Elle porte sur l'utilisation d'une méthode spectroscopique d'émission moléculaire, la fluorescence. La fluorescence est un phénomène physique qui a permis le développement d'outils précieux pour la prise d'informations à l'échelle moléculaire. Ces différentes résolutions, en particulier la résolution spatiale, a permis de mettre au point une méthode de polarisation de fluorescence qui renseigne sur la fluidité membranaire. Par ailleurs, le phénomène d'inhibition de fluorescence par l'oxygène moléculaire est mis à profit pour étudier l'accessibilité de sondes fluorescentes membranaires par l'oxygène, c'est-à-dire le phénomène de diffusion de l'oxygène. Une autre résolution de la fluorescence est également mise à profit, pour la détermination des durées de vie des états excités (résolution temporelle). Cette homogénéité dans le choix du phénomène physique mis en œuvre dans les méthodes d'investigation, la fluorescence, présente l'avantage de limiter les appareillages de mesure et d'analyser des études comparatives de manière cohérente.

Le but de ce travail a été d'examiner l'influence des divers compartiments biologiques traversés lors du transfert de l'oxygène des érythrocytes aux tissus. Cette approche du phénomène de la diffusion de l'oxygène à l'échelle moléculaire a nécessité le développement au sein de notre laboratoire d'une instrumentation spécifique, en particulier pour la détermination des durées de vie de fluorescence en microscopie. Nous avons également développé des modèles sous des conditions physiologiques, reproduisant la résistance membranaire au transfert passif de l'oxygène dans les membranes d'érythrocytes et de cellules endothéliales rigidifiées. Une relation a été établie entre les propriétés rhéologiques (rigidification membranaire par incorporation de glutaraldéhyde ou de cholestérol) et la diffusion de l'oxygène.

Ce mémoire se présente en trois parties.

Dans la première partie, nous allons d'abord rappeler le cheminement de l'oxygène d'origine pulmonaire jusqu'à l'oxygène dissous libéré au niveau des tissus. En particulier nous détaillerons le système de distribution de l'oxygène, par le biais des globules rouges à travers le système circulatoire. Nous exposerons ensuite les connaissances actuelles rapportées dans la littérature concernant les écoulements du sang dans le système circulatoire et en particulier dans

la microcirculation qui représente l'interface entre l'appareil circulatoire et les tissus qu'il irrigue. Entre la libération dans les capillaires et l'oxygénation tissulaire, divers compartiments biologiques sont traversés par l'oxygène moléculaire qui sont susceptibles de présenter une résistance à la diffusion passive de l'oxygène. Ceux-ci, principalement la membrane érythrocytaire, le plasma, l'endothélium et la paroi vasculaire seront décrits.

Nous essaierons de distinguer le transport global de l'oxygène des poumons aux hématies, le transport global de l'oxygène par le système circulatoire, la libération de l'oxygène et sa diffusion dans les tissus. Les types d'échanges de l'oxygène moléculaire seront ensuite abordés, à savoir les phénomènes de diffusion et de convection. Enfin, un état des connaissances montrera que les moyens d'investigation dont disposent les cliniciens ne donnent pas accès au degré d'oxygénation tissulaire mais uniquement à une appréciation des signes extérieurs d'hypoxie.

Ensuite, nous nous attacherons à définir les moyens d'investigation à mettre en œuvre et qui traduisent au mieux le phénomène de diffusion de l'oxygène. Il s'agit des techniques pour lesquelles les valeurs mesurées reflètent la teneur en oxygène. Un cahier des charges intégrant de nombreuses contraintes a été élaboré. Nous détaillerons les méthodologies développées actuellement pour mesurer la teneur en oxygène moléculaire d'une solution (polarographie, oxymétrie, RPE, fluorescence-phosphorescence). Au regard des diverses techniques évoquées, nous avons retenu la fluorimétrie comme méthode principale d'investigation du phénomène de diffusion de l'oxygène, sous le terme général de capteur optique.

Puis, après avoir décrit le phénomène de fluorescence, nous détaillerons le principe d'un capteur optique basé sur l'inhibition de fluorescence par l'oxygène. Une étude historique présentera les différentes évolutions de ces capteurs. Actuellement, les travaux s'orientent vers l'utilisation de sondes fluorescentes présentant une grande durée de vie des états excités. Nous retracerons une approche fine au niveau moléculaire avec deux approches complémentaires : fluorescence statique (intensité de fluorescence) et fluorescence résolue dans le temps (durée de vie des états excités précurseurs de la fluorescence). Les principes des phénomènes d'inhibition de fluorescence seront décrits en mettant l'accent sur l'inhibition de la fluorescence par l'oxygène qui donne accès aux coefficients de diffusion de l'oxygène.

Dans la deuxième partie, nous détaillerons les matériels d'origine biologique utilisés dans les expériences sur la diffusion de l'oxygène (hématies, plasma et cellules endothéliales). Nous aborderons ensuite les méthodologies mises en œuvre. Celles-ci comprennent les dosages biochimiques, les techniques apportant des informations en terme de propriétés rhéologiques

macroscopique, microscopique et moléculaire. Nous développerons tout particulièrement les mesures des intensités et des durées de vie de fluorescence en fluorimétrie de phase, en comptage monophotonique et avec un système de type Boxcar. Nous avons distingué les déterminations des durées de vie avec un système Boxcar de mesure en cuve (Boxcar MC) et une nouvelle approche développée au laboratoire, le système Boxcar de mesure couplé à un microscope à fluorescence (Boxcar MM). Il s'agit d'une technique quantitative de microscopie de fluorescence résolue dans le temps. De nombreux paramètres ont été testés pour valider cette approche microscopique, qui donne accès à des déterminations des durées de vie de fluorescence à l'échelle cellulaire. Les calculs qui permettent de déterminer les coefficients de diffusion de l'oxygène à partir des constantes d'inhibition de fluorescence seront présentés.

Ensuite, munis de ces outils, nous appliquerons ces techniques à l'étude des relations entre les paramètres rhéologiques (macroscopiques, microscopiques et moléculaires) et le phénomène de diffusion de l'oxygène. Ceci constituera la troisième partie "Résultats et Discussions" qui concerne les résultats des travaux sur les relations entre la rigidification membranaire, la perméabilité membranaire et la diffusion de l'oxygène.

Au préalable, une étude mettant en évidence l'effet inhibiteur de l'hémoglobine sur le signal de fluorescence (intensité et durée de vie) a été menée sur une suspension d'érythrocytes. Celle-ci a conduit à la nécessité de préparer une suspension de membranes d'érythrocytes totalement dépourvues de molécules d'hémoglobine résiduelle membranaires.

Nous montrerons ensuite l'apport de la fluorimétrie en tant que méthode d'investigation de la diffusion de l'oxygène dans les membranes d'hématies, le plasma et la monocouche de cellules endothéliales. C'est à cette occasion qu'une relation entre les propriétés rhéologiques (rigidification membranaire induite par incorporation de glutaraldéhyde ou de cholestérol) et le coefficient de diffusion de l'oxygène dans la membrane sera établie.

Après avoir exploré la diffusion de l'oxygène au sein de la membrane érythrocytaire, nous nous intéresserons à la diffusion de l'oxygène à travers des solutions de plasma de donneurs sains et malades. Ceux-ci ont des propriétés rhéologiques macroscopiques extrêmes, en particulier au niveau des viscosités apparentes qui sont attribuées à des pathologies liées à des taux anormaux d'immunoglobulines (IgM ou IgG dans notre étude).

Nous aborderons ensuite l'étude de la perméabilité de l'oxygène à travers la monocouche de cellules endothéliales recouverte ou non des solutions de plasma. Cette étude sera menée

grâce à une nouvelle méthode d'investigation, la microscopie à fluorescence résolue dans le temps. Cette nouvelle approche donne accès à la détermination des valeurs de durées de vie en rapport avec le phénomène de diffusion de l'oxygène sur des échantillons microscopiques dans une chambre d'analyse spécifique.

Les différents compartiments biologiques traversés par l'oxygène avant l'oxygénation tissulaire seront étudiés en termes de résistance à la diffusion passive. Il en découlera une modélisation relativement simple du phénomène associé au transfert de l'oxygène en tenant compte des propriétés rhéologiques macroscopiques, microscopiques et moléculaires. Ces études seront suivies d'une discussion générale sur l'ensemble des données acquises et particulièrement sur les moyens d'investigation mis en œuvre.





*PREMIERE PARTIE*

*Rappels Bibliographiques*

*Transport et distribution de l'oxygène  
par le système circulatoire*

## I.1) Transport et distribution de l'oxygène par le système circulatoire

Les animaux supérieurs sont dépendants d'un apport d'oxygène aux tissus et une carence en oxygène conduit rapidement à l'ischémie et à la mort. Un système circulatoire élaboré et des molécules spécialisées dans le transport d'oxygène sont mis en œuvre pour délivrer l'oxygène prélevé au niveau des poumons. Ce système hautement régulé apporte l'oxygène selon le besoin des tissus.

Afin de mieux cerner les paramètres ayant une importance structurale ou fonctionnelle dans le processus de diffusion de l'oxygène, nous allons passer en revue de manière succincte le cheminement de l'oxygène d'origine pulmonaire jusqu'à l'oxygène dissous libéré au niveau des tissus. Cet apport de l'oxygène aux tissus n'est possible qu'avec le recours d'un système de distribution performant, le système circulatoire.



### I.1.1) Le système circulatoire

#### I.1.1.1) Anatomie descriptive du système circulatoire

L'appareil circulatoire de l'homme est essentiellement composé d'une pompe, le cœur, et de vaisseaux ; les artères partant du cœur et les veines y aboutissant. Entre les artères et les veines existe un système interposé de petits vaisseaux très fins : le système capillaire. Le sang des veines provenant de plusieurs organes débouche par la veine cave dans l'oreillette droite ; il passe dans le ventricule droit et en sort par les artères pulmonaires qui le conduisent aux poumons dans lesquels il se transforme en sang artériel et est ramené par les veines pulmonaires à l'oreillette gauche. Ce circuit constitue la petite circulation ou circulation pulmonaire qui assure l'approvisionnement en oxygène (de l'air aux alvéoles pulmonaires) et l'élimination du gaz carbonique ramené des tissus au cœur par la circulation veineuse (air vicié).

Parvenu à l'oreillette gauche, le sang artériel passe dans le ventricule gauche et en sort par l'aorte ; de là, il parvient enfin aux divers organes en suivant les ramifications successives des vaisseaux en artères, artérioles et capillaires. Après avoir subi dans les capillaires les modifications d'échange (nutriments, gaz, liquide), le sang parvient dans le système veineux qui finalement le conduit à la veine cave et à l'oreillette droite. Il s'agit de la grande circulation.

### L'unité microcirculatoire

La liaison entre les artères et les veines s'effectue au niveau des tissus par l'intermédiaire d'un riche réseau de petits canalicules (vaisseaux capillaires) de telle sorte que le système soit clos.

Au sein des tissus, les artères se ramifient en *artérioles*, qui se subdivisent en *capillaires*. Le capillaire est le site privilégié des échanges métaboliques et liquidiens. Sa fonction est d'ailleurs intermittente, avec un recrutement en fonction des besoins. C'est au niveau de ce réseau de vaisseaux à paroi très mince, unicellulaire, qu'ont lieu les échanges entre le sang et l'air des poumons ou entre le sang et les tissus. La perméabilité capillaire est donc la propriété capitale des capillaires puisque c'est elle qui permet les échanges entre le sang et les tissus. Les capillaires se collectent en *veinules* dont la réunion forment les *veines*.

La microcirculation représente l'interface entre l'appareil circulatoire et les tissus qu'il irrigue. Elle est généralement définie comme l'ensemble des vaisseaux de diamètre inférieur à 50  $\mu\text{m}$ . Il s'agit plus exactement d'un organe constitué de différents maillons anatomiquement et fonctionnellement différenciés. On parle alors d'unité microcirculatoire dont la régulation est complexe et très interactive.

Il existe souvent des communications entre les réseaux voisins appelées *anastomoses*. Le phénomène d'anastomose, qui peut varier en taille et en étendue, permet dans certaines conditions de rétablir une circulation sanguine satisfaisante lors d'un processus pathologique. Ce « shunt » du circuit nutritionnel capillaire est constitué de vaisseaux de 30 à 50  $\mu\text{m}$  et ne se rencontrent pas dans tous les tissus. A côté de ces anastomoses artério-veineuses co-existent des canaux dits « préférentiels » qui constituent un deuxième circuit de shunt, présents eux dans tous les tissus.

#### 1.1.1.2) Ecoulement du sang dans le réseau circulatoire

Du point de vue physiologique, on divise l'appareil circulatoire en deux grandes parties.

### a) Le système à haute pression

Il comprend le ventricule gauche et le système artériel. La pression y est d'origine dynamique, sa capacité relativement faible (environ 700 mL) et il est peu extensible. Son rôle de distribution est rendu sélectif par la vaso-motricité. Sa forte résistance hémodynamique est presque entièrement située à la sortie du système artériel et la vitesse du sang y décroît progressivement (dans le sens centrifuge). Les caractéristiques de cette circulation sont en grande partie liées à la structure de la couche moyenne de la paroi artérielle qui est composée de trois tuniques concentriques (adventice, média et intima). L'élasticité artérielle uniformise la circulation du sang et en augmente le débit. La vitesse du sang dans les artères diminue avec leur diamètre. De 30 à 40 cm/s dans les grosses artères, elle passe à 15-25 cm/s dans les moyennes et n'est plus qu'à 5 à 10 cm/s dans les artéριοles.

### b) Le système à basse pression

Il comprend les capillaires, les veines, "le cœur droit", la circulation pulmonaire et l'oreillette gauche. La pression y est avant tout d'origine statique. Sa capacité est grande (5000 à 6000 mL) et il est facilement extensible. Sa résistance hémodynamique est faible et la vitesse du sang y croît progressivement dans le sens centripète (sans atteindre celle du système à haute pression). La circulation dans le système à basse pression intéresse le réseau capillaire, zone d'échange entre sang et liquides interstitiels, le système lymphatique et le système veineux et enfin la totalité de la circulation pulmonaire.

Nous allons plus particulièrement développer la circulation capillaire qui est un facteur fondamental dans la microcirculation, à l'origine des échanges gazeux au niveau des tissus.

#### b1) La circulation capillaire

Constituant un réseau intermédiaire entre la circulation artérielle et veineuse, les capillaires sont faits de canaux anastomosés d'un diamètre de 5 à 20  $\mu\text{m}$  à paroi endothéliale unicellulaire. Extensibles et très peu contractiles, les capillaires permettent par leur structure des échanges entre sang et tissus sur une surface considérable ; ces échanges sont facilités par la minceur des parois et par la lenteur de la circulation à leur niveau. Enfin les capillaires, grâce aux

interstices de leur paroi, laissent les globules blancs s'insinuer dans les tissus où ils jouent un rôle de défense (diapédèse en autres).

Le sang circule dans les capillaires de manière non uniforme avec un écoulement discontinu par glissement de couches concentriques dont la vitesse augmente de la périphérie vers le centre. La couche laminaire périphérique où se trouve la majorité des globules blancs paraît presque immobile alors que la zone centrale où circule la majorité des hématies se déplace rapidement (environ 1 mm/s). La pression sanguine s'abaisse progressivement dans le capillaire, et passe de 50 mm Hg à la jonction artério-capillaire à 30 ou 40 mm Hg dans le capillaire artériel pour atteindre un minimum de 15 mm Hg à la jonction entre capillaires et veinules. A l'état normal les oscillations tensionnelles sont amorties avant le réseau capillaire et il n'existe pas de "pouls" (sauf activité intense).

On distingue trois groupes de capillaires en microscopie électronique : les capillaires continus (dans la plupart des organes), les capillaires fenêtrés (organes où les échanges liquidiens sont importants comme les reins, les intestins, les glandes endocrines...) et les capillaires discontinus (dans le foie et les organes spécialisés dans la production et la dégradation des éléments figurés du sang, comme la rate et la moelle osseuse).

### b2) Mécanisme de la circulation capillaire

Le passage du sang en plus ou moins grande abondance dans les capillaires est sous la dépendance presque exclusive des variations de calibre des vaisseaux qui les précèdent ou qui leur font suite. Il existe en fait dans un réseau capillaire, des canaux dits "préférentiels" bien distincts des capillaires vrais par la présence, dans leur paroi, de fibres musculaires lisses séparées les unes des autres. Selon la variation de diamètre de ces canaux préférentiels ou *shunt artériolo-veinulaire*, le débit augmente ou diminue dans les capillaires vrais.

Les mouvements qui se produisent à travers la paroi capillaire sont susceptibles d'être modifiés par tous les facteurs qui altèrent la perméabilité capillaire : la dilatation des capillaires, l'histamine et également l'hypoxie augmentent cette perméabilité.

### b3) La perméabilité capillaire

Si la paroi du capillaire doit permettre les échanges, elle doit aussi être suffisamment résistante pour éviter l'extravasation de globules rouges dans le liquide interstitiel sous l'effet de la pression sanguine. L'intégrité pariétale des microvaisseaux est donc une nécessité, ce qui fait

intervenir le concept de « résistance capillaire ». Pour que la paroi capillaire soit normo-résistante, il est nécessaire que la structure de ses différents constituants : couche endothéliale soit normale - film endothélial de fibrine - membrane basale et adventice lorsqu'elle existe. Une régulation hormonale intervient également, l'ATCH, la cortisone et l'insuline augmentant la résistance capillaire.

### c) Régulations particulières

#### c1) Circulation coronaire

Les artères coronaires assurent la vascularisation du myocarde qui est le plus grand consommateur d'oxygène de l'organisme (60 à 100 mL/min/100 g) soit 14 % de la consommation totale. Toute obstruction par thrombose entraîne une ischémie et une nécrose qui caractérise l'infarctus du myocarde. Le facteur régulateur essentiel dans la circulation coronaire (vascularisation du myocarde) est la pression partielle en oxygène. Le myocarde est particulièrement sensible à l'hypoxie qui entraîne des lésions irréversibles si elle se prolonge plus de 5 à 10 minutes. La  $PO_2$  va constituer le stimulus essentiel de la régulation du débit coronaire (cf. I.1.2.6.1). Tout abaissement de la  $PO_2$  déclenche une vasodilatation réflexe qui permet un ajustement immédiat du débit coronaire aux besoins énergétiques. En comparaison du stimulus  $PO_2$ , les autres facteurs humoraux ( $PCO_2$ , pH) sont certainement négligeables.

#### c2) Circulation cérébrale

Une interruption de la circulation cérébrale provoque au bout de dix secondes une perte de conscience. La consommation en oxygène du cerveau de l'ordre de 45 mL/min soit environ 3,2 mL/min/100 g représente 18 % de la consommation totale en oxygène. La régulation de l'irrigation cérébrale échappe au système vasomoteur et est avant tout d'origine humorale. Le stimulus le plus efficace est la  $PCO_2$  du sang artériel. L'inhalation d'un mélange riche en  $CO_2$  et tous les états d'asphyxie augmentent considérablement le débit cérébral. A l'opposé l'hyperventilation peut le réduire de moitié. La  $PO_2$  a des effets inverses mais moins marqués.

### c3) Cas des vasa vasorum

L'existence des vasa vasorum, petits vaisseaux cheminant dans la surface des parois vasculaires et donnant naissance à des réseaux capillaires qui pénètrent dans l'épaisseur des parois artérielles ou veineuses est connue depuis longtemps. Ils constituent les "vaisseaux des vaisseaux" ou système vasal qui est un ensemble autonome comportant un réseau afférent (vasa vasorum artériels), un réseau microcirculatoire distributif (vasa vasorum capillaires) et un réseau efférent (vasa vasorum veineux). On en distingue deux types : les premiers, d'un diamètre variant de 5 à 66  $\mu\text{m}$  correspondent à des structures artérielles avec un endothélium unicellulaire ; les seconds d'un diamètre de 9 à 133  $\mu\text{m}$  et de forme plus aplatie ont une paroi plus fine et correspondent à des structures veineuses. Au niveau pariétal, l'apport énergétique est indispensable au maintien de la tonicité et de l'élasticité de la veine ainsi qu'au renouvellement cellulaire.

Diffusion de l'oxygène dans la paroi veineuse : la consommation en oxygène est estimée à 0,6  $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{heure}$ . Un besoin en oxygène au niveau de la paroi persiste et la présence de nombreuses enzymes oxydatives et d'importantes quantités d'ATP ont été mises en évidence. Le coefficient de diffusion de l'oxygène est de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}/\text{min}/\text{cm}^2$  dans l'intima comme dans la média. L'amplitude de la diffusion de l'oxygène diminue avec l'éloignement de la source. L'oxygène diffuserait sur une distance moyenne d'un mm autour de sa source mais les études théoriques avancent 300  $\mu\text{m}$  soit un tiers de l'épaisseur de la paroi. Au niveau de la média une zone critique avasculaire et faiblement oxygénée existerait (Belcaro, 1995).

#### 1.1.1.3) Rhéologie dans le système circulatoire

##### a) Définition

L'hémorhéologie a pour objet l'étude de l'écoulement sanguin en fonction des propriétés mécaniques du sang.

##### b) Conditions d'écoulement du sang dans le système circulatoire

Deux phénomènes principaux caractérisent le flux sanguin :



- Un état visqueux qui entre en jeu dans la résistance périphérique vasculaire et donc dans la régulation de la pression artérielle.
- Le comportement non-Newtonien du sang. Le sang est un tissu visco-élastique tendant à s'écouler et à se déformer lorsqu'il est soumis à une force.

Dans les artères de gros calibre, c'est-à-dire dans les secteurs circulatoires où le sang est soumis à une pression élevée, le sang est fluide, de viscosité basse et les globules rouges sont alignés. Pour une pression motrice élevée et sous l'effet d'un flux laminaire, les taux de cisaillement élevés maintiennent les globules rouges en couches concentriques séparées. Les agrégats de globules rouges ne se forment pas du fait de cette force appliquée (Tableau 1).

Dans les secteurs où la pression motrice réduite ne développe que des frottements peu élevés, le sang a une viscosité élevée. Pour une pression diminuée, l'hyperviscosité est due à la formation d'agrégats de globules rouges qui est un facteur de ralentissement et de stase. L'agrégation se fait et se défait selon les aires circulatoires et selon le régime de pression locale.

Ces phénomènes sont étudiés par la mesure de la viscosité, la mesure de l'agrégation des globules rouges et la mesure de la déformabilité cellulaire.

<b>Vaisseaux</b>	<b>Diamètre (mm)</b>	<b>Vitesse du sang (cm/s)</b>	<b>Taux de cisaillement à la paroi (s<sup>-1</sup>)</b>
<i>Grandes artères</i>	2-6	20-50	700
<i>Grandes veines</i>	5-10	15-20	200
<i>Artéριοles</i>	0,04	0,5	1000
<i>Capillaires</i>	0,005-0,01	0,05-0,1	800
<i>Veinules</i>	0,05-0,1	0,2-0,4	320

**Tableau 1** : Valeurs des régimes d'écoulement dans les vaisseaux sanguins humains. D'après Teitel, 1983.

### c) *Rhéologie et microcirculation*

Dans les petits vaisseaux, on note de faibles vitesses de cisaillement alors que la viscosité sanguine est élevée et les érythrocytes organisés en rouleaux. La mécanique de la

microcirculation est complexe en raison de la multiplicité des branchements vasculaires, du ralentissement progressif du sang et de la variété des résistances périphériques opposées au flux sanguin (Teitel, 1983).

La microcirculation représente essentiellement le champ d'action de l'hyperviscosité.

Sur le versant artériel, la diminution de la concentration corpusculaire dans le capillaire (effet Fahraeus) réduit l'hématocrite et ainsi la viscosité du sang total.

A l'opposé, le versant veineux voit l'hématocrite remonter et la circulation microvasculaire reprend ici les caractères du sang systémique.

#### Artériole

Au niveau de l'artériole, la circulation du sang tend à être laminaire. Les vitesses de cisaillement augmentent et les rouleaux d'érythrocytes sont dissociés avec une viscosité sanguine diminuée. Le flux progresse avec un schéma très particulier, avec au centre, les éléments figurés (globules rouges et leucocytes) circulant à vitesse rapide et le plasma le long de la paroi circulant à vitesse plus lente.

#### Capillaire

Dans le capillaire, la contrainte de cisaillement est très élevée. Du fait de l'hémodynamique physiologique, l'hématocrite est nettement diminué, induit une moindre résistance à l'écoulement, ce qui empêche totalement l'agrégation érythrocytaire. La circulation est difficile car souvent, le diamètre des capillaires est inférieur à celui d'une hématie, qui doit alors se déformer pour circuler (notion de déformabilité développée plus loin dans le texte). L'écoulement des globules rouges dans les capillaires se fait habituellement de façon discontinue (par à coups) et le plasma tourbillonne entre les éléments figurés. Ces tourbillons augmentent les contraintes radiales et favorisent les échanges. L'importance de cette accélération s'est révélée négligeable pour les gaz. Plusieurs phénomènes influent sur cette dynamique (la stase sanguine, une auto-agglomération des globules rouges dans les artérioles, la vasomotricité des anastomoses artério-veineuses, l'activité du sphincter précapillaire).

#### Veinules post-capillaires

Au niveau des veinules de tout petit calibre dites post-capillaires (et des veines de faible diamètre), le taux de cisaillement à la paroi est faible, ce qui favorise l'agrégation érythrocytaire. Ainsi la circulation y est très sensible aux conditions rhéologiques. Alimentée par des capillaires

de remplissage, l'hématocrite y dépasse souvent la valeur de celui du sang brachial. De plus, c'est le système vasculaire de l'organisme où la pression motrice est la plus faible (0,2 à 0,4 cm/s), le débit le plus ralenti. De ce fait, les agrégats d'hématies se forment, repoussant les leucocytes vers la paroi endothéliale, ce qui augmente les possibilités d'interaction avec l'endothélium vasculaire. Elles constituent le secteur de transit des globules blancs.

L'influence des facteurs rhéologiques sanguins sur les phénomènes d'échange dans la microcirculation est complexe et comprend plusieurs facteurs :

⇒ Le temps de transit (temps de passage dans un capillaire) est directement lié à la viscosité sanguine et à la déformabilité des globules rouges.

La viscosité sanguine augmente considérablement avec la baisse du taux de cisaillement, principalement à cause de l'agrégation érythrocytaire à faible cisaillement (Chien et al, 1986).

La déformabilité érythrocytaire est également un facteur déterminant du comportement rhéologique macroscopique du sang total. Dans un capillaire de diamètre inférieur de trois fois la taille d'un globule rouge (7  $\mu\text{m}$ ), les viscoélasticités membranaires et cytoplasmique du globule modifient (théoriquement et expérimentalement) les vitesses locales et les temps de transit. Les hématies devront adapter leurs formes à ces derniers et donc posséder une propriété fondamentale : la déformabilité passive qui dépend de trois facteurs :

- La viscosité interne en fonction de la concentration et des propriétés physiques de l'hémoglobine.
- Le rapport surface / volume qui doit connaître des variations positives (ex : surcharge membranaire en cholestérol).
- Les propriétés intrinsèques de la membrane qui régissent la plasticité, la flexibilité et l'élasticité. L'instabilité du squelette protéique de la membrane peut induire une perte de fragments membranaires et aboutir à une rigidité, donc à une baisse de la flexibilité membranaire.

⇒ L'effet Farhaeus-Lindquist : l'alimentation d'un capillaire par un récipient volumineux contenant une suspension fluide se traduit par une diminution de la concentration corpusculaire dans le capillaire (effet Farhaeus). Au niveau hémorhéologique, ce phénomène entraîne un

hématocrite local inférieur à l'hématocrite du capillaire (rapport de 1 à 5) ainsi qu'une viscosité locale du fluide réduite. Il en ressort que la biodisponibilité de molécules solubles (molécules de gaz entre autres) seront par unité de volume de sang plus abondantes dans le plasma.

⇒ L'existence au niveau de l'endothélium capillaire d'une couche de macromolécules assurant d'une part une meilleure lubrification des surfaces en contact mais qui crée une couche limite peu favorable à la diffusion et limitant les échanges (Copley, 1983).

⇒ La distribution des réseaux capillaires (Rusch et al, 1983).

#### 1.1.1.4) Vasomotricité

##### a) Définition et rôle

La vasomotricité est définie comme l'ensemble des variations actives du calibre des vaisseaux (élasticité, contractabilité entre autres), sous l'influence de leurs cellules lisses pariétales (Barbier et al, 1994). Elle n'existe pas au niveau des capillaires et des toutes petites veinules post-capillaires. Les médiateurs chimiques, s'ils n'ont aucune action motrice directe sur le capillaire lui-même, agissent sur les autres éléments de l'unité microcirculatoire fonctionnelle.

La vasomotricité prédomine dans les artérioles, et surtout dans les plus petites d'entre elles. Les artérioles de petit calibre présentent également des contractions rythmiques d'amplitude importante (jusqu'à 100 % de leur calibre) et de faible fréquence (4 à 10 cycles par minute). Ces contractions influencent considérablement l'hémodynamique capillaire, que l'on nomme « vasomotion ».

##### b) Régulation de la vasomotricité

La régulation de la vasomotricité est complexe car elle affecte de manière inégale les différents maillons de l'unité microcirculatoire et reste sous la dépendance de nombreux facteurs interagissant les uns avec les autres.

On oppose les facteurs *nerveux et humoraux* qui gouvernent l'homéostasie globale du système circulatoire aux facteurs locaux d'autorégulation, *myogéniques et métaboliques*. La sérotonine et la bradykinine créent une vasoconstriction veinulaire et augmentent la pression intra-capillaire et la fuite liquidienne. L'histamine ajoute à cette vasoconstriction veinulaire une dilatation métartériolaire aggravant encore la « congestion » capillaire. L'adrénaline et la

noradrénaline créent une vasoconstriction artériolaire ce qui diminue le flux capillaire et réduit l'évasion liquidienne. Ainsi l'hypoxie de manière indirecte entraîne une vasodilatation artériolaire intense mais aussi un recrutement capillaire qui réduit les distances de diffusion des cellules au capillaire le plus proche.

Cette distance de diffusion ou une résistance à cette diffusion apparaissent donc comme un paramètre critique de la viabilité tissulaire.

La découverte de molécules vasoactives secrétées par l'endothélium (prostacycline...) qui diffusent et agissent sur la cellule musculaire lisse a démontré la participation de l'endothélium dans le contrôle du tonus vasculaire. Les cellules endothéliales sécrètent à la fois des facteurs de relaxation (acétylcholine, oxyde nitrique) et de contraction (endothéline, Yanagisawa et al, 1988).

#### 1.1.1.5) Les constituants des compartiments traversés par l'oxygène

Nous présenterons ici de manière très succincte les caractéristiques structurales des compartiments traversés par l'oxygène lors de son transport des érythrocytes aux tissus.

##### a) Le plasma

Il s'agit de la composante liquide du sang. Le plasma est une solution aqueuse glucosée de protéines et de sels minéraux tamponnée à pH 7,35. La force ionique moyenne est de 0,15 M. La viscosité plasmatique est un déterminant majeur de la viscosité sanguine en étroite relation avec la concentration en protéines du plasma. Les protéines présentes pour un volume d'environ 40 mL/kg chez l'homme (fibrinogène 2g/L, globulines et albumines 52 %) ont certaines propriétés communes :

- Poids moléculaire élevé et taux sérique élevé (rôle important dans la pression oncotique).
- Fonctions physiologiques : transporteurs (albumine entre autres), enzymes, protéines jouant un rôle fondamental dans les phénomènes d'hémostase et de coagulation (fibrinogène entre autres).
- Fonction d'anticorps : immunoglobulines constituées par l'association de deux chaînes légères ( $\lambda$  ou  $\kappa$ ) et de deux chaînes lourdes ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ , ou  $\epsilon$ ). Les 5 chaînes lourdes sont spécifiques

des 5 classes d'immunoglobulines connues : IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Le poids moléculaire de ces globulines varient de 150.000 à un million.

Cette diversité est due à l'existence de formes polymérisées dans certaines classes (IgA et IgM).

La viscosité plasmatique est fortement affectée par ces polymères de haut poids moléculaire. Le plasma a un comportement newtonien, c'est-à-dire que la viscosité plasmatique varie avec la température mais aussi avec les éléments présents. La valeur moyenne est de  $1,22 \pm 0,06$  cSt à 37 °C (valeur témoin du laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie, Faculté de Médecine, Pr. Stoltz)

### b) L'érythrocyte

Les érythrocytes, encore appelées hématies ou globules rouges ont une morphologie régulière, en disque biconcave équivalente à une sphère dégonflée. Cette forme est placée tout entière au service de leur déformabilité, condition *sine qua non* de leur voyage à travers l'organisme.

L'érythrocyte est une cellule réduite à son cytoplasme et à la membrane plasmique qui l'entoure. Sa structure est la suivante : un contenu sans noyau ni organites et un contenant. Elle est l'aboutissement d'un long processus de différenciation de la cellule dans la moelle osseuse (érythropoïèse). A la fin de l'érythropoïèse, le globule rouge, déjà lourd en hémoglobine, se vide de son noyau et de ses autres organites intracellulaires. Il devient alors un "sac" à hémoglobine et c'est à ce moment que le squelette membranaire se met en place de façon définitive (Lazarides et al, 1987). Pendant les quelques 120 jours de son existence, il lui faut couvrir des centaines de kilomètres et connaître aussi bien la circulation dans les gros vaisseaux que la traversée des capillaires dont le calibre (2-3  $\mu\text{m}$ ) est inférieur à son propre diamètre (7  $\mu\text{m}$ ). Le cytosquelette érythrocytaire doit permettre de répondre à ces caractéristiques. La figure 1 représente le schéma d'une coupe de la membrane munie de son squelette. L'érythrocyte est caractérisé par l'absence d'une machinerie enzymatique intracellulaire, ce qui permet une étude plus ciblée des phénomènes membranaires. La membrane érythrocytaire a par ailleurs des échanges permanents avec le milieu plasmatique. L'érythrocyte présente également l'avantage d'être disponible en quantité et facile à isoler.

La composition et la structure de la membrane érythrocytaire sont les suivantes :

## Les protéines

Les protéines sont des composants essentiels des membranes et se distinguent selon leur topologie. On les répartira en :

*Protéines intrinsèques* : elles sont enfouies dans la matrice lipidique et forment des liaisons hydrophobes entre les acides aminés et les chaînes aliphatiques des acides gras des phospholipides.

*Protéines extrinsèques* : elles sont ancrées à la périphérie de la membrane grâce à des liaisons électrostatiques.

*Protéines du cytosquelette* : elles constituent une infrastructure composée de molécules protéiques qui soutiennent la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire. Ce squelette est pour une large partie impliqué dans la forme de l'hématie et lui confère également ses propriétés élastiques (Boivin, 1984).

Les protéines du cytosquelette sont situées du côté cytoplasmique de la cellule et sont en particulier :

*Spectrine* : constituant majeur du squelette érythrocytaire (25 % des protéines membranaires), elle interagit avec les autres protéines du cytosquelette et les phospholipides membranaires. La spectrine est localisée dans la face interne de la membrane, et présente une partie fortement hydrophobe capable de pénétrer la double couche lipidique.

*Actine* : (poids moléculaire, noté PM 43) ou bande 5, présente une capacité importante à activer l'ATPase associée à la membrane.

*Protéine 4.1* : (PM bande a et b, 80 et 78) protéine globulaire représentant 5 % de la masse totale du cytoquelette. Suite à une phosphorylation par des kinases membranaires, cette protéine peut être à l'origine d'une relaxation du réseau squelettique et à la formation d'une structure membranaire plus flexible (Eder et al, 1988).

*Ankyrine* : (PM 210) ou bande 2.1, protéine globulaire responsable du maintien de l'association des protéines du cytosquelette membranaire avec la bicouche lipidique. Elle interagit également avec la bande 3.

*Bande 3* : (PM 95) c'est la principale protéine intrinsèque de la membrane. Elle est repliée sur elle-même et traverse la membrane au moins deux fois. Sa mobilité est limitée par son interaction avec le cytosquelette.

*Glycophorines A, B et C* : (PM 31, 25 et 25) ces protéines portent des groupements glucosidiques. La glycophorine A est la principale sialoglycoprotéine, liée à la bande 3. La liaison de la glycophorine C avec la protéine 4.1 constitue le second système d'ancrage du squelette membranaire au reste de la membrane.

### Les lipides membranaires

Bien que l'on note une grande diversité des lipides membranaires, les lipides majeurs existant dans l'érythrocyte humain sont le cholestérol et les phospholipides. On rencontre :

*Glycérides* : ils comportent des mono, di et triglycérides, et sont formés par l'estérification du glycérol par une, deux ou trois chaînes d'acides gras.

*Glycolipides* : il s'agit de molécules complexes constituées d'une sphingosine reliée à une longue chaîne d'acide gras par une fonction amide à plusieurs résidus glucidiques par une fonction alcool primaire.

*Cholestérol* : de la famille des stérols, il possède un noyau tétracyclique (ou cyclopentanophénantrène). Sous la forme libre non estérifiée, il représente plus de 80 % des lipides neutres existant dans la membrane des érythrocytes. Il se localise préférentiellement dans le feuillet externe de la membrane.

*Phospholipides (PL)* : ils représentent 70 % en poids des lipides de l'érythrocyte humain. Dans les conditions normales, le rapport cholestérol/phospholipide est relativement constant, environ 0,8. Ce sont des esters d'acides gras dans lesquels un groupement phosphate fait partie intégrante de la fonction alcool entrant dans la composition de la molécule.

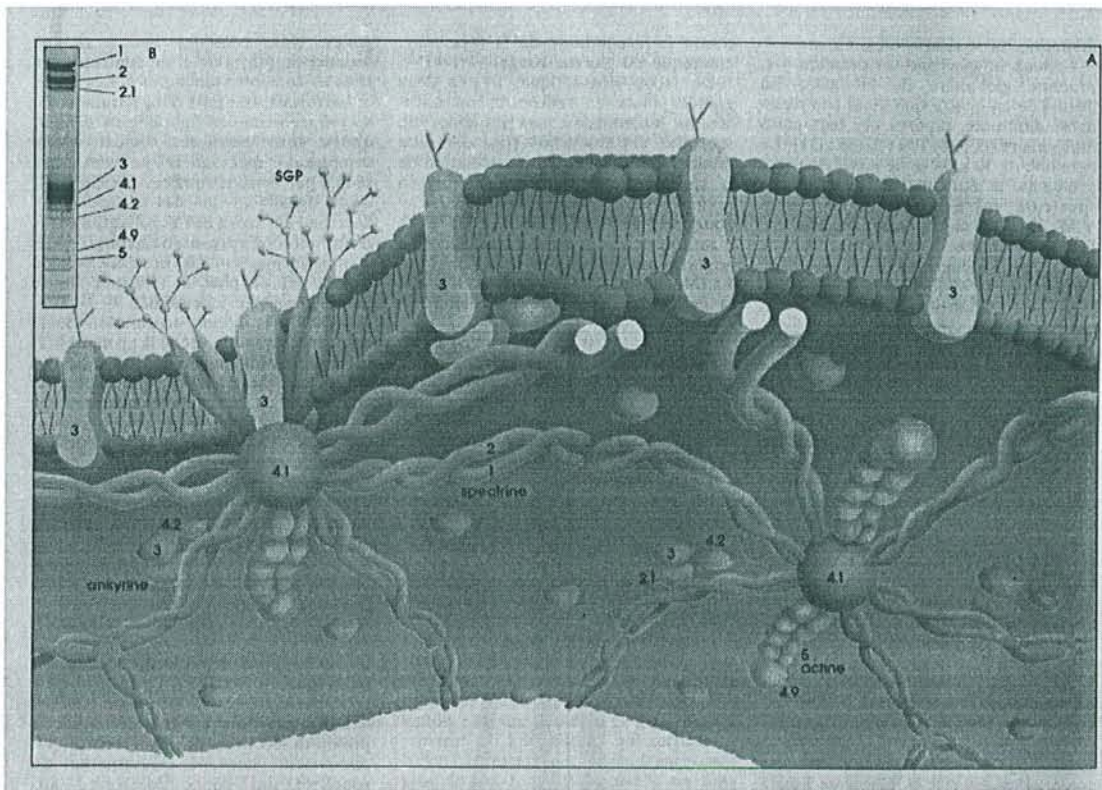
Ils comprennent principalement :

*Glycérophosphatides* : la diversité des différentes espèces moléculaires de glycérophospholipides est d'abord assurée par la nature des têtes polaires : sérine, éthanolamine, monométhyl- et

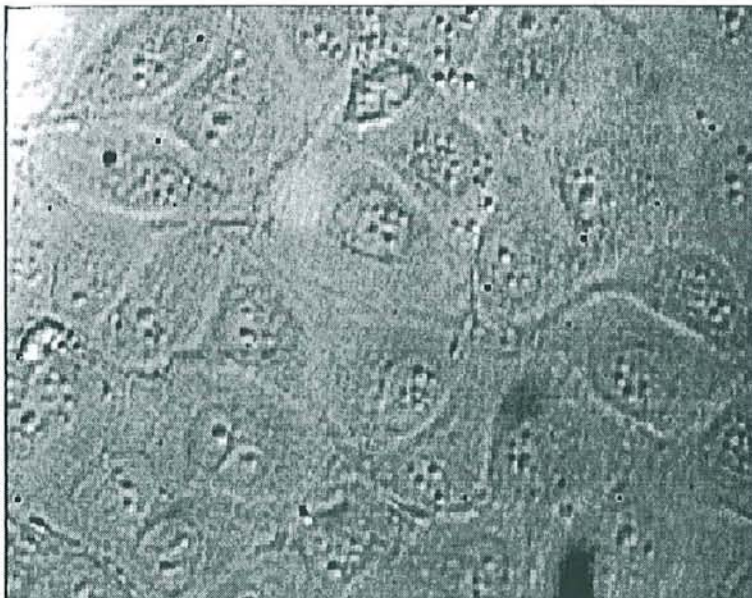


diméthyl-éthanolamine, choline, glycérol et glycérol phosphate, inositol et inositol mono et diphosphate.

*Sphingolipides* : ils sont représentés essentiellement par la sphingomyéline (SM).



**Figure 1** : Schéma d'une membrane de globule rouge tapissée de son squelette. Les qualités plastiques du globule rouge sont dues à sa membrane plasmique et à son squelette cellulaire très particulier. Celui-ci occupe une épaisseur de 10 nm le long de la face interne de la membrane. Le squelette est constitué principalement par la spectrine (1, 2), l'actine associée à la protéine (4.9) et la protéine (4.1). La spectrine constitue des liaisons entre les protéines (4.1). Elle est amarrée à une protéine membranaire (3) (bande 3) par l'intermédiaire d'une autre protéine (l'ankyrine ou protéine 2.1). D'après : Delaunay J et Boivin P. Le squelette du globule rouge. La Recherche, 1990, 223, 844-852.



**Figure 2** : Cliché d'une monocouche de cellules endothéliales ECV 304 adhérentes et à confluence, en culture dans du milieu IM199. Observation en lumière transmise, x 20, intégration 0,1 sec.

### c) Les cellules endothéliales vasculaires

Les cellules endothéliales vasculaires constituent une barrière naturelle. Elles forment une couche monocellulaire et se retrouvent dans tous les vaisseaux du système circulatoire (Figure 2). Leur densité est si importante (25 à 30 m<sup>2</sup> dans les grosses artères et plus de 1500 m<sup>2</sup> dans les microvaisseaux) que leur poids total est estimé à 1,5 kg dans le corps humain.

Les cellules endothéliales exercent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques fondamentales. Les fonctions de l'endothélium sont à la fois globales, notamment lorsque ses propriétés métaboliques participent à l'économie générale de l'organisme, et locales lorsqu'elles interviennent sur les différents facteurs réglant la vie des cellules circulantes ou des tissus sous-jacents. L'endothélium constitue donc une véritable interface entre le sang et les cellules musculaires lisses (Braquet et al, 1994). La cellule endothéliale peut intervenir activement dans le transfert des éléments du métabolisme, soit par les pores la traversant de part en part, soit par pynocytose.

L'endothélium intervient dans les mécanismes de défense immunitaire, en particulier dans la circulation lymphocytaire et le recrutement des leucocytes circulant lors des états inflammatoires. Il participe aux deux étapes de la migration des leucocytes en permettant, d'une part l'adhésion des cellules circulantes du sang, et d'autre part, leur passage entre, ou à travers les cellules endothéliales (diapédèse). D'autre part, dans les conditions normales, la cellule endothéliale exerce une activité anticoagulante en inhibant l'hémostase primaire (vasodilatation et anti-agrégation des plaquettes) et la coagulation plasmatique. A l'inverse, en cas de lésion, elle participe à la formation du thrombus hémostatique en favorisant l'adhésion des plaquettes aux structures sous-endothéliales (production du facteur Willebrand), et en déclenchant la voie exogène de la coagulation plasmatique (production du facteur tissulaire ou thromboplastine).

De nombreux facteurs, traumatiques, métaboliques et/ou anoxiques peuvent entraîner une lésion de l'endothélium vasculaire, en particulier l'oxygénation.

Au niveau des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire, une disponibilité moindre en oxygène aurait des répercussions sur la production et la sécrétion de facteurs de relaxation et de contraction libérés par l'endothélium (Kovitz et al, 1993) . Sur le même type de cellule, des mesures de calcium intracellulaire ont montré que l'hypoxie entraînait une variation du gradient électrochimique de calcium et la dépolarisation de la membrane cellulaire (Stevens et al, 1994).

La capacité de synthèse de PGI<sub>2</sub> (facteur antithrombolytique) et de facteurs dits d'hyperpolarisation membranaire fluctue selon le taux d'oxygène délivré à des cellules endothéliales de l'artère coronaire (Siegel et al, 1993).

De même, l'expression du PDGF (Platelet-derived growth factor) serait directement dépendante du gradient en oxygène à proximité des cellules endothéliales (Kourembanas, 1990).

En clinique dans le cas d'ischémie critique occasionnant une lésion physique des cellules endothéliales, des travaux récents ont montré qu'une glycoprotéine membranaire libérée, la thrombomoduline plasmatique, est reliée, en première approximation à la pression transcutanée en oxygène (Seigneur et al, 1993).

La présence de molécules d'oxygène moléculaire favorise également les phénomènes de stress oxydatif, par l'intermédiaire des radicaux libres oxygénés (Halliwell, 1993; Rego et al, 1995) dans le système vasculaire (Baghi et al, 1989; Kinnula, 1993).

Enfin, les forces de cisaillement soumettent les cellules endothéliales à des stress physiques à l'origine d'importantes modifications physiologiques et structurales (Reinhart, 1994; Davies et Dull, 1990).

Les travaux cités ci-dessus soulignent l'importance de l'oxygénation cellulaire dans la genèse des maladies cardio-vasculaires, et sur son rôle dans l'intégrité de l'endothélium vasculaire.

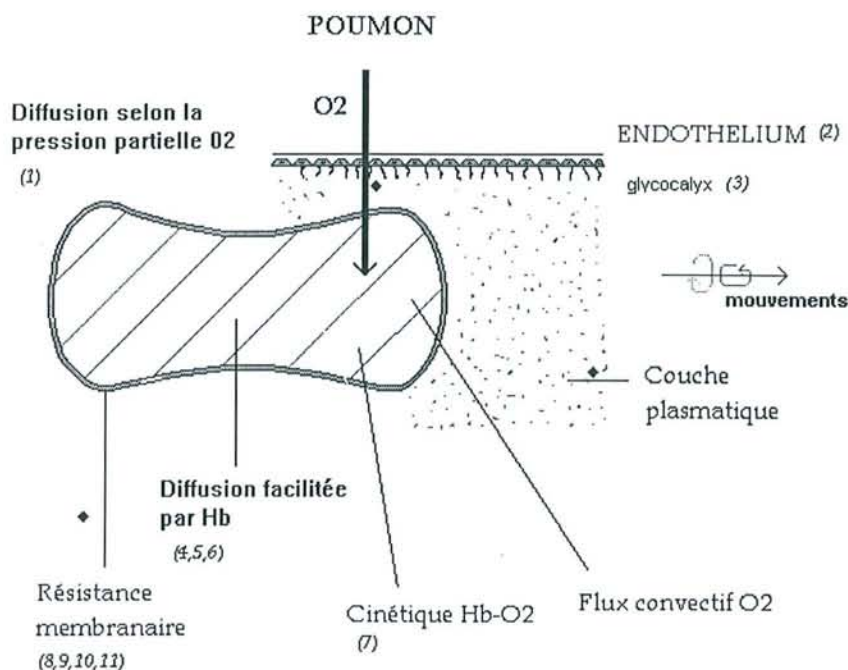
## I.1.2) Le transport de l'oxygène des poumons aux tissus

### I.1.2.1) Transport global de l'oxygène des poumons aux hématies

L'air atmosphérique est un mélange gazeux dont la composition demeure inchangée dans l'ensemble de l'atmosphère respirable et comporte *21 % d'oxygène ( $O_2$ ), et 1 % de gaz inertes*. Le terme « gaz du sang » désigne tout élément ou composé existant à l'état gazeux dans les conditions usuelles et dans une certaine mesure, dissous dans le sang (oxygène, azote, oxyde de carbone, krypton, hélium, anhydride carbonique). Le poumon étant un organe d'échanges gazeux, sa fonction principale consiste à permettre à l'oxygène de l'air atmosphérique de pénétrer dans le sang veineux et au gaz carbonique ( $CO_2$ ) d'en sortir. L'air vicié contient *17 % d' $O_2$  et environ 4 % de  $CO_2$* . Seuls  $CO_2$  et  $O_2$  participent aux échanges gazeux ; il n'y a pas d'échange net de  $N_2$  ou d'autres gaz inertes. Le poumon filtre les substances toxiques apportées par la circulation, il métabolise certaines substances et se comporte comme un réservoir sanguin. Mais sa fonction principale consiste à échanger des gaz au niveau de la surface de séparation gaz-sang.

La Figure 3 représente de manière simple le cheminement de l'oxygène pulmonaire jusqu'à l'érythrocyte. Elle inclue quelques facteurs pouvant affecter ce transfert:

- la pression partielle en oxygène (gradients) entre les alvéoles pulmonaires et les capillaires pulmonaires,
- la paroi vasculaire représentée ici par l'endothélium,
- la couche plasmatique (diffusion-convection),
- la résistance de la membrane érythrocytaire,
- la cinétique de fixation hémoglobine-oxygène et la diffusion facilitée,
- le flux convectif interne de l'oxygène dans l'érythrocyte.



**Figure 3** : Diffusion de l'oxygène pulmonaire à l'érythrocyte. Les chiffres renvoient aux références suivantes : 1 : Hook et al, 1988, 2 : Weiner, 1992. 3 : Desjardins et al, 1990. 4 : Kreuzer et al, 1987. 5 : Wittenberg, 1970. 6 : Klug et al, 1956. 7 : Roughton, 1959. 8 : Stroeve et al, 1976. 9 : Forster et al, 1957. 10 : Fischkoff et Vanderkooi, 1975. 11 : Hartridge et al, 1923.

#### a) La surface de séparation gaz-sang

L'oxygène et le gaz carbonique se déplacent entre l'air atmosphérique et le sang par simple transfert, c'est-à-dire d'une zone de haute pression partielle vers une zone de basse pression partielle. La loi de diffusion de Fick (cf. Annexe) établit que la quantité d'un gaz qui se déplace à travers une couche tissulaire est proportionnelle à la surface de cette couche et inversement proportionnelle à son épaisseur. La barrière sang-gaz est extrêmement mince (en moyenne inférieure à 0,5  $\mu\text{m}$ ) et a une surface comprise entre 50 et 100 mètres carrés, ce qui est considérable pour le transfert à l'intérieur de la cavité thoracique dont les dimensions sont limitées. Elle est par conséquent parfaitement adaptée à sa fonction pour les échanges gazeux. Ce phénomène se réalise par le déploiement de petits vaisseaux ou capillaires autour d'un nombre considérable de petits sacs remplis d'air, les alvéoles.

Chaque poumon humain contient environ 300 millions d'alvéoles dont chacune a un diamètre égal à environ 0,3 mm. C'est donc en raison de leur division en grand nombre d'unités que les poumons peuvent assurer une surface de transfert si importante. Le gaz est amené d'un côté de la surface de séparation gaz-sang par les voies aériennes et le sang est amené de l'autre côté par les vaisseaux sanguins.

### b) Écoulement de l'air dans les poumons

Au cours de l'inspiration, le volume de la cavité thoracique augmente et l'air atmosphérique est attiré dans les poumons. L'air inspiré s'écoule de façon massive jusqu'aux bronchioles terminales (comme de l'eau dans un tuyau). Au-delà de ce point, la surface de section des voies aériennes devient si importante par la suite de leur extrême ramification que la vitesse d'écoulement du gaz devient faible. Le transfert du gaz dans les voies aériennes devient alors le mécanisme dominant de ventilation dans la zone respiratoire. La vitesse de diffusion des molécules de gaz dans les voies aériennes est si rapide et les distances de transfert sont si courtes que les différences de concentration au niveau des alvéoles sont pratiquement abolies au bout d'une seconde. Les calculs théoriques du temps nécessaire à l'oxygène pour diffuser dans la cellule et établir un profil initial de gradients de pression en oxygène indiquent une grandeur inférieure à la milliseconde (Nicolson et al, 1951). Il a été démontré que l'inhalation d'un mélange pauvre en oxygène élève la pression artérielle sans modification du débit cardiaque ni de la tension artérielle générale, ni de la répartition des volumes circulants. L'hypoxie agit directement sur la partie juxta-alvéolaire des artérioles précapillaires.

### c) Vaisseaux sanguins et débits sanguins

Les vaisseaux sanguins pulmonaires forment une série de tubes qui se ramifient à partir de l'artère pulmonaire jusqu'aux capillaires et qui reviennent aux veines pulmonaires. Les capillaires forment un réseau dense dans les parois des alvéoles. Le diamètre d'un segment capillaire, égal à environ 10 microns, est juste suffisant pour le passage d'un globule rouge normalement déformable. L'artère pulmonaire reçoit la totalité du débit du cœur droit, ainsi, une pression artérielle pulmonaire moyenne égale à environ 15 mm Hg suffit à assurer un débit sanguin de 6 L/ min. Chaque globule rouge demeure environ une seconde dans le réseau capillaire, et au cours de ce délai, il traverse probablement deux ou trois alvéoles. La structure du poumon est si efficace pour les échanges gazeux que ce bref délai suffit à assurer l'équilibration presque complète de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> entre le gaz alvéolaire et le sang capillaire. Même si une proportion réduite des globules rouges capte l'oxygène de manière optimale (saturation), leur grand nombre suffit à assurer un transfert efficace de l'O<sub>2</sub>, ce qui n'est pas le cas au niveau des tissus où la cinétique de libération de l'oxygène est un facteur limitant.

d) Le transfert alvéolo-capillaire

d1) Transfert membranaire des gaz alvéolaires

Les échanges gazeux alvéolo-capillaires constituent une étape complexe entre les transports ventilatoires et circulatoires. Les modalités du transfert sont différentes pour les gaz inertes et les gaz non inertes ; les premiers sont ceux qui se dissolvent dans le sang sans s'y combiner chimiquement (azote, argon, hélium, xénon, éther, oxyde nitreux  $N_2O$  et les gaz anesthésiques). Au contraire, l'oxygène, le dioxyde de carbone, le monoxyde de carbone (CO) et le monoxyde d'azote (NO) se combinent à travers divers composants du sang principalement à l'hémoglobine. L'oxygène alvéolaire traverse par transfert physique de type passif (cf. I.1.2.5) la membrane alvéolo-capillaire, le plasma et la membrane érythrocytaire et se combine chimiquement avec l'hémoglobine.

A ce niveau, le transfert membranaire se fait en deux étapes :

a) Passage par transfert le long d'un gradient de concentration à travers la membrane alvéolo-capillaire, d'une immense surface et d'une extrême finesse, représentant un très petit volume de tissu (environ 80 mL).

b) Diffusion et fixation dans le sang capillaire pulmonaire dont le faible volume ( $V_c = 80$  à  $150$  mL) circule à une faible vitesse, de l'ordre de  $0,1$  mm/s, dans un réseau serré où chaque globule rouge séjourne pendant un temps  $T_c$  de  $0,3$  à  $1$  seconde, d'autant plus court que le débit sanguin capillaire  $Q_c$  est plus élevé ( $T_c = V_c / Q_c$ ). Les gaz rencontrent ainsi deux résistances en série, la membrane alvéolo-capillaire et le sang. En pratique, la résistance du sang est essentiellement représentée par les membranes des érythrocytes et le plasma. La différence de pression partielle alvéolo-capillaire moyenne ( $P_{a_{O_2}} - P_{c_{O_2}}$ ) assure le transfert à travers ces deux résistances. On définit ainsi la capacité de transfert pulmonaire (DL « Diffusion Lung ») pour l'oxygène par le volume de gaz en mL transféré des alvéoles dans le sang par minute ( $V_{O_2}$ ) pour une différence de pression alvéolo-capillaire de  $1$  mm Hg ( $DL_{O_2} = V_{O_2} / (P_{a_{O_2}} - P_{c_{O_2}})$ ). Ces mesures donnent accès à la diffusion de l'oxygène alvéolaire.

Puisque l'oxygène pénètre dans le sang capillaire pulmonaire par diffusion, la  $PO_2$  alvéolaire ( $PAO_2$ ) doit être un des principaux déterminants de la  $PO_2$  capillaire pulmonaire et



artérielle ( $\text{PaO}_2$ ). Suivant le même raisonnement, la  $\text{PAO}_2$  définit la limite supérieure de la  $\text{PaO}_2$  ; la  $\text{PaO}_2$  ne peut jamais être supérieure à la  $\text{PAO}_2$ . Dans un poumon dit « idéal », la  $\text{PaO}_2$  serait égale à la  $\text{PAO}_2$ . Or les échanges gazeux ne se conforment pas à un modèle idéal, de sorte que la  $\text{PAO}_2$  calculée et la  $\text{PaO}_2$  mesurée dépendent de plusieurs facteurs, dont le plus important est le rapport ventilation/perfusion parmi les centaines de millions d'unités alvéolo-capillaires. Pour chaque alvéole prise individuellement, la  $\text{PO}_2$  qui règne dans l'espace aérien n'est pas uniforme, principalement en raison de la pesanteur et de la compliance (aptitude à la distension pulmonaire).

Sur le plan clinique, il n'est pas nécessaire de se préoccuper de la distribution des valeurs alvéolaires individuelles de  $\text{PO}_2$  mais il suffit de connaître la  $\text{PO}_2$  moyenne de l'ensemble des alvéoles. Cette valeur est calculée d'après l'équation des gaz alvéolaires :

$$\text{PAO}_2 = \text{PIO}_2 - 1,2 \text{ PACO}_2 \text{ où } \text{PIO}_2 = \text{FIO}_2 / (\text{PB} - 47)$$

avec : PB : la pression barométrique

$\text{FIO}_2$  : la fraction d' $\text{O}_2$  du gaz inspiré (21 %)

$\text{PIO}_2$  : la pression de l' $\text{O}_2$  inspiré au niveau de la trachée

$\text{PACO}_2$  : la  $\text{PCO}_2$  artérielle (présumée égale à la  $\text{PCO}_2$  alvéolaire)

$\text{PAO}_2$  : la  $\text{PO}_2$  alvéolaire

$\text{PaO}_2$  : la  $\text{PO}_2$  artérielle normalisée pour une altitude donnée

N.B. Le calcul de la  $\text{PIO}_2$  se rapporte à l'air qui se trouve dans la trachée. A cet étage des voies aériennes, de la vapeur d'eau s'ajoute au mélange, et il faut soustraire la pression de la vapeur d'eau (47 mm Hg) de la pression barométrique pour obtenir la  $\text{PIO}_2$ . Le facteur 1,2 tient compte d'une faible variation de la pression de l'azote qui se produit quand l' $\text{O}_2$  absorbé dépasse le dioxyde de carbone éliminé. En clinique, le quotient respiratoire (rapport oxygène absorbé/ $\text{CO}_2$  rejeté) n'est plus mesuré.

Il apparaît, à partir des équations des gaz alvéolaires présentées ci-dessus, que la diffusion de l' $\text{O}_2$  au niveau du transfert alvéolo-capillaire est mesurable et quantifiable. Le bilan d'un malade peut être clairement dressé à partir du calcul de la  $\text{PAO}_2$  malgré les suppositions acceptées pour l'équation des gaz alvéolaires. La différence entre la  $\text{PAO}_2$  calculée et la  $\text{PaO}_2$  mesurée (ou différence alvéolo-artérielle) dépend de plusieurs facteurs. Quand on considère les causes physiologiques de l'hypoxémie, il est important de distinguer entre *une entrave à la diffusion (bloc alvéolo-capillaire)* et *une perturbation du rapport ventilation/perfusion* (qui seule joue un rôle cliniquement significatif dans l'hypoxémie). Le terme « ventilation/perfusion » s'applique au rapport qui existe entre la quantité d'air pénétrant dans les alvéoles chaque minute

et la perfusion capillaire de ces alvéoles. La diffusion de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> est tellement rapide et efficace qu'une pneumopathie caractérisée par une « entrave à la diffusion » (fibrose pulmonaire, insuffisance cardiaque congestive) ne provoque pas d'hypoxémie importante chez le sujet au repos. Une anomalie des processus d'échange de l'oxygène au niveau des alvéoles pulmonaires peut éventuellement être décelée par le calcul (PAO<sub>2</sub> - PaO<sub>2</sub>). A ce niveau, la cinétique de diffusion d'O<sub>2</sub> du poumon à l'érythrocyte, qui dépend en grande partie de la différence de pression partielle alvéolo-capillaire pourrait être affectée par certaines propriétés mécaniques des membranes traversées. Ce n'est vraisemblablement pas le cas physiologiquement au regard de l'efficacité du processus d'échange de l'O<sub>2</sub>. La membrane alvéolo-capillaire est particulièrement bien adaptée à cette fonction de séparation gaz-sang. En fonction du temps de séjour (transit) limité des érythrocytes dans les capillaires pulmonaires, les caractéristiques rhéologiques de la membrane érythrocytaire prennent une importance plus relative et ne seraient pas limitatives dans le transfert de l'oxygène.

#### d2) Cas des shunts intrapulmonaires

Le sang qui n'a pas participé aux échanges avec le gaz alvéolaire pénètre dans le ventricule gauche avec un contenu en oxygène inférieur à celui d'un sang normalement hématosé. Le sang provenant d'une région pulmonaire présentant un rapport ventilation/perfusion égal à zéro, présente un contenu en O<sub>2</sub> identique à celui de l'artère pulmonaire. Il se mélange alors avec le sang normalement oxygéné et détermine un certain degré d'hypoxémie artérielle. Les shunts intrapulmonaires sont la manifestation la plus courante des affections pulmonaires et constituent l'explication la plus fréquente de l'hypoxémie liée à ces affections. Cependant ces shunts ne sont pas la cause exclusive de l'hypoxémie.

#### e) Fixation hémoglobine-oxygène

##### e1) Hémoglobine

Une des fonctions majeures du sang est de transporter l'oxygène du milieu extérieur vers les cellules utilisatrices enfouies au plus profond de l'organisme. Compte tenu de la faible solubilité de ce gaz, des débits importants des liquides internes seraient nécessaires pour assurer son transport si des protéines spécialisées, les pigments respiratoires, n'existaient pas. Ces

pigments sont en effet capables de lier l'oxygène de manière réversible et d'augmenter ainsi considérablement la capacité de transport de l'oxygène par le sang.

Les pigments respiratoires sont des métalloprotéines dont la structure abrite un ou plusieurs atomes métalliques selon les espèces. Ces pigments se retrouvent sous diverses formes; leghémoglobines (famille des légumineuses), l'hémérythrine (chez un invertébré marin, le sipuncle), l'hémocyanine (pigment bleu de la pieuvre), la myoglobine (muscles des vertébrés et des invertébrés), l'hémoglobine (contenue dans les hématies ou dissoute dans le plasma chez de nombreux invertébrés) (Toulmond et Truchot, 1993).

Dans les pigments respiratoires dits hémiques l'unique atome de fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) est logé au centre d'une protoporphyrine (du grec *porphura*, pourpre), petite molécule organique à structure cyclique formée de quatre noyaux pyrroles liés les uns aux autres (Figure 4). L'ensemble fer-protoporphyrine constitue l'hème. L'atome de fer est lié à un seul acide aminé du polypeptide, une histidine.

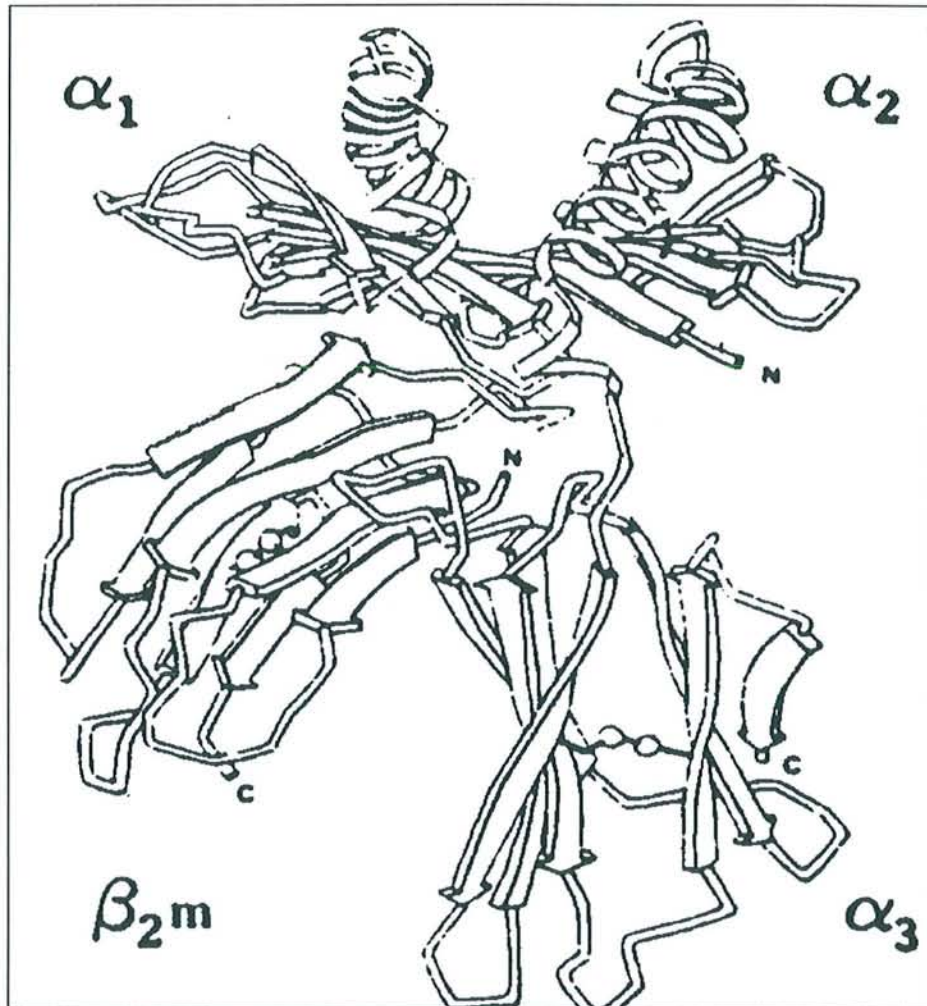
La première structure quaternaire de l'hémoglobine (de cheval) a été décrite en 1960 par Max Perutz et ses collègues. L'hémoglobine A est faite de 4 chaînes polypeptidiques ; deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ) et de deux molécules d'hème pour un poids moléculaire qui avoisine les 65500 Da. Ces quatre unités fonctionnelles (qui forment un tétramère), capables de lier quatre molécules d'oxygène, ont chacune la structure de la myoglobine.

Un globule rouge contient environ 280 millions de molécules d'hémoglobine. D'autres hémoglobines sont également concernées ;  $A_2$  ( $\alpha_2\delta_2$ ) dont les chaînes de globine sont différentes, la carboxyhémoglobine (liaison covalente entre CO et l'ion ferreux), la méthémoglobine (oxydation de l'ion ferreux) et l'hémoglobine foetale ( $\alpha_2\gamma_2$ , 85 % de l'hémoglobine du fœtus à terme). Malgré des séquences d'acides aminés différentes, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ont une configuration spatiale similaire décrivant 8 segments hélicoïdaux et une cavité où se loge la molécule d'hème. L'hème a une structure plane tétrapyrrolique et un atome de fer (état ferreux) enchâssé en son centre. Cet assemblage complexe permet la fixation d'une molécule d'oxygène liée au fer. Une cavité existe au sein du tétramère d'hémoglobine où interagissent les ions chlorures et le 2,3-diphosphogycérate (2,3-DPG).

La fixation sanguine se fait par dissolution quasi instantanée pour les gaz inertes et combinaison chimique plus lente pour les autres gaz. Le sang normal contient 14 % d'hémoglobine et l'hémoglobine peut transporter jusqu'à 1,34 mL d' $O_2$  pur par gramme. La capacité oxyphorique du sang, c'est-à-dire la capacité totale de transport de l'oxygène représente

donc :  $14 \times 1,34$  (1,39 en fait pour le pouvoir oxyphorique de l'Hb fonctionnelle) soit environ 18,8 mL d'O<sub>2</sub>.

Le transport du CO<sub>2</sub> via les globules rouges ne relève pas d'une liaison directe à l'hème. Seulement 25 % du CO<sub>2</sub> est lié à l'extrémité N-terminale des groupes aminés de l'hémoglobine désoxygénée. La carbaminohémoglobine ainsi formée suit une courbe de dissociation analogue à celle de l'oxygène et dépendant de la pression partielle en CO<sub>2</sub> du sang.



**Figure 4 :** Structure tétramérique de la molécule d'hémoglobine.

### e2) Substituts de la fonction de transfert d'oxygène

Le sang considéré comme l'un des tissus essentiels à la vie sert à transporter les gaz respiratoires, les nutriments et les métabolites, mais assure également la régulation hydrique, l'intégrité du système vasculaire, la réponse aux agressions diverses. Sur le plan médical, la transfusion sanguine pose un certain nombre de problèmes : incompatibilité de groupes sanguins, difficultés d'approvisionnement, transmission de maladies infectieuses. Dans le but de mettre au point des produits de substitution susceptibles de remplacer temporairement quelques unes des fonctions du sang, des transporteurs d'oxygène intravasculaires ont été mis au point ; ce sont des substituts de sang. Les transporteurs d'oxygène doivent être pourvus de propriétés leur permettant de transporter et d'échanger l'oxygène et le gaz carbonique. Actuellement, seules les solutions d'hémoglobine et les fluorocarbones font l'objet de recherches cliniques avancées (Riess, 1992). Diverses sources de matériel sont utilisées, sang humain, sang bovin, hémoglobine modifiée par des méthodes chimiques (Bucci et al, 1996) ou par génie génétique (Olson, 1996). Les fluorocarbones constituent l'autre voie de recherche pour le développement d'un transporteur de l'oxygène de nature chimique (Sirieix et al, 1996).

### e3) Fixation de l'oxygène à l'hémoglobine

Un facteur important qui détermine l'efficacité du transport de l'O<sub>2</sub> par le sang est l'affinité de l'hémoglobine pour l'O<sub>2</sub>. Elle caractérise la plus ou moins grande facilité d'association ou de dissociation du pigment pour ce gaz. Cette affinité est moins forte dans le tétramère (hémoglobine) que dans l'unité constitutive (la myoglobine). Si l'hémoglobine présente une trop grande affinité, des quantités importantes d'O<sub>2</sub> ne sont pas libérées aux tissus et si l'affinité est trop faible, l'hémoglobine n'est pas idéalement saturée dans les poumons. Le meilleur moyen d'estimer l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est de tracer la courbe d'équilibre (OEC pour "oxygen equilibrium curve"). L'OEC dépend de la concentration en hémoglobine, de la PO<sub>2</sub> artérielle et veineuse et du flux sanguin. Il peut être estimé, *in vitro*, pour évaluer la quantité d'O<sub>2</sub> effectivement libérée pour être délivrée aux tissus. La courbe tracée représente soit la courbe d'association (capacité de la molécule à fixer réversiblement l'O<sub>2</sub> sur le fer ferreux de l'hème) soit la courbe de dissociation (ODC) de l'O<sub>2</sub>. Des termes correctifs qui tiennent compte de l'oxygène figé et non fixé à l'hémoglobine peuvent être introduits de manière théorique (Streiff et al, 1973).

Dans le tétramère, la fixation de l'oxygène devient coopérative, c'est-à-dire que l'affinité d'un site libre augmente (jusqu'à deux cents fois plus grande) quand d'autres sites ont déjà lié une

molécule d'oxygène. L'affinité du tétramère pour l'oxygène peut être modulée par des effecteurs allostériques (effecteurs hétérotropes), petites molécules capables de se lier à la protéine en des sites différents de celui de l'oxygène et confinées chez la plupart des vertébrés dans le globule rouge (action locale). Parmi ces effecteurs, généralement des dérivés du métabolisme du globule rouge, on compte des ions  $H^+$  (qui diminuent l'affinité), le 2,3-diphosphogycérate (abaisse l'affinité de l'hémoglobine) et diverses substances organiques ou inorganiques.

*L'effet Bohr* correspond au fait que l'augmentation du  $CO_2$  dans le sang favorise la libération de l' $O_2$  par l'Hb.

*L'effet Haldane* correspond au fait que l'augmentation de l' $O_2$  dans le sang favorise la libération du  $CO_2$  par l'Hb.

#### e4) Transport facilité en présence d'hémoglobine ou de myoglobine

Un transport facilité de l'oxygène en présence d'hémoglobine (Klug et al, 1956 ; Kreuzer, 1970; Stroeve et al, 1976 ; Tsai, 1994) a été décrit par Hashimoto et al (1990) mettant en œuvre un transfert équilibré des molécules d'oxyhémoglobine et d'oxygène (Wyman, 1966).

Toutes ces propriétés nouvelles facilitent la décharge du pigment en oxygène : la myoglobine sert au stockage de l'oxygène, l'hémoglobine tétramérique permet son transport d'un point à l'autre de l'organisme. Le système circulatoire permet d'assurer aux tissus un apport suffisant en oxygène.

#### 1.1.2.2) Transport global de l'oxygène aux tissus par le système circulatoire

L'hémorhéologie apporte de nombreuses informations, pour préciser le rôle du système circulatoire dans le transport global de l'oxygène.

Cette approche globale ne tient pas compte des mécanismes de diffusion liés à la libération de l'oxygène dans les capillaires.

L'oxygénation des tissus est conditionnée par l'écoulement des hématies dans les capillaires. La vitesse des globules rouges dans les vaisseaux est fonction du diamètre de ceux-ci (artériole, capillaire, veinule, Tateishi et al, 1991). Les hématies devront adapter leurs formes à ces derniers et donc posséder une propriété fondamentale : la déformabilité passive.

Les travaux de Stoltz et al (1996) ont montré que le transport global (TG) en O<sub>2</sub> (capacité de transport théorique) des poumons aux tissus peut être approché comme une fonction des propriétés rhéologiques du sang. Le concept d'"hindrance vasculaire" (notée Z) est introduit et représente l'influence de la viscosité sanguine (notée  $\eta$ ) et de la structure du "lit vasculaire" sur le transport global. Le transport global de l'oxygène est approché en calculant le débit moyen en hémoglobine dans les vaisseaux en supposant un comportement Newtonien du sang :

$$\text{TG} = Q [\text{O}_2]$$

avec  $[\text{O}_2]$  la concentration en oxygène artériel par unité de volume  
c'est-à-dire  $K \cdot \text{SaO}_2 \cdot H$  avec K constante,  $\text{SaO}_2$  la saturation de l'Hb (%) et H l'hématocrite.

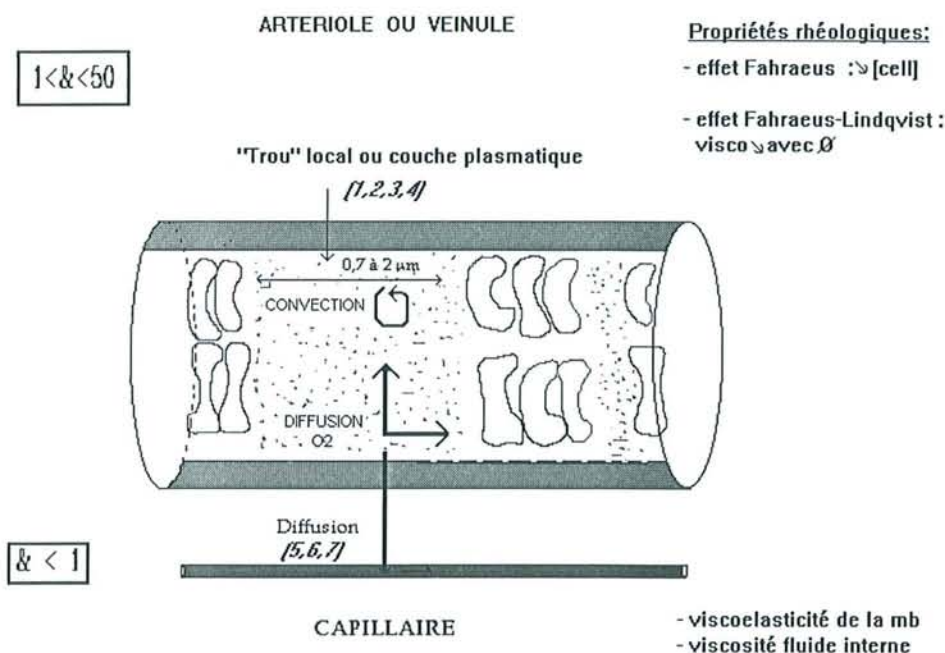
L'équation du transport global en oxygène devient donc :

$$\text{TG} = C / Z \cdot H / \eta$$

avec C définie comme une constante liée à la pression locale et à  $\text{SaO}_2$ .

Dans ce mode de détermination, le transport global est défini comme le produit d'une constante et du rapport  $H / \eta$  c'est-à-dire hématocrite/viscosité (pour une "hindrance vasculaire" constante, sans mécanisme de compensation comme la vasodilatation), sans présager des modifications physico-chimiques, de l'équilibre Hb-O<sub>2</sub> et des phénomènes hémodynamiques locaux dans la microcirculation.

La figure 5 représente le transport global du flux sanguin vers les tissus au niveau des artérioles en fonction des propriétés rhéologiques (effet Fahraeus qui baisse l'hématocrite et effet Fahraeus-Lindqvist qui baisse la viscosité sanguine).



**Figure 5 :** Représentation de la circulation du sang au niveau de l'artériole et de la veinule et du phénomène d'anastomose. Les chiffres renvoient aux références suivantes : 1 : Holland et al, . 2 : Huxley et Kutchai, 1983. 3 : Zhang et al, . 4 : Ellis et al, 1990. 5 : Swain et Pittman, 1989. 6 : Kuo et Pittman, 1988. 7 : Ellsworth, 1990.

a) Pression partielle en O<sub>2</sub> du sang artériel (PaO<sub>2</sub>)

Chez un adulte en bonne santé, au niveau de la mer (pression barométrique, 760 mm Hg), la valeur normale de la pression partielle en O<sub>2</sub> du sang artériel est habituellement de 97 mm Hg. Au-dessus de 80 mm Hg, les variations de PaO<sub>2</sub> n'ont que très rarement une incidence thérapeutique, les variations de la saturation (SaO<sub>2</sub>) étant alors minimales. A cette altitude, l'hypoxémie est ainsi définie comme une PaO<sub>2</sub> inférieure à 80 mm Hg chez un adulte respirant de l'air ambiant. Le tableau 2 indique les valeurs de PaO<sub>2</sub> acceptables pour certaines classes d'âge de la population.

b) Rapport entre la concentration en O<sub>2</sub> de l'air inspiré (FIO<sub>2</sub>) et la PaO<sub>2</sub>

Le tableau 3 ci-après illustre la relation entre la teneur en O<sub>2</sub> de l'air inspiré et la pression partielle en oxygène du sang artériel (PaO<sub>2</sub>). Une hypoxémie est prévisible lorsqu'un patient respire de l'air ambiant si la PaO<sub>2</sub> est inférieure à 0,5 x FIO<sub>2</sub>.



<b>Adulte et enfant :</b>	
Valeur normale	<b>97 mm Hg</b>
Valeur acceptable	<b>&gt; 80 mm Hg</b>
Hypoxémie	<b>&lt; 80 mm Hg</b>
<b>Nouveau-né :</b>	
Intervalle de valeurs acceptables	<b>40-70 mm Hg</b>
<b>Personnes âgées :</b>	
Valeurs acceptables	
60 ans	<b>&gt; 80 mm Hg</b>
70 ans	<b>&gt; 70 mm Hg</b>
80 ans	<b>&gt; 60 mm Hg</b>
90 ans	<b>&gt; 50 mm Hg</b>

**Tableau 2** : Valeurs de PaO<sub>2</sub> acceptables, au niveau de la mer, en respirant l'air ambiant (21 % d'O<sub>2</sub>). D'après Martin, 1992.

<b>FIO<sub>2</sub> (%)</b>	<b>PaO<sub>2</sub> minimale prévue (mm Hg)</b>
30	150
40	200
50	250
80	400
100	500

**Tableau 3** : Valeur de la pression partielle artérielle en oxygène (PaO<sub>2</sub>) en fonction du taux en O<sub>2</sub> de l'air inspiré chez un homme normal. D'après Martin, 1992.

### I.1.2.3) Libération de l'oxygène

La courbe de dissociation (ou déoxygénation) de l'Hb oxygénée est sigmoïde et autorise ainsi une libération d'O<sub>2</sub> aux pressions physiologiques moyennes, et une extraction d'O<sub>2</sub> supplémentaire dans les tissus fonctionnels en basse pression d'O<sub>2</sub>, comme les muscles en activité. La mesure des variations dans le déplacement des courbes de dissociation a abouti au développement de la notion de P<sub>50</sub>. La P<sub>50</sub> caractérise l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub>, elle est définie à partir de l'OEC ou de l'OED pour laquelle 50 % de l'Hb se trouve saturée, ceci dans des conditions bien précises : température 37 °C, PCO<sub>2</sub> 40 mm Hg et pH 7,4. La valeur de P<sub>50</sub> normale est d'environ 27 mm Hg chez l'adulte. Une diminution de P<sub>50</sub> correspond à une augmentation de l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub> (Martin, 1992).

La courbe de dissociation de l'Hb oxygénée est affectée par le degré de saturation en Hb : 164 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> à 0 % de saturation initiale, 300 ; à 50 % et 1500 à 95 % (Staub et al, 1961).

Deux effets influent principalement sur l'allure de la représentation de Barcroft, courbe en S (sigmoïde) représentative de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (dissociation de l'HbO<sub>2</sub>)

- l'effet Haldane qui traduit la dépendance du transport du CO<sub>2</sub> selon la concentration en oxygène ([O<sub>2</sub>]). Le sang fixe d'autant plus de CO<sub>2</sub> que la pression partielle en O<sub>2</sub> est faible, phénomène facilité par la fixation du CO<sub>2</sub> au niveau cellulaire.
- l'effet Bohr qui indique une dépendance de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (ODC) selon la concentration en CO<sub>2</sub> et le pH. Ces deux facteurs sont modélisables pour calculer les diffusions simultanées dans les globules rouges de l'O<sub>2</sub>, du CO<sub>2</sub> et de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Mochizuki 1990).

La dynamique de libération de l'oxygène des globules rouges des capillaires aux tissus est un des phénomènes les plus importants. Les principaux paramètres sont :

- le flux sanguin des tissus (vitesses locales),
- le contenu en oxygène du sang,
- la densité des capillaires.

a) Diminution de l'affinité de l'Hémoglobine pour l'oxygène

On parle d'un déplacement de la courbe de dissociation de l'Hb vers la droite. Autrement dit, pour une  $PO_2$  donnée, on observe une diminution de la quantité d'HbO<sub>2</sub> par rapport à l'état normal. La capacité de transport de l'O<sub>2</sub> par le sang est diminuée parce que le contenu en O<sub>2</sub> diminue. Un déplacement vers la droite favorise donc le passage de l'O<sub>2</sub> du sang vers les tissus au niveau des capillaires périphériques. Cependant si le déplacement vers la droite est très important, le contenu en O<sub>2</sub> diminue presque toujours, quelle que soit la  $PO_2$ , ce qui limite notablement la quantité d'O<sub>2</sub> disponible pour les tissus, bien que celui-ci soit très facilement libéré par l'Hb.

b) Augmentation de l'affinité de l'Hémoglobine pour l'oxygène

Elle est le plus souvent considérée comme un déplacement de la courbe de dissociation vers la gauche. Ainsi, pour une  $PO_2$  donnée, la saturation est élevée. Les possibilités de transport de l'O<sub>2</sub> sont accrues puisque la quantité d'HbO<sub>2</sub> augmente. Les conséquences d'une augmentation de l'affinité de l'Hb sur l'oxygénation des tissus sont très importantes. Plus l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub> est grande, moins importante sera la quantité d'O<sub>2</sub> délivrée aux tissus pour une pression partielle en O<sub>2</sub> artériel donnée.

c) Intérêt clinique de la  $PaO_2$

Certains facteurs physiologiques, tels que la concentration en ions hydrogène (H<sup>+</sup>), la  $PCO_2$ , la température, modifient l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub>. Une augmentation de l'un de ces facteurs déplace la courbe de dissociation vers la droite et inversement pour une diminution de ces facteurs. Normalement l'intervention de ces facteurs est favorable à l'organisme. Par exemple, le métabolisme tissulaire produit des ions H<sup>+</sup> et du CO<sub>2</sub>, lesquels vont discrètement déplacer la courbe de dissociation vers la droite, déterminant une légère diminution de l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub>. Ceci va permettre le transfert d'une quantité plus importante d'O<sub>2</sub> au niveau tissulaire. Cependant en pathologie, ces relations peuvent être défavorables à l'organisme. Par exemple, un déplacement important et soudain de la courbe de dissociation à droite diminue la quantité d'O<sub>2</sub> artériel disponible au niveau tissulaire. Donc une acidémie soudaine et importante, jointe ou non à une hypercapnie, qui détermine une diminution du contenu artériel en O<sub>2</sub> et par voie de conséquence diminue la quantité d'O<sub>2</sub> disponible pour les tissus. L'intérêt clinique de la

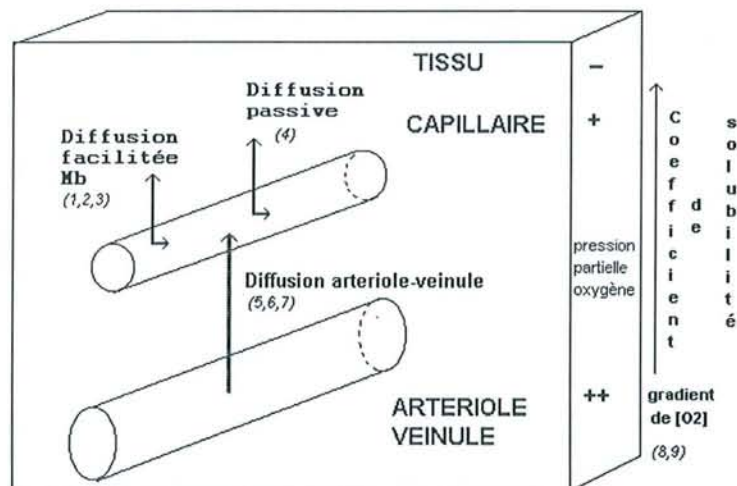
mesure de  $P_{50}$  n'est actuellement pas certain et certains auteurs doutent de son utilité (Martin L, 1992).

Une concentration élevée en 2,3-DPG abaisse l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et autorise ainsi sa libération au niveau des tissus. La réduction artificielle de l'affinité de Hb-O<sub>2</sub> permet d'augmenter la PO<sub>2</sub> tissulaire grâce à des inhibitions allostériques (Khandelwal et al, 1993). D'autres facteurs influent sur l'affinité comme l'hyperchylomicronémie (hyperlipidémie) qui augmente l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub> en annulant lentement le gradient de H<sup>+</sup> à travers la membrane du globule rouge par phosphorylation oxydative (Poss et al, 1990).

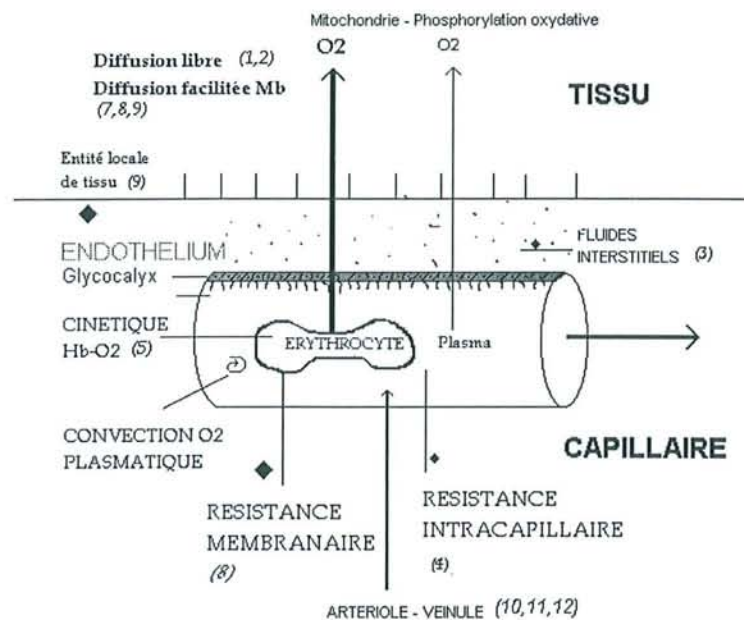
#### 1.1.2.4) Diffusion de l'oxygène dans les tissus

##### a) Diffusion facilitée en présence de myoglobine

Une diffusion facilitée de l'oxygène par la myoglobine a été décrite (Jürgens et al, 1990). La figure 6 montre le gradient d'oxygène permettant sa diffusion (passive et facilitée) jusqu'aux tissus. Une interconnectivité du réseau circulatoire permet une oxygénation uniforme des tissus (Figure 7).



**Figure 6:** Interconnectivité du réseau circulatoire, les chiffres renvoient aux références suivantes: 1: Klug et al, 1956. 2 : Wittenberg, 1970. 3 : Scholander et al, .4: Krogh et al, .5: Swain et Pittman, 1989. 6: Kuo et al, 1988.7: Wieringa et al, 1993. 8: Ellsworth, 1990. 9 : Popel, 1989.



**Figure 7:** Libération de l'oxygène des érythrocytes et transfert jusqu'aux zones tissulaires. Les chiffres renvoient aux références suivantes : 1 : Krogh et al. 2 : Piiper J, 1992. 3 : Weiner et al, 1992. 4 : Khandelwal et al, 1993. 5 : Moll et al, 1968. 6 : Jurgens et al, 1990. 7 : Popel et al, 1989. 8 : Hoofd et al, 1990. 9 : Desjardins et al, 1990. 10 : Swain et al, 1989. 11 : Kuo et al, 1988. 12 : Ellsworth et al, 1990.

## b) Evaluation de l'état d'oxygénation tissulaire

L'évaluation de l'hypoxémie est une étape essentielle dans le cadre de l'évaluation du patient comme elle l'est pour la mise en oeuvre du traitement. Il est essentiel d'évaluer le degré d'oxygénation tissulaire et cette évaluation ne saurait être séparée de celle de l'hypoxémie. Pour estimer l'état d'oxygénation tissulaire, en absence d'appareillages dévolus à cette mesure, il est nécessaire d'évaluer l'état cardiaque, l'état de la perfusion périphérique et les mécanismes mis en jeu pour le transport de l'O<sub>2</sub> dans le sang.

L'évaluation du débit cardiaque et de l'état de la perfusion capillaire repose sur l'examen clinique, s'appuyant habituellement sur des signes vitaux et un examen physique. La pression artérielle, le pouls, la fréquence cardiaque, l'ECG, l'état de la peau et sa coloration, le remplissage capillaire, l'examen des organes des sens, l'équilibre électrolytique et la diurèse en constituent quelques éléments clés. Si le débit cardiaque et la perfusion capillaire sont corrects, seuls les mécanismes de transport de l'O<sub>2</sub> au niveau du sang peuvent être responsables de troubles de l'oxygénation tissulaire. Ces mécanismes reposent sur 3 éléments :

b1) *La pression partielle artérielle en O<sub>2</sub>*

Elle est responsable du gradient d'O<sub>2</sub> entre les tissus et le sang des capillaires périphériques. Ce gradient est un facteur déterminant de la vitesse et de la durée de passage de l'O<sub>2</sub> du sang vers les tissus. Une hypoxémie indique que l'élément sanguin du gradient de pression de l'O<sub>2</sub> est inférieure à la normale. L'hypoxie tissulaire est alors probable. Pour éviter cette hypoxie (en présence d'une hypoxémie), le système cardiovasculaire doit alors augmenter la perfusion tissulaire ou bien le taux d'Hb (polycythémie). Le phénomène de transport global des hématies ainsi que la rhéologie prennent alors une importance considérable.

b2) *Le contenu en O<sub>2</sub> du sang*

Le contenu du sang en O<sub>2</sub> détermine la quantité d'O<sub>2</sub> susceptible de quitter le sang lorsque la PaO<sub>2</sub> diminue. Il constitue donc un facteur important pour déterminer combien d'O<sub>2</sub> peut quitter le sang avant que le gradient de pression ne devienne insuffisant pour assurer les échanges entre le sang et les tissus. Au fur et à mesure que le contenu du sang en O<sub>2</sub> diminue, la quantité d'O<sub>2</sub> susceptible de quitter le sang, pour une baisse donnée de la PaO<sub>2</sub>, diminue également. Avec l'augmentation du débit cardiaque, la diminution du contenu du sang en O<sub>2</sub> peut être responsable d'un défaut d'approvisionnement tissulaire en O<sub>2</sub>. Les facteurs dont dépend le contenu sanguin en O<sub>2</sub> sont :

- \* L'*hypoxémie*, qui détermine une diminution de la saturation en oxygène (SaO<sub>2</sub>) et donc du contenu en O<sub>2</sub>.
- \* L'*hypercapnie*, l'*acidémie* et l'*hyperthermie*, responsables d'un déplacement vers la droite de la courbe de dissociation de l'Hb ; l'Hb présente alors une moindre saturation en O<sub>2</sub>.
- \* L'association de l'*hypoxémie* et de l'*acidémie*, peut abaisser le contenu en O<sub>2</sub> sanguin à un niveau critique. L'hypoxie tissulaire doit être considérée comme présente chaque fois que sont associées hypoxémie et acidémie.
- \* L'anémie diminue évidemment le contenu du sang en O<sub>2</sub> puisque la quantité d'Hb contenue dans 100 mL de sang diminue. D'autres facteurs peuvent faire baisser le contenu en O<sub>2</sub> du sang ; parmi ceux-ci nous trouvons la méthémoglobinémie et l'intoxication par le monoxyde de carbone.

### b3) *L'affinité de l'hémoglobine pour l'O<sub>2</sub>*

Différents facteurs interviennent sur les forces de cohésion entre Hb et l'O<sub>2</sub>. Ceci est important, car pour un gradient donné d'O<sub>2</sub>, plus l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub> est importante, plus la quantité d'O<sub>2</sub> transférée au niveau tissulaire sera limitée.

\* *L'alcalémie et l'hyperthermie* augmentent l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub>. Ce déplacement de la courbe de dissociation à gauche peut être très important sur le plan clinique lorsque l'alcalose coexiste avec une hypoxémie ou une diminution du contenu en O<sub>2</sub>.

\* Une diminution de P<sub>50</sub> signifie que, pour un pH de 7,4, 50 % de l'Hb sera saturée pour une valeur de PaO<sub>2</sub> inférieure à 27 mm Hg ; l'affinité pour l'O<sub>2</sub> est donc augmentée.

### 1.1.2.5) Les types d'échange de l'oxygène au niveau cellulaire

Deux grands types de mécanismes physiques président aux échanges à travers les membranes biologiques en général, et la paroi capillaire en particulier.

#### a) La diffusion

Un mouvement moléculaire aléatoire entraîne la migration des molécules de gaz des zones de haute pression vers celles de basse pression. Ce mouvement passif des molécules gazeuses s'appelle la *diffusion*. Ce phénomène dépend de l'aptitude des molécules gazeuses à traverser la membrane des cellules et donc des caractéristiques propres de cette membrane. Cette diffusion à travers une membrane semi-perméable est la conséquence d'un gradient de pression ; c'est-à-dire que la pression d'un côté de la membrane doit être supérieure à celle existant de l'autre côté. Plus grande sera cette différence, plus rapide sera le transfert des molécules à travers la membrane. La diffusion s'arrête quand les pressions partielles sont égales de part et d'autre de la membrane, situation définie comme un état d'équilibre dynamique

La diffusion est régie par le gradient de concentration du soluté entre les deux compartiments que sépare la membrane. Ce gradient tend à se réduire, comme prévu par la loi de Fick.

Dans le capillaire les phénomènes de diffusion prédominent pour les gaz qui diffusent à peu près librement.

## b) La convection

La convection correspond au transport de solutés dissous dans l'eau qui traversent la paroi capillaire et dépend donc à la fois du volume de l'eau transporté et de la sélectivité de la membrane pour le soluté.

*Nombre de Peclet* : il précise l'importance relative des phénomènes de convection et de diffusion.

On peut ainsi définir un nombre Pe axial et un nombre Pe radial selon :

$$Pe = a^2 / t \cdot D$$

avec : a la distance,

t le temps de transit,

D le coefficient de diffusion.

Pour une molécule, quand le nombre Pe est petit (pour un D élevé) les échanges sont limités par la convection ("diffusion flow limited"). Inversement quand le nombre Pe est élevé (pour un D faible), les échanges sont limités par la diffusion ("diffusion limited") (Rusch et al, 1983).

*Nombre de Sherwood* : ce nombre précise l'importance respective de la diffusion et des réactions.

Quand le nombre de Sherwood est petit, les échanges sont limités par la perméabilité et on peut considérer que la diffusion radiale est infiniment rapide.

## c) Description de modèles de diffusion de l'oxygène

De nombreux modèles furent développés et visaient à expliciter certains mécanismes diffusionnels de l'oxygène à partir des mesures des valeurs de coefficient de diffusion de l'oxygène. Une étude bibliographique complète des modèles touchant à la diffusion de l'oxygène aux tissus a été réalisée par Popel (1989). Nous nous limiterons à citer les plus importants d'entre eux :

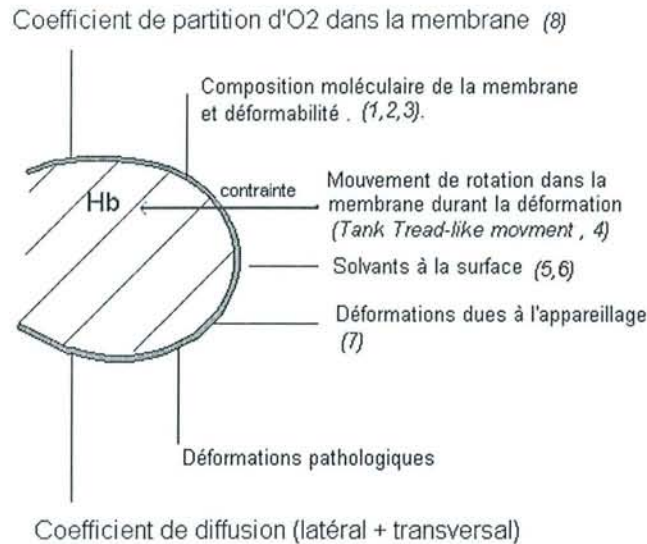
- Transfert de l'O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> du sang au poumon. Un modèle mathématique a été construit avec trois équations concernant l'O<sub>2</sub>, le CO<sub>2</sub> et l'HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en tenant compte des effets de Bohr et de Haldane. (Mochizuki, 1990).



- Etude théorique de l'influence de la diffusion et la cinétique de libération de l'oxygène aux milieux environnants (Nicolson, 1950).
- Libération de l'oxygène par une couche de globules rouges : il s'agit d'une approche mathématique qui tient compte de la diffusion de l'oxygène dans une suspension de globules rouges (et d'hémoglobine libre) dont l'épaisseur augmente avec le temps (Coin et Olson, 1979).
- Rôle de l'hémoglobine et la myoglobine dans le transport facilité de l'oxygène aux tissus (Salathe et Xu, 1991).
- Perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales à l'oxygène. Les résultats des valeurs de  $PO_2$  obtenus à l'aide d'une électrode à oxygène sont intégrés pour construire un modèle de comparaison entre la diffusion dans l'endothélium et les tissus (Liu et al, 1994).
- Apport de l'oxygène des artéioles aux capillaires : cette approche invalide le modèle simpliste de diffusion de Krogh (1919) en établissant un apport important lié à la convection et la diffusion de l'oxygène de vaisseaux à proximité d'un réseau de capillaires (Ellsworth et Pittman, 1990).
- Diffusion de l'oxygène dans la microcirculation du myocarde. Il s'agit d'une approche complète en trois dimensions dans un réseau de capillaires incluant la diffusion libre de l'oxygène (Wieringa et al, 1993).

d) Exemple de paramètres affectant la diffusion de l'oxygène dans la membrane érythrocytaire

Le coefficient de diffusion de l'oxygène qui reflète le phénomène de diffusion de l'oxygène est affecté par certains facteurs. Ceux-ci sont intrinsèques ou constitutifs à la membrane (composition, déformation pathologique) ou extrinsèques à celle-ci (solvants, appareillage). Ceux-ci sont indiqués sur la figure 8. Le coefficient de partition de l'oxygène représente un paramètre des plus importants et dépend en grande partie de la solubilité de l'oxygène dans les compartiments membranaires.



**Figure 8** : Exemple des paramètres liés à la membrane érythrocytaire ayant une influence sur le phénomène de diffusion de l'oxygène. Références : 1: Klug et al, 1956. 2: Wittenberg et al, 1970. 3: Scholander et al, ., 4: Krogh et al . 5: Swain et al, 1989. 6: Kuo et al, 1988. 7: Wieringa et al, 1993, 8: Ellsworth et al, 1990. 9: Popel et al, 1989.

#### 1.1.2.6) Mécanismes de compensation de l'hypoxémie

Lorsque les corps neuroépithéliaux détectent une diminution de la pression partielle artérielle en oxygène, un phénomène d'adaptation entre en jeu.

##### a) Les chémorécepteurs (corps neuroépithéliaux)

Au niveau pulmonaire, les corps neuroépithéliaux sont composés d'amas innervés et sont distribués le long de la muqueuse respiratoire chez l'homme. Ils ont un rôle de prise d'information de l'hypoxie, par un mécanisme sensible à l'O<sub>2</sub> en présence de canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'O<sub>2</sub> couplés à des protéines (b-cytochrome NADPH oxydase, (Youngson et al, 1993). Les chémorécepteurs périphériques sont de petits amas d'un tissu proche du tissu nerveux, situé au niveau de la crosse aortique et de la bifurcation des artères carotides primitives. Ce sont les corpuscules carotidiens et aortiques. Cette masse limitée de tissu présente un métabolisme exceptionnellement élevé, associé à une vascularisation très importante ; ce tissu est donc très sensible à la moindre diminution de l'apport d'O<sub>2</sub>. Une étude chez le rat a montré la relation entre la PO<sub>2</sub> microvasculaire et le métabolisme de l'O<sub>2</sub> dans le corps carotidien (Rumsey et al,

1991). Lorsque, pour une raison quelconque (diminution du contenu artériel en  $O_2$ , diminution de la  $PaO_2$  ou diminution du débit sanguin) la  $PO_2$  diminue à leur niveau, des signaux efférents (moteurs) sont émis en direction de l'appareil pulmonaire en vue d'augmenter la ventilation. Le but est d'augmenter en cascade la  $PO_2$  alvéolaire, puis la  $PaO_2$  puis la  $PAO_2$  pour satisfaire ces chémorécepteurs. Leur action sur le système cardio-vasculaire vise également à augmenter le débit cardiaque en réponse à une diminution de l'apport en  $O_2$ . L'augmentation du débit cardiaque constitue l'un des principaux mécanismes de compensation de l'hypoxémie. Si le débit cardiaque augmente, la quantité d' $O_2$  prélevé sur chaque volume de sang diminue. Il s'ensuit une augmentation de la  $PO_2$  et de la quantité d' $HbO_2$  du sang veineux.

Il est donc nécessaire de connaître les manifestations cliniques témoignant de l'intervention des mécanismes compensateurs cardiaques et pulmonaires de l'hypoxémie.

#### *b) Développement d'une circulation collatérale en cas d'ischémie*

Dans une situation d'ischémie sévère, l'un des moyens d'adaptation de l'organisme est le développement d'une circulation collatérale de suppléance. Au niveau du myocarde par exemple, le développement d'une telle circulation peut minimiser les conséquences d'une occlusion d'un gros tronc. Dans certains cas, on observe même une "revascularisation" complète du territoire qui dépend du ou des vaisseaux occlus. Cependant, cette circulation est le plus souvent insuffisamment développée pour assurer une vascularisation satisfaisante du tissu à risque (Van Belle, 1997).

L'administration de facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ou son expression locale sont associés à une augmentation de la circulation collatérale liée à l'ischémie aussi bien dans le myocarde que dans les tissus périphériques (Bauters et al, 1995 ; Takeshita et al, 1994).

### **I.1.3) Etat des connaissances et problématique posée**

D'un bout à l'autre du système d'échange et de transport de l'oxygène, l'évaluation d'un état d'hypoxie ou d'hyperoxie n'est pas chose aisée. Ainsi, au niveau du transfert alvéolo-capillaire, la diffusion de l'O<sub>2</sub> est, en théorie, un paramètre mesurable et quantifiable à partir des équations des gaz alvéolaires (Yamaguchi et al, 1991). A l'opposé, après libération de l'oxygène, l'évaluation de l'état d'oxygénation tissulaire n'est pas simple. Il s'agit à ce jour d'une évaluation clinique à laquelle une interprétation correcte de la mesure des gaz du sang peut apporter une aide significative. Les outils dont disposent les cliniciens pour le calcul de la différence artériolo-artérielle ne sont pas applicables au calcul du processus de transfert de l'O<sub>2</sub> des globules rouges aux tissus. De même, l'évaluation de la densité capillaire ainsi que du nombre de vaisseaux collatéraux qui représentent de bons indicateurs de la vascularisation d'un tissu, n'est pas aisée en pratique clinique.

Certaines méthodes ont été développées, en vue d'estimer l'ampleur des dégâts causés par l'hypoxie, mais de manière indirecte. Par exemple, des marqueurs de stress ont ainsi permis d'apprécier les dommages subis par le système vasculaire lors de l'hypoxie. De même, des protéines associées à l'hypoxie de cellules endothéliales ont été décrites chez le bovin (Graven et al, 1993) comme des protéines de stress. Dans le même esprit, le taux de thrombomoduline sérique a été corrélé avec la TcPO<sub>2</sub> (Seigneur et al, 1993).

Ces approches qui visent à quantifier les signes extérieurs d'hypoxie ne renseignent pas sur le phénomène de diffusion de l'oxygène, à l'origine des états hypoxiques. Le contenu du sang en O<sub>2</sub> se détermine globalement par la mesure de la PO<sub>2</sub>, mais une approche plus fine concernant le gradient d'O<sub>2</sub> serait plus satisfaisante pour apprécier une éventuelle résistance locale au transfert diffusif de l'oxygène. Par quels moyens pourrait-on apprécier une résistance à la diffusion passive de l'oxygène au niveau des divers compartiments traversés ?

Dans le cas des membranes biologiques, la diffusion de l'oxygène est directement dépendante de son gradient de concentration. Or, la bicouche membranaire renferme des compartiments dans lesquels la solubilité de l'oxygène varie. En tenant compte du coefficient de partition de l'oxygène dans la membrane, la détermination du coefficient de diffusion, intégrant la viscosité membranaire, repose désormais sur des valeurs déduites et non plus calculées. Ce paramètre permet d'apprécier la résistance à la diffusion de l'oxygène, dans la membrane.

Les divers compartiments traversés sont susceptibles de présenter une résistance à la diffusion passive de l'oxygène. Cette étape cruciale dans la distribution de l'O<sub>2</sub> des érythrocytes aux tissus souffre de l'absence de moyens d'investigation.

Nous nous proposons de contribuer à une meilleure connaissance des processus de diffusion de l'O<sub>2</sub> en construisant certains outils spécifiques de l'O<sub>2</sub> dans les milieux biologiques. Les mesures d'oxygène par ces capteurs devront permettre de déterminer la capacité de résistance à la diffusion passive de l'oxygène de chaque compartiment traversé par l'oxygène entre sa libération dans la lumière du capillaire et son apport au niveau des tissus.

Les enjeux sont importants puisqu'il n'existe aucune instrumentation destinée à ce type d'analyse en laboratoire sur le marché. D'autre part, le système développé pourrait servir de banc d'essai pour l'étude de certains produits médicamenteux et de leurs effets sur la perméabilité à l'oxygène des parois vasculaires.

*Choix de la méthode de dosage  
de l'oxygène moléculaire*

## I.2) Choix de la méthode de dosage de l'oxygène moléculaire

Nos connaissances des mécanismes de libération et de régulation de l'oxygène sont limitées par certaines incertitudes liées d'une part à la dépendance de la concentration en oxygène intra-cellulaire (ainsi que la pression partielle en oxygène) et d'autre part au métabolisme cellulaire qui l'utilise. Diverses méthodes ont été proposées pour tenter de mesurer ces paramètres, c'est-à-dire de quantifier l'oxygène.

Les techniques de quantification sont fortement liées à la nature même de la molécule à doser et à ses caractéristiques physico-chimiques. Or l'oxygène présente certaines particularités physico-chimiques. En effet, l'oxygène atmosphérique à l'état basal est un biradical car il possède sur son orbitale électronique deux électrons, qui sont tous deux célibataires. Il est ainsi à l'état triplet car ces deux électrons célibataires ont des spins parallèles c'est-à-dire tournent sur eux-mêmes, dans le même sens et créent un champ magnétique. Cet état triplet confère à l'oxygène des caractéristiques physico-chimiques qui l'empêchent de réagir de manière covalente avec une autre molécule. Cette non-réactivité importante de l'oxygène atmosphérique en vue de la formation d'une liaison stable (covalente) constitue une inadéquation majeure avec les techniques de détection et de dosage par voies directes. C'est une des raisons pour laquelle les méthodes d'investigation de quantification de l'oxygène moléculaire nécessitent la détection de produits secondaires, souvent les résultats d'une réaction d'oxydo-réduction.

Parmi les techniques de dosage de l'oxygène moléculaire couramment mises en œuvre, certaines possèdent des avantages et des inconvénients qui limitent leur utilisation, en particulier sur des échantillons biologiques.

Citons de manière non exhaustive quelques techniques de mise en œuvre courante :

- La **polarographie** (électrode à oxygène).
- L'**oxymétrie** (l'oxymétrie de pouls et la spectrophotométrie).
- La **RPE** (la résonance paramagnétique électronique).
- La **luminescence** (la bioluminescence, la fluorescence ou la phosphorescence).
- Méthodes **Infra-Rouge (IR)**.

Notre objectif lié à la quantification de l'oxygène moléculaire dans les milieux biologiques nécessite au préalable de choisir une technique d'investigation. En étroite relation avec la technique de dosage, le développement d'un capteur d'oxygène doit permettre de réaliser des mesures fiables aussi bien dans le temps que dans l'espace.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à définir un cahier des charges précis comportant les exigences particulières liées à nos travaux (matériel biologique, temps de réponse, sensibilité, cinétique, etc.). Dans un second temps, nous avons abordé chaque technique de dosage d'oxygène moléculaire (polarographie, oxymétrie, RPE, luminescence, IR) ainsi que la signification scientifique et la pertinence des valeurs mesurées. Au regard des performances et particularités de chaque technique, nous avons ensuite sélectionné une technique comme le moyen d'investigation le plus en adéquation avec l'exigence de notre cahier des charges. La souplesse de la technique qui sera mise en œuvre devra également permettre le développement et l'utilisation de divers capteurs adaptés aux milieux biologiques.

### **I.2.1) Cahier des charges des contraintes expérimentales**

L'établissement de ce cahier des charges a nécessité de prendre en compte l'ensemble des exigences expérimentales et critères sous-jacents, dont les importances relatives sont difficiles à évaluer sans expériences préliminaires. Il ne nous était pas possible d'évaluer chaque technique après test, étant donné l'investissement financier très lourd et le temps que cette approche aurait nécessité.

Nous nous sommes par conséquent particulièrement attachés à définir une technique avec laquelle les valeurs mesurées reflètent au mieux l'incidence du taux d'oxygène par une méthode la plus directe. D'autre part, nous avons dû présager d'un ensemble de contraintes expérimentales qui contourneront au mieux les difficultés opératoires éventuellement rencontrées.

*Ces contraintes sont classées dans un ordre de priorité décroissant :*

- Mesure du taux d'oxygène par le moyen le plus direct.
- Technique ne consommant pas d'oxygène pour la mesure.
- Spécificité de la variation du signal mesuré selon le taux d'oxygène dissous.



- Méthode non invasive.
- Unité des résultats expérimentaux représentative de la réaction mise en jeu pour la mesure.
- Prise en compte des molécules d'oxygène libres dans le dosage.
- Sensibilité importante du capteur et linéarité de la réponse selon le taux d'oxygène.
- Résolution importante (miniaturisation du capteur).
- Couverture géographique du capteur suffisante pour que la mesure soit moyennée tout en restant locale.
- Temps de réponse de la technique le plus court possible.
- Utilisation de matrices et de capteurs d'oxygène réversibles et réutilisables.
- Rapidité et simplicité de mise en œuvre.
- Répétabilité intra-expériences et inter-expériences satisfaisantes (simplification du mode opératoire pour limiter les dérives expérimentales).
- Application à une grande variété de matériel biologique (sang total, plasma, cellules sanguines, tissus, etc.).

## **I.2.2) Méthodes d'investigation : méthodologies**

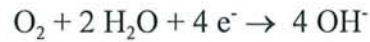
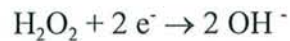
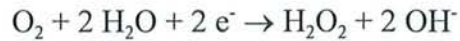
Quelques techniques de quantification directes ou indirectes de l'oxygène moléculaire sont développées ci-dessous, afin d'en préciser les principes, les avantages et les inconvénients liés à leur utilisation dans les milieux biologiques et plus particulièrement au niveau membranaire. La méthode respectera les priorités citées dans le cahier des charges.

### **I.2.2.1) La polarographie**

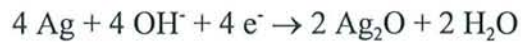
#### **a) Principe**

Il s'agit d'une méthode de détermination de la quantité d'oxygène dans des solutions d'électrolytes par des microélectrodes. L'oxymètre et les électrodes correspondantes fonctionnent selon le principe de Clark, avec de nos jours, une cathode en platine et une anode en argent. La tension de polarisation (de l'ordre de 800 mV) fait que l'O<sub>2</sub> existant est réduit en ions OH<sup>-</sup> à la cathode. Le courant résultant de cette transformation est proportionnel à la concentration en O<sub>2</sub> dans la solution à mesurer. Le courant amplifié est corrigé selon des paramètres ambiants (température, pression atmosphérique ambiante, vapeur d'eau saturante...).

A la surface de la cathode dans une solution alcaline :



A l'anode (électrode d'argent)



#### b) Applications

- Détermination de la pression partielle en oxygène dans le sang total (Milligan et al, 1987).
- Transport d'oxygène par une suspension de globules rouges (Stein et al, 1971).
- Détermination de la pression partielle en oxygène dans les tissus (Groebe et al, 1992).
- Détermination de la pression partielle en oxygène dans le plasma et dans une suspension de globules rouges (Goldstick et Tucker, 1992).

#### c) Avantages

- L'utilisation de microélectrodes (5µm, Buerk et al, 1993 ; 250 µm, Tomita et al, 1990) permet à cette technique d'être adaptée pour des mesures géographiquement très localisées dans l'espace et propre à un micro-environnement. La mesure en ce point est très ponctuelle et sous certaines conditions expérimentales (sans dépôt sur les électrodes) présente une bonne reproductibilité. Elle n'est envisageable qu'à l'échelle tissulaire et ne convient pas pour les mesures dans des membranes cellulaires.

#### d) Inconvénients

- La miniaturisation des électrodes est difficile et conditionne la résolution de la mesure (Suzuki, 1993).
- Il s'agit d'une technique invasive avec une destruction partielle de l'échantillon et une compression au point de mesure. Une instrumentation spécifique a été développée pour des mesures de PO<sub>2</sub> dans le cerveau en minimisant la surface de pression (Murr et al, 1994).
- La mesure s'opère plutôt à l'échelle locale et spatiale et non globale par rapport à la zone de l'échantillon mesurée. Ainsi, un enregistrement de la variation de potentiel reflètera un micro-

environnement et devra être renouvelée maintes fois en différents endroits pour suivre un gradient tangentiel.

- Les électrodes consomment une certaine quantité d'oxygène pour effectuer une mesure, ce qui altère les résultats avec le temps.
- L'étalonnage des électrodes se révèle délicat puisque avec une pression partielle en oxygène relative, la concentration en électrolytes varie (Robinson et Cooper, 1970).
- Les électrodes peuvent réagir à d'autres molécules car la spécificité n'est pas absolue pour l'oxygène.
- Il existe une interférence entre le signal de mesure et le potentiel membranaire.
- Une interférence directe avec l'oxygène du mélange gazeux (lors du bullage) nécessite un mode opératoire très précis et la certitude de la bonne localisation de la sonde.
- L'électrode réagit à tous les corps ayant diffusé à travers la membrane et ayant un potentiel de réduction similaire à celui de l'oxygène (800 mV) comme  $\text{CO}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{SO}_2$  et  $\text{H}_2\text{S}$ .
- Les électrodes se dégradent physiquement avec le temps et selon la composition des milieux biologiques (dépôts sur les électrodes qui ont séjourné dans les milieux de culture ou le sang), la reproductibilité des expériences n'est plus constante aux faibles concentrations en oxygène.
- Des interférences électriques extérieures ont été rapportées en particulier lors d'irradiation dans l'ultraviolet sur une microélectrode métallique.
- Lorsque la concentration en oxygène totale varie (augmentation de la concentration en oxyhémoglobine par exemple), cette technique indique une pression partielle constante car elle ne mesure que les molécules d'oxygène libre qui réagissent avec l'électrode de manière très localisée.

#### e) Valeurs liées

- $\text{PO}_2$ : Pour les échantillons biologiques, l'activité de l'oxygène est exprimée par le  $\text{P}(\text{O}_2)$ , la pression partielle dans la phase gazeuse qui est en équilibre avec la phase gazeuse. La  $\text{P}(\text{O}_2)$  s'obtient en multipliant la concentration en oxygène ( $[\text{O}_2]$ ) par sa pression totale en tenant compte du coefficient de solubilité (dit de Bunsen) de l'oxygène dans le milieu.
- Potentiel d'oxydoréduction.
- $[\text{O}_2]$  en unités de mL d' $\text{O}_2$  par dL (100 mL).

Malgré la miniaturisation possible jusqu'à la taille d'une aiguille (Belcaro, 1995) voire plus petite, cette technique consommatrice en oxygène ne présente pas une résolution suffisante (exigée à l'échelle de la membrane cellulaire) pour satisfaire aux contraintes établies préalablement. En effet, les mesures localisées ne permettent pas d'obtenir une information moyenne des distributions de concentration en oxygène mais uniquement une mesure ponctuelle de la pression partielle en oxygène. De plus, elle nécessite l'introduction d'un mélange gazeux avec une teneur en oxygène connue car l'étalonnage est très délicat.

### 1.2.2.2) L'oxymétrie

#### a) Principe

L'oxymétrie est un terme général concernant les différentes technologies capables de mesurer la saturation en oxygène de l'hémoglobine. La molécule d'hémoglobine se présente sous des formes diverses, oxyhémoglobine ( $\text{HbO}_2$ ), hémoglobine réduite (HbR), carboxyhémoglobine ( $\text{HbCO}$ ), sulfhémoglobine (SHb), méthémoglobine (MetHb) et hémoglobine foetale (HbF). Chacune de ces formes présente un spectre d'absorption spécifique. On mesure la quantité de lumière transmise et/ou absorbée par les différentes formes d'hémoglobine (Hb). Comme le spectre d'absorption de l'hémoglobine est différent de celui de l'hémoglobine oxydée ( $\text{HbO}_2$ ) dans la région UV-Visible (Van Assendelft et al, 1970), le spectre optique mesuré obtenu expérimentalement est utilisé pour mesurer l'oxygénation (Yoshiya et al, 1983). On quantifie ainsi de manière indirecte la concentration en oxygène par une mesure de l'absorbance qui reflète le taux d'association dans le sang de l'oxyhémoglobine ( $\text{HbO}_2$ ) ou de l'oxymyoglobine ( $\text{MbO}_2$ ) dans les tissus.

#### b) Applications

- Détermination du coefficient de transfert d'oxygène dans les globules rouges (Shibuya et al, 1988).
- Libération d' $\text{O}_2$  (déoxygénation) des hématies dans des microvaisseaux de diamètres différents (artérioles de 30  $\mu\text{m}$ , capillaires de 22  $\mu\text{m}$ , veinules de 17  $\mu\text{m}$ ) dans le mésentère de rat (Tateishi et al, 1992).
- Coefficient de diffusion de la myoglobine dans les cellules du muscle squelettique (Jurgens et al, 1990).
- Détermination du coefficient de transfert dans la microcirculation (Kobayashi et al, 1993).
- Détermination du taux d'oxygène dans les microvaisseaux (Tateishi et al, 1990).

- Saturation d'oxygène dans les hématies de capillaires de muscle squelettique (Ellis et al, 1990).

#### c) Avantages

- La cinétique de formation d'HbO<sub>2</sub> peut être suivie par des expériences de spectrophotométrie rapide (Tateishi et al, 1992). Des capteurs très coûteux tels que des photomultiplicateurs rapides (amplification du signal) et des caméras très sensibles permettent d'avoir accès simultanément aux concentrations en Hb et en HbO<sub>2</sub> dans le sang. Le coefficient de diffusion de l'oxygène se détermine selon divers paramètres comme la concentration en Hb (transport facilité de l'oxygène en présence d'Hb) ou les caractéristiques physico-chimiques des membranes.
- Il s'agit d'une méthode non invasive, sans incorporation de capteurs susceptibles de modifier les propriétés de l'environnement étudié.

#### d) Inconvénients

- Le premier inconvénient réside dans la nature même de la mesure qui est liée à la présence de globine (myoglobine ou hémoglobine) dans l'échantillon. Les limitations de cette technique sont évidentes pour des échantillons autres que sanguins ou tissulaires.
- Dans les vaisseaux, la quantité de sang fluctue avec le cycle cardiaque et l'absorption varie avec le temps.
- La faible résolution des capteurs sur le marché limite cette technique, plus adaptée à l'échelle macroscopique que microscopique.
- Les effecteurs allostériques (pH, 2,3-DPG) qui influent de manière importante sur les courbes de dissociation et d'association globine-oxygène sont négligées dans la mesure d'absorbance.
- La précision de la détermination de la SaO<sub>2</sub> (saturation) diminue pour les hautes concentrations en O<sub>2</sub>. Ainsi une erreur de 5 % est commise pour une SaO<sub>2</sub> de 80 %, ce qui est cliniquement inacceptable (Martin, 1992).
- La précision de la mesure d'absorbance diminue fortement avec l'augmentation de la concentration en globules rouges, c'est-à-dire qu'une variation d'hématocrite entraîne des variations de transmission de lumière. Depuis ces observations, l'origine du comportement non linéaire de l'absorption de la lumière par le sang total a été attribuée généralement à la diffusion de la lumière sur ou à proximité des membranes des globules rouges (Barer et al, 1955). Ainsi la transmission de la lumière à travers une suspension de globules rouges est influencée par trois facteurs :

- la diffusion de lumière par les globules rouges,
- l'absorption de lumière par l'hémoglobine,
- l'absorption non spécifique de lumière par le milieu environnant.

De plus, les propriétés d'absorption du sang total ou d'une suspension de globules rouges sont différentes de celles d'une solution d'hémoglobine. De ces divers phénomènes résulte une dérive de la loi de Beer-Lambert qui rend l'interprétation des résultats très délicate (Fine et Weinreb, 1993).

- La détermination de la concentration en oxygène passe par le biais d'une fixation des molécules d'oxygène à la globine. La technique spectrophotométrique ne prend donc pas en compte les molécules d'oxygène libre. Celles-ci peuvent être en proportion importantes dans l'échantillon et ne pas être détectées si le niveau de saturation de tous les sites capables de fixer l'O<sub>2</sub> est atteint (en % ou fraction). La stoechiométrie de la réaction de fixation globine-oxygène est très importante car il apparaît que pour corrélérer les concentrations et pressions partielles en oxygène, il est nécessaire que la valeur de saturation soit élevée (SaO<sub>2</sub>). Cette technique ne peut donc être utilisée pour suivre un gradient de concentration en oxygène au sein d'un milieu biologique.

#### e) Valeurs liées

- **PaO<sub>2</sub>** : Pression artérielle mesurée.
- **SaO<sub>2</sub>** : ou saturation Hb-O<sub>2</sub> (en % ou fraction). Il s'agit de la fraction des sites occupée par l'Hb capables de fixer l'O<sub>2</sub>. En connaissant la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) qui représente le taux d'Hb rapporté à l'hématocrite, le transport global de l'oxygène dans la circulation générale peut être ainsi approché. Pittman (1975) a établi le % de saturation du sang total comme :

$$S = m \frac{D_M - B}{D_I - B} + b$$

avec  $D_M$  l'absorbance du sang total à la longueur d'onde

$D_I$  l'absorbance du sang total à la longueur d'onde isobestique pour l'hémoglobine.

$B$  un facteur de correction selon les coefficients d'extinction molaire.

- **SpO<sub>2</sub>** : Valeur de la Sa(O<sub>2</sub>) mesurée par oxymétrie de pouls.
- **TcPO<sub>2</sub>** : Pression d'oxygène trans-cutanée (IR). La peau semble subir les premiers désordres trophiques d'où l'intérêt de l'oxymétrie cutanée. La TcPO<sub>2</sub> mesure la quantité d'oxygène qui diffuse à travers la peau. Il apparaît alors comme une nécessité absolue de standardiser le site d'enregistrement qui influe très nettement sur les valeurs (Anastase et al, 1996).

L'oxymétrie comporte de nombreux aspects positifs et séduisants lors d'une utilisation à haute résolution (voir apport de la microscopie) et en cinétique rapide, mais se montre inutile pour des échantillons ne comportant pas de globine. En ce qui nous concerne, cette technique ne peut être appliquée car l'aspect quantitatif ne peut négliger de prendre en compte les molécules d'oxygène libres mais présentes dans l'échantillon. En effet, ni la PaO<sub>2</sub>, ni la Sa(O<sub>2</sub>) n'indique combien il y a d'O<sub>2</sub> dans le sang.

D'autres techniques de spectrophotométrie sont également développées comme la spectrophotométrie Infra-Rouge mais qui présente comme inconvénients majeurs, une atténuation considérable du rayonnement IR lors de la pénétration dans le tissu (Bucher, 1991), une diffusion sur les matériaux traversés et une localisation du faisceau moyen.

#### f) Cas de l'oxymétrie de pouls

La disponibilité de l'oxymétrie de pouls, méthode non sanglante de SaO<sub>2</sub> s'est généralisée. La valeur de la SaO<sub>2</sub> mesurée par ce moyen n'étant pas toujours identique à celle qui est obtenue par co-oxymétrie, le terme SpO<sub>2</sub> a été introduit pour les différencier.

##### f1) Avantages

- Mesure rapide et fiable
- Méthode performante pour distinguer l'oxyhémoglobine et l'hémoglobine réduite (désoxygénée)

##### f2) Inconvénients

\* L'oxymétrie de pouls ne permet pas de différencier la carboxyhémoglobine et l'oxyhémoglobine. La HbCO est ainsi lue par l'appareil comme de l'HbO<sub>2</sub>.

\* L'oxymétrie de pouls ne permet pas de faire la différence entre la désaturation en O<sub>2</sub>, d'une part, et une faible PaO<sub>2</sub> et la méthémoglobine (MetHb) d'autre part.

\* L'oxymétrie de pouls a tendance à donner des valeurs faussement élevées lorsque la vraie SaO<sub>2</sub> est très basse. Les valeurs basses de SaO<sub>2</sub> (< 80 %) doivent être confirmées par des mesures de gazométrie artérielle.

\* Cet appareil ne fonctionne correctement que si le pouls est bien frappé et se révèle peu fiable quand la perfusion des tissus est médiocre.

### f3) Conclusion

L'oxymétrie de pouls trouve son intérêt principal dans les cas où il s'agit de suivre l'évolution de SpO<sub>2</sub> (lecture en continu), notamment lorsque l'oxymétrie SpO<sub>2</sub> est employée en corrélation avec les résultats d'au moins une mesure directe de SaO<sub>2</sub>.

#### 1.2.2.3) La résonance para électronique (RPE) et la spectroscopie dans le proche IR

Le phénomène de RPE a pour origine la séparation de l'état triplet en trois états distincts d'énergies différentes sous l'action d'un champ magnétique intense. On dit qu'il y a levée de "dégénérescence" de l'état triplet. Des transitions entre ces états sont observées par absorption d'une onde électromagnétique convenable. Les radicaux libres et certaines substances de spin non nul présentent une résonance en RPE, ce qui n'est pas le cas des états singulets. L'hémoglobine dosée dans un flux à partir du principe de Fick (variation de la concentration en Hb-O<sub>2</sub>) peut être utilisée comme marqueur intravasculaire (Edwards et al, 1993).

Une étude par spectroscopie Infra-Rouge a démontré la faisabilité d'un dosage de la cytochrome oxydase (enzyme de la chaîne respiratoire) dont la concentration dépend essentiellement directement de l'hypoxie intracellulaire (Bucher, 1991).

Ces deux méthodes font appel soit à la détection des molécules d'hémoglobine et des radicaux oxygénés (RPE) soit à la détection de la cytochrome oxidase. Elles ne sont donc pas applicables avec tous les types de tissus.

#### 1.2.2.4) La luminescence : fluorescence - phosphorescence - bioluminescence



### a) Principe

Le principe repose sur l'inhibition du signal de luminescence par l'oxygène moléculaire.

### b) Applications

- Sonde optique rétinienne dans le cortex , acide pyrène butyrique (Mitnick et Jobsis, 1976).
- Capteur optique à l'oxygène, Ru(phen) (Rosenzweig et Kopelman, 1995).
- Sonde optique dans des mitochondries de cœur, acide pyrène butyrique (Snow, 1976).
- Cinétique de relargage de l'acide pyrène décanoïque (Radom et al, 1987).

### c) Avantages

- La fluorimétrie est une méthode non invasive pour l'échantillon car elle repose sur la collision entre les molécules d'oxygène et les sondes fluorescentes qui peut avoir lieu aussi bien intrinsèquement (sondes fluorescentes localisées dans la membrane) qu'extrinsèquement (sondes fluorescentes localisées à l'extérieur et atteintes par les molécules d'oxygène qui diffusent à travers l'échantillon).
- Cette technique donne accès à une mesure topographique lorsque la sonde fluorescente est incorporée de manière homogène dans tout l'échantillon. Il s'agit donc de maîtriser l'incorporation et éventuellement la cinétique de relargage de la sonde fluorescente pour assurer un signal de bonne qualité.
- Les intensités et les durées de vie des signaux de fluorescence dépendent directement du nombre de molécules d'oxygène libres.
- Le temps de réponse est très rapide en comparaison avec la technique polarographique car il s'agit d'une méthode de mesure liée uniquement à l'efficacité et à la probabilité de la collision oxygène-sonde fluorescente.
- Les mesures de fluorescence en résolution temporelle sont insensibles aux fluorescences intrinsèques d'autres chromophores. Ceci n'est pas vérifié pour les mesures en fluorescence statique.
- Cette technique présente une grande spécificité pour l'oxygène moléculaire car il n'y a pas d'interférences avec d'autres gaz du sang.
- Une détermination précise de l'intensité du signal de fluorescence permet d'approcher de manière quantitative (après étalonnage avec des micro-billes d'intensité connue) et absolue l'incidence de l'oxygène sur le phénomène d'inhibition de fluorescence.

- Il s'agit d'une méthode très sensible car toute molécule d'oxygène est supposée réagir avec les molécules de sondes fluorescentes (efficacité de la réaction). La sensibilité dépend surtout de la qualité des capteurs (photomultiplicateurs ou caméra), qui doivent bénéficier d'une amplification du signal et d'un refroidissement pour abaisser le bruit de fond.
- La disponibilité de sondes fluorescentes spécifiques de certains compartiments cellulaires (noyau, mitochondrie, cytoplasme) voire membranaires (région hydrophobe ou région des têtes polaires) donne à la fluorimétrie une souplesse importante. Tous les échantillons biologiques dans lesquels une fluorescence intrinsèque ou extrinsèque peut être détectée sont utilisables en fluorimétrie.

#### d) Inconvénients

- Sous l'action d'une illumination intense et selon le temps d'exposition à l'éclairement, une diminution de l'intensité de fluorescence (phénomène de « fading ») survient suite à la dégradation physique des molécules de sondes fluorescentes. L'incorporation de filtres spéciaux dans le dispositif optique ou l'utilisation d'un système d'illumination temporisé (laser pulsé) limitent ce phénomène mais sans le supprimer réellement. Le meilleur moyen de s'affranchir de cette contrainte est de déterminer les valeurs des durées de vie des états excités des sondes fluorescentes qui ne sont pas sensibles à ce phénomène.
- Pour les mesures de fluorescence réalisées en cuve et portant sur un échantillon dans sa globalité, la résolution n'est pas suffisamment importante.

#### e) Valeurs liées

- Constante de Stern-Volmer d'inhibition des intensités de fluorescence par l'oxygène moléculaire ( $K_{sv}$ ) : résolution statique.
- Constante dynamique d'inhibition des durées de vie des états excités de fluorescence par l'oxygène moléculaire ( $K_d$ ) : résolution temporelle.

La fluorimétrie, méthode de détection directe, apporte de nombreux avantages principalement au niveau de la spécificité de la réaction (collision oxygène-sonde fluorescente) et de la mesure. L'utilisation potentielle de cette technique à de nombreux échantillons biologiques (sang total, cellules sanguines, plasma, cellules endothéliales, tissus, etc.) permet d'obtenir des résultats homogènes (signal mesuré de même nature) qui pourront ultérieurement être comparés (à la différence de la spectrophotométrie). Si la fluorimétrie répond à de nombreuses attentes en terme de contraintes exprimées dans le cahier des charges, la résolution des mesures effectuées

sur des suspensions cellulaires en cuve n'est cependant pas suffisante pour valider cette méthodologie à l'échelle membranaire. Aussi cette technique devra être couplée à un moyen d'investigation de haute résolution permettant l'acquisition et les signaux de fluorescence. La microscopie à fluorescence présente ce double aspect.

#### 1.2.2.5) La microscopie à fluorescence (cytométrie par analyse d'images)

##### a) Principe

La microscopie quantitative est une association de deux techniques actuellement connues : la microscopie et la photométrie, elle permet de quantifier les images microscopiques et, dans certains cas, de doser diverses substances à l'échelle cellulaire et/ou subcellulaire (Brugal et al, 1992). Le domaine d'application de la microphotométrie se subdivise naturellement en deux voies fondamentales selon le mode d'observation microscopique employé :

- L'observation en lumière transmise, pour laquelle l'échantillon étudié se caractérise par la quantité de lumière qu'il absorbe (densitométrie). L'absorption peut être simplement due à la matière elle-même (microscopie par contraste) ou à des colorants absorbants. Ce mode est utilisé pour les mesures de concentration d'Hb et d'HbO<sub>2</sub> dans les tissus.
- L'observation en lumière incidente, pour laquelle l'échantillon étudié se caractérise par la quantité de lumière qu'il émet en se comportant comme une source lumineuse aux yeux de l'observateur dû à la présence de molécules fluorescentes (NADH) ou de fluorochromes artificiellement liés à des composants cellulaires (sondes fluorescentes extrinsèques).

L'analyse d'images en microscopie est fondée sur la mesure, en chaque point d'une cellule observée à travers un microscope, de la quantité de lumière absorbée ou émise. En répétant la mesure, par balayage de tous les points de la cellule et du fond qui l'entoure, l'image d'une cellule peut être représentée sous la forme d'une matrice numérique qui est traitée par un ordinateur.

##### b) Applications

- Microvaisseaux de mésentère (Itoh et al, 1995).
- Microcirculation - Tissus (Bruining et al, 1992).
- Capillaires (Pittman et Duling, 1975).
- Caractérisation de lipides dans la membrane érythrocytaire (Rodgers et al, 1991).

#### c) Avantages

- L'importante résolution de la microscopie à fluorescence constitue l'apport positif le plus évident. Cette résolution ( $\mu\text{m}$ ) permet de sélectionner des régions d'intérêt (physiques ou logicielles) sur lesquelles porteront l'analyse, ce qui suppose une détection très sensible du signal de fluorescence : photomultiplicateur ou caméra CCD ou à tube (Hiraoka, 1987).
- L'agrandissement proposé par cette technique permet de vérifier l'homogénéité du marquage par les sondes fluorescentes.
- La microscopie à fluorescence, jusqu'à maintenant dédiée à l'observation de coupes fluorescentes (qualitativement) s'ouvre désormais à la quantification du signal de fluorescence en mode statique, avec de nombreuses réserves dues au « fading » (Wade et al, 1994). En effet, la puissance de la source d'excitation et la durée de l'éclairement conditionnent l'importance du phénomène de « photodégradation ». Pour s'affranchir de la photodégradation, il est envisageable d'adapter au microscope un module de détermination des valeurs de durées de vie des états excités. Ce module d'adaptation n'est cependant pas disponible sur le marché et fera l'objet d'un développement extérieur en collaboration avec le GRAPP-DCPR (ENSIC).
- L'association d'une caméra et d'un photomultiplicateur sur un microscope permet de corrélérer respectivement des valeurs en niveaux de gris à un nombre de coups pour une même zone d'acquisition. Cette potentialité ouvre la voie à une calibration très fine (billes d'étalonnage) des appareillages en vue de la quantification absolue des signaux de fluorescence.

#### d) Inconvénients

- Une source d'illumination ainsi que des filtres atténuateurs seront choisis minutieusement afin de limiter le phénomène de « fading » (diminution du signal d'intensité de fluorescence) qui est préjudiciable pour des déterminations quantitatives de l'émission de fluorescence.
- Le nombre restreint d'échantillons analysés limite le traitement et l'analyse statistique.

#### 1.2.2.6) Choix de la méthodologie

Au regard des diverses techniques évoquées pour quantifier l'oxygène dans des milieux biologiques (polarographie, oxymétrie, RPE, luminescence), il apparaît très clairement que la fluorimétrie présente de nombreux avantages pour être retenue comme technique d'investigation dans notre étude. La potentialité qu'offrent les nouveaux capteurs photoniques (caméra et photomultiplicateur) montés sur un microscope à fluorescence apporte à la spectroscopie de fluorescence un atout primordial : la résolution à l'échelle microscopique.

En microscopie, le traitement des intensités de fluorescence (résolution statique) semble aujourd'hui maîtrisé (sous certaines réserves). A ce jour, aucun appareillage de détermination de la durée de vie des états excités de fluorescence (résolution temporelle) par microscopie à fluorescence n'est disponible sur le marché. Le développement d'une telle approche se révèle très intéressante pour approcher au mieux l'incidence de l'oxygène sur l'émission de fluorescence sans être perturbé par la photodégradation.

La signification des valeurs expérimentales obtenues par une technique revêt toute son importance dans cette étude. En effet, selon le type de résultats, la  $[O_2]$  ou la  $PO_2$ , les interprétations seront plus ou moins possibles. Ainsi, les constantes calculées sur les bases de la  $[O_2]$  sont indépendantes du solvant du système et dépendantes seulement de la viscosité. Ce n'est pas le cas de la  $PO_2$ . Cette distinction est importante pour la prédiction d'environnements inconnus dans les systèmes biologiques dans lesquels la solubilité de l'oxygène peut varier.

*Capteurs optiques d'oxygène*

### **I.3) CAPTEURS OPTIQUES**

Nous devons ainsi développer un capteur permettant une prise d'information sur la diffusion de l'oxygène. Dans ce but, une étude bibliographique a permis de dégager certains points importants.

#### **I.3.1) Principe des capteurs optiques**

Un capteur peut être défini comme un système fournissant une grandeur mesurable ou repérable (intensité, amplitude) reposant soit sur une connaissance intuitive, soit sur l'utilisation des lois de la physique et de la chimie-physique.

Le capteur est un outil de mesure qui doit combiner d'une part une conception de l'instrument par la connaissance du réel et du possible (conception-développement) et la confrontation de l'instrument à la réalité par l'expérimentation (validation).

Les capteurs chimiques optiques sont également désignés par les termes suivants selon le contexte : OPTODES pour chemin optique (Wolfbeis, 1991) ou OPTRODES pour (Opt(ical) elect(rode)). Ils sont définis comme un capteur où l'information chimique est transformée en un signal optique. Plus généralement, ce peut être un capteur basé sur un phénomène physico-chimique faisant intervenir des photons.

#### **I.3.2) Capteurs optiques de l'oxygène basé sur la fluorescence.**

##### **I.3.2.1) Historique**

C'est en 1939 qu'a été mis en évidence l'effet inhibiteur de l'O<sub>2</sub> sur la fluorescence et la phosphorescence (Kautsky, 1939). Il faut attendre 1968 pour que ce principe aboutisse au développement d'un appareil de mesure du taux d'O<sub>2</sub> dans l'atmosphère (Bergman, 1968). L'acide pyrène butyrique (PBA) a été utilisé pour étudier l'accessibilité de l'oxygène dans certaines régions des membranes biologiques (Vaughan et Weber, 1970). L'utilisation du PBA par Lubbers et Optiz (1975) a ouvert la voie aux sondes fluorescentes dérivées du pyrène, ayant la caractéristique de présenter une grande durée de vie des états excités (200 à 400 ns). Le couplage des dérivés pyréniques à une fibre optique (Seitz, 1988 ; Janata et al, 1994) et le

greffage sur du verre poreux (Wolfbeis et al, 1984) a été à l'origine de nombreux développements de capteurs d'oxygène. D'autres sondes fluorescentes furent testées avec plus ou moins de succès, comme le pérylène (Peterson et al, 1984). L'inhibition de la fluorescence de certains complexes métalliques (Bacon et Demas, 1987) de platine (Lee et al, 1993) ou de ruthénium (Trettnak et al, 1995 ; Holst et al, 1995), qui présentent des grandes durées de vie des états excités (environ 1  $\mu$ s) a été mise à profit pour développer des capteurs bon marché. Les plus couramment utilisés, dont Carraway et ses collaborateurs (1991) ont comparé les caractéristiques, sont le tris(4,7-diphényl-1,10-phénanthroline)ruthénium(II) noté Ru(Ph<sub>2</sub>phen), le tris(2,2'-dipyridyl)ruthénium(II) noté Ru(bpy) et le tris(1,10-phénanthroline)ruthénium(II) noté Ru(phen). Les capteurs en voie de développement actuellement combinent plusieurs indicateurs et permettent ainsi des mesures chimiques multi-variables (pH, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) pour les gaz du sang (Leiner, 1995) et parfois adaptées à certaines pratiques et exigences médicales comme l'endoscopie (Panato et Walt, 1995).

Le tableau 4 rassemble quelques marqueurs utilisés pour l'étude de l'inhibition de fluorescence par l'oxygène moléculaire.

### 1.3.2.2) Détermination du contenu en O<sub>2</sub> par une technique de fluorescence

#### *a) Méthode liée à la concentration en NADH*

Le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) est un transporteur d'électrons et joue un rôle important dans le transfert d'énergie du cycle des acides tricarboxyliques à la chaîne respiratoire. Une carence en oxygène induit une accumulation de NADH qui n'est alors plus réduit en NAD<sup>+</sup>. Suite à une excitation dans l'ultraviolet ( $\lambda_{exc}$  : 366 nm, McComb 1976), cette augmentation en concentration de NADH peut être mesurée puisque le NADH émet une lumière de fluorescence dans le bleu ( $\lambda_{em}$  : 460 nm) ce qui n'est pas le cas du NAD<sup>+</sup>. Cette méthode permet la mesure dans les tissus et de manière non invasive d'un taux approximatif d'oxygène, après report des résultats sur une courbe étalon (intensité de fluorescence vs [NADH]).

Cette technique a été utilisée pour apprécier de manière approximative l'hypoxie dans le cœur, les reins, le foie de rat (Pierik et al, 1991; Ince, 1994) ainsi que dans les hépatocytes de rat (Obi-Tabot et al, 1993) mais n'est cependant pas utile dans le cas d'hyperoxie ou dans les milieux biologiques contenant du NADH. En effet, cette méthode repose sur la production de NADH en absence d'oxygène, ce qui signifie qu'elle n'est pas utilisable lorsque la proportion en oxygène augmente (hypoxie-réoxygénation).



Sonde	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\tau_0$ (ns)	Milieu	$I_0/I_{\text{air}}$ $\tau_0/\tau_{\text{air}}$	Année	Référence
Pyrène	339	372	450	cyclohexane	2,7	1973	Murov
PBA	342	372	150	eau	1,6	1970	Vaughan
PBA	342					1972	Knopp
PBA	340	397				1976	Mitnick
PBA	360	473:500		greffé	3,8	1984	Wolbeis
PBA	360	360:420	250	cyclodextrine	2,6	1987	Lee
PBA	325	377:396	200	silicone	3,52	1995	Ishiji
Naphtalène	335			Toluène		1993	McLean
Ru(phen)	450	600		silicone	14,7	1991	Carraway
Ru(phen)	470	605		silicone et silice	1,23	1995	Holst
Ru(phen)	488	610		acrylamide	3,2	1995	Rosenzweig
Ru(Ph <sub>2</sub> phen)	450	600		silicone		1994	Bambot
Ru(Ph <sub>2</sub> phen)	470	610	5200	éthanol	20	1995	Hartman
Ru(bpy)	460	610	210	silicone	2	1988	Lippitsch

**Tableau 4:** Caractéristiques photophysiques des principaux composés fluorescents utilisés pour le dosage de l'oxygène rapportées dans la littérature.  $\lambda_{\text{abs}}$ ,  $\lambda_{\text{em}}$  : respectivement longueur d'onde maximale d'absorption et d'émission.  $\tau_0$  : durée de vie des états excités en absence d'oxygène.  $I_0/I_{\text{air}}$  et  $\tau_0/\tau_{\text{air}}$  : donnés ou déduits des courbes de Stern-Volmer ou de la valeur de  $K_{\text{sv}}$ . (D'après Gouin, 1996).

### b) Méthode liée à l'inhibition de fluorescence par l'oxygène

Le terme inhibition, extinction ou atténuation de fluorescence (« quenching ») est utilisé pour décrire tout processus qui aboutit à une perte partielle ou totale de la lumière émise (intensité de fluorescence). L'oxygène moléculaire est un inhibiteur de l'émission de fluorescence (intensité et durée de vie des états excités) de sondes sous l'effet d'une excitation lumineuse. Ce phénomène est presque universel pour les diverses sondes fluorescentes excitées et puissant car des détecteurs très sensibles sont nécessaires pour le suivre. Cette méthode sera développée ultérieurement dans le paragraphe I.3.4.6.

## **I.3.3) La fluorescence**

### I.3.3.1) Généralités

La fluorescence est un phénomène physique classé dans l'ensemble des phénomènes de luminescence qui englobent la photoluminescence (fluorescence, phosphorescence) et la chimiluminescence (chimiluminescence vraie, bioluminescence). Ces différents phénomènes se distinguent essentiellement par la nature de l'énergie d'excitation impliquée. La photoluminescence est un phénomène radiatif consécutif à l'excitation par une radiation lumineuse (photons de lumière visible ou ultraviolette) tandis que la chimiluminescence est un phénomène radiatif consécutif à une réaction chimique (chimiluminescence vraie) ou enzymatique (bioluminescence). Les phénomènes luminescents ont été largement étudiés et de nombreux ouvrages en font une présentation détaillée (André et al, 1992 ; Guilbault, 1973).

La fluorescence est caractérisée par des transitions électroniques entre un état singulet excité et l'état singulet fondamental ; dans ce cas, la durée de vie moyenne de l'état excité est de l'ordre de  $10^{-12}$  à  $10^{-7}$  s.

La phosphorescence se distingue de la fluorescence par le mode de désexcitation de la molécule, elle est caractérisée par des transitions électroniques entre un état triplet excité et l'état fondamental.

De plus amples détails concernant les transformations énergétiques provoquées par l'absorption de radiation sont dans l'Annexe 1.

## a) Quelques propriétés des fluorochromes utilisés

### a1) Ecart de Stokes

Un fluorochrome est une molécule dont les électrons passent après absorption d'énergie lumineuse ( $\lambda_1$ ) à un niveau d'énergie transitoirement stable. Le retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission de lumière à une longueur d'onde ( $\lambda_2$ ) toujours supérieure à  $\lambda_1$ . La différence entre la longueur d'onde maximale d'absorption et celle d'émission est appelée « écart de Stokes » et correspond à une perte d'énergie entre le phénomène d'excitation et l'émission de fluorescence. Ce phénomène est lié à la désactivation vibrationnelle par conversion interne. En pratique, cette différence doit être de 20 nm afin de pouvoir séparer efficacement la lumière incidente ( $\lambda_1$ ), de la fluorescence émise ( $\lambda_2$ ), à l'aide de miroirs dichroïques.

### a2) Coefficient d'extinction

La quantité de lumière absorbée à une longueur d'onde donnée est appelée coefficient d'extinction ou absorption molaire ( $\epsilon$ ). Sa valeur doit être la plus élevée possible afin de permettre l'excitation optimale du fluorochrome. Par exemple, la fluorescéine présente un coefficient d'absorption de  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 488 nm (notons que son absorption est maximale à 495 nm). Cette valeur représente souvent une valeur de référence pour la microscopie à fluorescence et la cytométrie. En revanche, lorsqu'un fluorochrome possède un coefficient d'extinction faible, il devra obligatoirement être présent en concentration intracellulaire significative et/ou posséder un rendement quantique de fluorescence élevé.

### a3) Rendement quantique de fluorescence

L'efficacité de l'émission de lumière fluorescente pour une molécule donnée est déterminée par le rendement quantique  $\phi$ , défini par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de molécules excitées par absorption de la lumière incidente. En absence de couplage intersystème, de conversion interne et de photoréactivité, le rendement quantique approche la valeur maximale de 1.

Si  $k_F$  représente la constante de vitesse du processus d'émission de fluorescence et si on forme  $N$  molécules excitées à l'instant  $t = 0$ ,

$$\phi_F = k_F/k$$

avec  $k$  la somme de toutes les constantes de vitesse de disparition de la molécule excitée ( $= 1/\tau$ ).

Le rendement quantique varie considérablement en fonction du type de molécule étudiée et en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, constante diélectrique, viscosité, etc.).

#### a4) Photostabilité

La photostabilité correspond au nombre d'excitations que peut subir une molécule fluorescente avant d'être dégradée. Par exemple, la fluorescéine peut subir entre  $10^4$  et  $10^5$  excitations avant d'être détruite. Cette perte de fluorescence (« fading ») pose des problèmes en microscopie à fluorescence ou confocale (Benson et al, 1985). Des milieux de montage commerciaux sont quelquefois utilisés pour limiter ces phénomènes (Vectashield; Longin et al, 1993) mais ils augmentent fréquemment la fluorescence intrinsèque (autofluorescence) des cellules et colorent le fond de la préparation.

La photodestruction de la molécule (« photobleaching ») est directement liée à la photostabilité du fluorochrome.

#### b) Interactions avec des constituants endogènes ou exogènes

##### b1) Fluorescence intrinsèque (autofluorescence)

L'autofluorescence (intrinsèque) représente souvent un facteur limitant la détectabilité de sondes fluorescentes dans la cellule. L'autofluorescence est une caractéristique normale des cellules vivantes. L'étendue et la nature de l'autofluorescence dépend de la nature de l'échantillon. Pour les cellules de mammifères, l'autofluorescence est principalement due aux coenzymes flavines (FAD et FMD, dont l'absorption et l'émission sont de 445-470 nm / 525nm), au NADH (340-360 nm / 460 nm), à la lipofuscine (490 nm / 450 nm), aux résidus d'acides aminés (200-340 nm / 360-370 nm et 455 nm) et également les protoporphyrines (425 nm / 580 nm). Ainsi dans des fibroblastes en culture (lignée 3T3), excités à 488 nm, l'autofluorescence est équivalente à 34,000 molécules de fluorescéine, ce qui est considérable.

## b2) Rôle de la concentration et effet de filtre interne

La relation entre la concentration et l'intensité de fluorescence correspond graphiquement à une courbe en cloche pour une disposition d'analyse à 90°. Il faut opérer sur des solutions de concentrations faibles car il y a auto-inhibition de la fluorescence aux fortes concentrations pour deux raisons principales a) augmentation du nombre de collisions entre les molécules qui dissipent l'énergie reçue b) formation de polymères non fluorescents.

L'épaisseur de la solution traversée par la radiation excitatrice doit être faible car la concentration optimale diminue quand l'épaisseur augmente : c'est l'effet du filtre interne, dû à l'absorption par la solution de la lumière d'excitation et de la lumière de fluorescence. Ce facteur limitant est important pour les milieux d'origine biologique.

## c) Les modes de résolution de la fluorescence

### c1) Résolution spatiale et d'ordre : anisotropie de fluorescence

Lorsqu'une population de molécules fluorescentes est éclairée par un faisceau de lumière incidente polarisée (faisceau traversant un polariseur) et de longueur d'onde appropriée, seules les molécules correctement orientées sont excitées. Si ces molécules excitées peuvent tourner rapidement et indépendamment les unes des autres sur elles-mêmes, elles prennent des orientations quelconques au cours de leur désexcitation, et la lumière émise n'a pas de plan de vibration privilégié, elle n'est pas polarisée. Au contraire, si les molécules excitées sont soumises à une certaine contrainte stéréochimique, elles tournent plus lentement sur elles-mêmes, la lumière émise par fluorescence est alors partiellement polarisée. Le degré de polarisation de fluorescence, exprimé par l'anisotropie de fluorescence ( $\langle r \rangle$ ) peut être calculé et permet d'apprécier le degré de fluidité (d'une membrane par exemple). L'aspect pratique de la polarisation de fluorescence est développé ultérieurement et la théorie de cette méthode figure dans l'Annexe 1.

### c2) Résolution statique : intensité de fluorescence

C'est une fonction du rendement quantique (cf. Annexe 1). Ainsi, à faibles concentrations le produit du rendement quantique ( $\phi$ ) et du coefficient d'absorption molaire ( $\epsilon$ ) détermine l'intensité de fluorescence d'une sonde ( $F_{\text{fluor}}$ ) selon :  $F_{\text{fluor}} = F_0 \cdot \phi \cdot \epsilon \cdot l \cdot c$ .

Les faibles concentrations en fluorophores peuvent ainsi être utilisées en relation avec le grand rendement quantique de la sonde, ce qui permet d'avoir de faibles concentrations en inhibiteur. Ainsi, pour des sondes ayant une concentration critique, il est parfois nécessaire de travailler en-dessous de cette concentration pour éviter la formation de dimères (excimères), comme dans le cas du pyrène.

c3) Résolution temporelle : durée de vie naturelle d'un état excité électronique.

Quelques fluorochromes, comme certains dérivés pyréniques, les chélates du ruthénium, lanthanides ou d'autres ont une constante de temps de déclin de fluorescence élevée (Tableau 5). Cette propriété a permis de développer la fluorimétrie à résolution temporelle (time-resolved fluorescence) qui mesure des valeurs de durée de vie des états excités précurseurs de la fluorescence ( $\tau$ , noté *durée de vie* dans le reste du texte).

La durée de vie à l'état excité peut être définie comme le temps moyen pendant lequel le fluorochrome reste à l'état excité avant de revenir à l'état fondamental (avec émission de fluorescence). L'intensité  $F$  de l'émission suit une loi du type :

$$F \approx e^{-t/\tau} = e^{-kt}$$

Si les molécules excitées électroniquement peuvent être considérées comme isolées,  $\tau$  est dite durée de vie naturelle.

Ces données peuvent révéler la fréquence de collisions possibles avec des agents inhibiteurs (tel l' $O_2$ ), le taux d'énergie. Les durées de vie de fluorescence sont très courtes et leur détermination nécessite la mise en oeuvre d'une technologie assez complexe. Les mesures de durée de vie peuvent être réalisées selon deux méthodes : le comptage monophotonique et la modulation de phase. Les aspects théoriques de ces deux méthodes sont largement développés dans l'Annexe 1.

Lanthanides d'europium, de terbium, de samarium	<b>de 10 à 1000 <math>\mu</math>s</b>
Acide pyrène butyrique (PBA)	<b>90 ns</b>
1-aminoanthracène	<b>22 ns</b>
Fluorescéine	<b>4,1 ns</b>
Coumarine 460	<b>3,3 ns</b>

**Tableau 5** : Exemples de valeurs des durées de vie de certains fluorophores:

#### d) Intensité ou durée de vie ?

Cette question est débattue depuis de nombreuses années, et les avantages et les inconvénients de ces deux approches ont été discutés par de nombreux auteurs (Lippitsch et al, 1988 ; Wolfbeis et al, 1991 ; Szmactinski et Lakowicz, 1995).

##### *Intensité de fluorescence* (amplitude du signal)

La mesure basée sur l'intensité de fluorescence nécessite une instrumentation assez simple comprenant essentiellement une source d'excitation (lampe, laser) et un détecteur (photomultiplicateur, CCD). Ces composants manquent de stabilité dans le temps et la détermination des intensités de fluorescence est sujette à ces fluctuations. La mesure et la correction de l'intensité de la source permettent de remédier en partie à ce problème (Treenak et al, 1995). Cette approche doit tenir compte des modifications de la concentration en sondes fluorescentes due à la photo-décomposition (photodégradation, « photobleaching »). Ce phénomène entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence émise (« fading »).

##### *Durée de vie de fluorescence* (durée du signal)

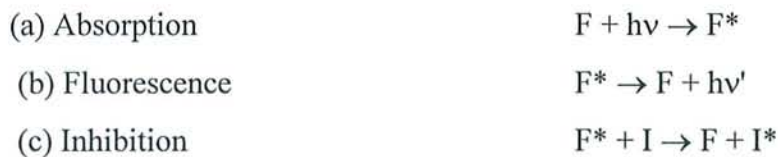
Il est possible de s'affranchir de ces difficultés majeures en mesurant la durée de vie ( $\tau$ ) plutôt que l'intensité de fluorescence ( $F$ ). Toutes les imperfections optiques du système ainsi que la photodégradation de la sonde n'ont pas d'influence sur la durée de vie de fluorescence. En effet, la durée de vie dépend intrinséquement du fluorophore et de son environnement. De plus la durée de vie ne dépendant pas d'une éventuelle inhibition statique, les tracés de Stern-Volmer ( $\tau_0/\tau$  vs  $P(O_2)$ ) sont dans ce cas linéaires. Des sondes ayant de longues durées de vie sont sensibles à de très faibles concentrations en oxygène puisque les probabilités de collision sont élevées. La fluorimétrie à résolution temporelle permet de surmonter les problèmes de bruit de fond non spécifiques dus à la présence de molécules fluorescentes dans les échantillons biologiques à analyser. En revanche, face à tous ces avantages, une instrumentation plus complexe est nécessaire, même si des systèmes légers sont maintenant disponibles sur le marché (Lippitsch et al, 1996).

### I.3.4) Phénomènes d'inhibition de la fluorescence

#### I.3.4.1) Généralités

Tout processus qui aboutit à une perte partielle ou totale de la lumière émise (intensité de fluorescence) résulte d'un phénomène d'inhibition, d'extinction ou d'atténuation de la fluorescence. Les principaux processus de relaxation de l'état excité ( $F^*$ ) sont : la fluorescence, les transitions internes non radiatives, l'inhibition par une molécule extérieure. En fait des phénomènes très différents sont regroupés sous ce terme.

Le processus complet peut être résumé par les équations suivantes :



Il existe deux types d'inhibition (statique et dynamique) qui nécessitent tous deux un contact moléculaire entre le fluorophore et l'inhibiteur. Ces deux processus sont décrits dans l'Annexe 1. Dans les deux cas, la valeur du rendement quantique va décroître et la fluorescence sera très faible, voire non détectable, ce qui nécessite l'emploi d'appareillage très sensible.

#### I.3.4.2) Inhibition de type statique

Elle correspond à la formation d'un complexe non fluorescent entre le fluorochrome et la molécule atténuatrice (inhibiteur). Après absorption de la lumière, le complexe retourne immédiatement à l'état fondamental sans émission de photons.

#### I.3.4.3) Inhibition de type dynamique

L'inhibiteur doit diffuser vers le fluorochrome alors que celui-ci est à l'état excité. Après contact, le fluorophore retourne à l'état fondamental sans émission de photons. Ce type d'inhibition dynamique dépend essentiellement de la diffusion. En effet, l'efficacité de



l'inhibition est d'autant plus importante que la diffusion des molécules est facilitée, elle est donc fonction de l'environnement des sondes (température, viscosité, etc.).

#### 1.3.4.4) Transfert d'énergie

Le transfert d'énergie à distance est un cas particulier d'inhibition de fluorescence. Dans ce phénomène, il n'est pas nécessaire que le fluorophore (donneur d'énergie) et l'inhibiteur (accepteur d'énergie) soient en contact. Cependant la distance  $R$  entre les deux molécules est un paramètre critique puisque l'efficacité de ce phénomène de transfert d'énergie est proportionnelle à  $R^{-6}$ . Par conséquent, une petite variation de la distance qui sépare le donneur d'énergie de l'accepteur conduit à une très forte variation de l'efficacité du phénomène. Pour obtenir une efficacité maximale, le calcul montre que la distance  $R$  doit être comprise entre 30 et 60 Å. D'autre part, le processus de transfert d'énergie ne peut avoir lieu que si l'énergie perdue de la désexcitation du donneur ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) correspond à l'énergie nécessaire pour faire passer l'accepteur du niveau fondamental à un niveau excité. En d'autres termes, le spectre d'absorption de l'inhibiteur doit chevaucher le spectre d'émission du fluorophore, ce qui est le cas entre les dérivés pyréniques et l'hémoglobine pour une distance de Förster proche de 43 Å (Eisinger et Flores, 1986).

#### 1.3.4.5) Les inhibiteurs de fluorescence

Un phénomène d'atténuation passive peut être observé lorsque des cellules sont incubées dans certains milieux de culture (M199, RPMI 1640, DMEM...) et il pourra être évité par l'emploi de milieu salin tamponné (PBS). De même, une quantité importante de fluorochrome incorporée dans la cellule induit une dimérisation ou une agrégation des molécules de fluorochromes en composés non fluorescents et/ou présentant un déplacement de leur spectre d'émission. C'est le cas des dérivés pyréniques avec l'apparition d'un pic dû à la présence de dimères de pyrène (excimères).

Un certain nombre de substances peuvent agir en tant qu'inhibiteurs de fluorescence. Certaines sont plus spécifiques, comme les amines aromatiques et aliphatiques qui n'inhibent efficacement que les hydrocarbures aromatiques. Parmi les inhibiteurs collisionnels, on retrouve le peroxyde d'hydrogène, l'acrylamide, l'iodure, le bromure et certaines oléfines. En revanche, la molécule la plus utilisée est représentée par la molécule d' $O_2$ , capable d'inhiber la plupart des fluorophores.

#### 1.3.4.6) Inhibition de fluorescence par l'oxygène

Le phénomène d'inhibition de la fluorescence par un inhibiteur, en ce qui nous concerne, l'oxygène moléculaire, est de type collisionnel. Il obéit à l'équation décrite par Stern-Volmer et est décrit dans la partie "Matériels et Méthodes" de l'article 3. Dans l'Annexe 1, figurent les bases théoriques sur lesquelles sont établies les équations dérivées de Stern-Volmer.

Nous décrivons donc brièvement les équations de base qui régissent ce phénomène.

L'inhibition de type collisionnel est décrite par :

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [O_2]$$

avec  $F_0/F$  le rapport des intensités de fluorescence d'un fluorophore excité respectivement en absence ( $F_0$ ) et en présence ( $F$ ) d'oxygène moléculaire, et  $K_{sv}$  la constante d'inhibition de Stern-Volmer.

De même,

$$\tau_0/\tau = 1 + K_d [O_2] \text{ et } K_d = \tau_0 \cdot k_q \cdot \gamma_0$$

avec  $\tau_0/\tau$  le rapport des durées de vie des états excités d'un fluorophore respectivement en absence ( $\tau_0$ ) et en présence ( $\tau$ ) d'oxygène moléculaire,  $K_d$  la constante d'inhibition dynamique,  $k_q$  la constante bimoléculaire et  $\gamma_0$  l'efficacité du processus. La constante  $k_q$  représente la fréquence de collision entre le fluorophore activé et les molécules d'oxygène et renseigne sur l'accessibilité de la sonde à l'oxygène c'est-à-dire sur sa diffusion. Cet aspect est développé dans la partie "Matériels et Méthodes" de l'article 4.

Dans notre cas, le processus d'inhibition du monomère du pyrène par l'oxygène est efficace (100 %) et de type purement collisionnel (Birks, 1970), mais doit être vérifié en présence d'autres inhibiteurs potentiels.

Au niveau théorique, pour  $K_{sv} = K_d$ , on trouve :

$$F_0/F = \tau_0/\tau$$

Comme nous l'avons présenté, deux modes d'inhibition agissent pour un même fluorophore, l'inhibition statique et l'inhibition dynamique. On détermine le type d'inhibition par l'écart à la linéarité observé dans la représentation expérimentale dite de Stern-Volmer :  $F_0 / F$  en fonction de  $[O_2]$ . La constante d'inhibition statique  $K_s$  est ainsi définie par différence des constantes  $K_{sv}$  et  $K_d$  (hypothèse la plus couramment admise).

### **I.3.5) Détermination des paramètres liés à la diffusion de l'oxygène**

#### I.3.5.1) Généralités

Durant l'existence de l'état excité du fluorophore, la molécule d'oxygène a en théorie le temps d'atteindre tous les compartiments de la membrane. Si ce n'est pas le cas, cela signifie que l'oxygène a été retardé au niveau d'un compartiment de la membrane et / ou que la sonde est "protégée" de l'inhibition de fluorescence. L'inhibition de fluorescence est un processus de proximité réduite vis-à-vis de la sonde et une sphère d'action dans laquelle la probabilité d'inhibition maximale peut être définie (Carrero et al, 1995). Il est connu depuis longtemps que le processus d'inhibition du monomère du pyrène par l'oxygène est de type purement collisionnel donc dynamique (Birks, 1970). Son efficacité (proche de 100 %) reflète la diffusivité de l'oxygène dans un système homogène idéal, c'est-à-dire l'accessibilité du fluorophore à l'oxygène. Ainsi le processus de diffusion de l'oxygène dans un système hétérogène peut être évalué par la détermination des constantes d'inhibition.

#### I.3.5.2) Constante bimoléculaire $k_q$ et diffusivité de l'oxygène

Dans le cas d'un système complexe (hétérogène comme une membrane biologique) la diffusivité de l'oxygène diminue avec la présence d'obstacles (Baros et al, 1991) et l'accessibilité de la sonde à l'oxygène ( $k_q$ ) pourra être évaluée à partir des valeurs des durées de vie des états excités. La détermination de la constante d'inhibition bimoléculaire  $k_q$  n'est utilisable que si la solubilité de l'oxygène est constante dans les différents compartiments membranaires traversés. Les valeurs de  $k_q$  reflètent une accessibilité apparente liée à un processus d'inhibition de fluorescence des fluorophores selon la solubilité de l'oxygène dans les différentes phases

membranaires. L'évolution des valeurs caractéristiques de  $k_q$  de la sonde pour l'oxygène permet d'interpréter le phénomène de diffusion.

### I.3.5.3) Coefficient de diffusion de l'oxygène

Si l'on dissout un fluorophore dont l'émission de fluorescence peut être affectée par l'oxygène avec une vitesse limitée par les processus de transport, il devient possible de déterminer un coefficient de diffusion de l'oxygène (exprimé en  $\text{cm}^2/\text{s}$ ). La réaction de la sonde avec l'oxygène dépend de la fluidité de l'environnement : plus un milieu est fluide, plus la vitesse de transport relatif de l'oxygène vers le fluorophore devient élevée et plus l'inhibition est importante.

#### a) Equation de Von Smoluchowski

##### Diffusion dans un milieu constitué de phospholipides purs :

Une diminution de l'intensité de fluorescence et des durées de vie des états excités précurseurs de la fluorescence sont observés en présence d'oxygène.

Si  $\tau_0 / \tau$  représente la durée de vie de l'état excité en absence d'oxygène et  $\tau$  en présence d'oxygène, la diffusion dans un milieu fluide est définie comme :

$$\tau_0 / \tau = 1 + 4.\pi.N.\sigma.D. \tau_0$$

où les symboles suivants correspondent à :

N : Nombre d'Avogadro.

$\sigma$  : Distance de collision pour une réaction dont la cinétique est diffusionnelle.

D : Coefficient de diffusion moyen.

De même, dans un milieu visqueux, la constante apparente de réaction devient (André et al, 1983) :

$$K_a(t) = 2.\pi.N.\sigma'.D.F [1 + 2.\sigma' / (\pi.D.t)^{1/2}]$$

où les symboles suivants correspondent à :

$\sigma'$  : Distance critique de réaction

F : Facteur d'amplification

En présence d'obstacles, c'est-à-dire lorsque des protéines sont présentes dans la membrane, les mouvements de « contournement » qui peuvent intervenir contribuent à ralentir la cinétique de réaction entre la sonde et l'oxygène, ce qui entache la valeur de D d'erreurs par défaut. Sans prendre en compte, les coefficients de diffusion de chaque composante, ni les interactions au voisinage des protéines, la constante apparente de réaction approchée devient :

$$\langle Ka(t) \rangle \sim 2.\pi.N.D. [\langle a \rangle + \sigma' / (\pi.D.t)^{1/2}]$$

où les symboles suivants correspondent à :

a : coefficient de calcul entre 0 et 0,5 selon la surface globale occupée par les protéines.

Dans le cas du pyrène :  $Ka = 2.\pi.N.D. [\langle a \rangle + \sigma' / (\pi.D.t)^{1/2}]^2$  soit

$$\tau_0 / \tau = 1 + Ka(\infty) . [1 + 2.\sigma' / (D. \tau_0)^{1/2}]$$

soit  $D = 1 \pm 0,5.10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  dans la membrane d'érythrocytes (Eisinger et Flores, 1986 ; Galla et Sackmann, 1974, Vanderkooi et Callis, 1974). Ces formules sont utilisées plus couramment pour déterminer les valeurs des coefficients de diffusion de grosses molécules, comme dans le cas du pyrène pour lequel le diamètre d'interaction dans la réaction de formation d'excimères intermoléculaires a été estimée à  $3 \pm 1 \text{ \AA}$  (Dembo et al, 1979).

En fait, d'après l'équation de Von Smoluchowski (1917) sous sa forme la plus utilisée, la constante de réaction bimoléculaire (Lenaz, 1987) pour deux molécules sphériques est :

$$k = 4.\pi.D.r$$

où les symboles suivants correspondent à :

D : la somme des coefficients de diffusion

$r$  : la somme des rayons des deux molécules.

b) Equation de Stokes-Einstein

Dans le cas d'une particule sphérique de rayon  $r$  dans un milieu de viscosité  $\eta$  l'équation de Stokes-Einstein permet d'accéder à la valeur du coefficient de diffusion selon :

$$D = K.T. / 6.\pi.\eta.r$$

avec  $D = K.T / f$  où  $K$  représente la constante de Boltzmann,  $f$  le coefficient de friction et  $T$  la température absolue. Appliqué à la théorie de la diffusion en solution (Sutherland, 1905), le coefficient de diffusion d'un soluté sphérique  $A$  dans un solvant  $B$  sous la condition que le rayon de  $A$  soit très petit par rapport à celui de  $B$  est donné par :

$$D_{AB} = KT / 4.\pi.r_A.\eta_B.$$

Connaissant le rayon de van der Waals de la molécule d'oxygène (1,4 Å) Uchida et al, 1992, ont déterminé la relation entre  $Kq$  ( $F_0 / F = 1 + Kq. PO_2$ ) et  $T / \eta_B$  à différentes températures comme  $T / \eta = (Kq.10^3 - 0,347) / 0,0995$ . Cependant cette équation n'est valable que pour l'eau et non pour les milieux hétérogènes complexes. Les facteurs limitants de cette équation sont le rayon  $r$  et la viscosité  $\eta$  qui doivent être connus. De plus l'expression de  $D$  en  $cm^2 / sec$  traduit un processus de diffusion en trois dimensions ( $cm^3 / sec$ ) comme le décrit Owen, 1975.

c) Equation de Einstein-Smoluchowski

A partir des deux équations précédentes, et selon les précautions énoncées par Osborn et Porter, 1965 et Lakowicz et Weber, 1973, la constante d'inhibition de fluorescence  $k$  est reliée à la constante de diffusion selon :

$$k = 4.\pi.R.D.N'$$

avec  $N'$  le Nombre d'Avogadro / 1000,  $R$  la somme des rayons moléculaires des espèces en présence et  $D$  la somme des coefficients de diffusion des espèces en présence. En postulant que le coefficient de diffusion de la sonde est négligeable par rapport à celui de l'oxygène c'est-à-dire

$D = D_{O_2}$  et que  $R$  est approximé à  $6.10^{-8}$  cm, la valeur de  $DO_2$  serait de  $2,2.10^{-5}$  cm<sup>2</sup> / sec dans la membrane d'érythrocyte à 25 °C (Fischkoff et Vanderkooi, 1975).

Cependant ces calculs souffrent de nombreuses approximations qui concernent :

- la concentration en oxygène et le coefficient de partition de l'oxygène dans la membrane
- la distance critique entre les espèces réagissantes (oxygène et sonde)
- la constante de diffusion de la sonde qui est considérée comme négligeable
- une mesure unique du coefficient de diffusion de l'oxygène qui devrait comprendre une composante latérale et une composante transversale. Le déclin mono-exponentiel de la fluorescence de la sonde confirmerait que la diffusion de l'oxygène est isotrope.

Le calcul du coefficient de diffusion globale de l'oxygène (latéral et transversal) à partir de la valeur de  $kq$  nécessite de connaître la concentration précise en oxygène dans chaque compartiment membranaire. Cependant, la détermination du coefficient de diffusion se révèle délicat voire imprécis car la variation de la solubilité de l'oxygène (et donc sa concentration) dans ces différentes phases n'est pas quantifiable. Les résultats de la littérature sont le plus souvent fondés sur des valeurs calculées à partir des tables de solubilité de l'oxygène dans les milieux aqueux, ce qui est très approximatif. De même, le coefficient de distribution de l'oxygène au sein des divers compartiments biologiques membranaires est approximé : 4,4 pour la distribution eau/membrane (Battino et al, 1968), ce qui est très relatif. Les caractéristiques physiques des sondes sont maintenant bien précisées, par exemple l'acide pyrène butyrique décrit dans l'article de Vaughan et Weber, 1970 ; longueur :  $7,08.10^{-8}$  cm, largeur :  $4,95.10^{-8}$  cm, rayon :  $4,48.10^{-8}$  cm, masse molaire : 288,  $\epsilon$  :  $4.10^4$  à 343 nm. Ce n'est pas le cas des valeurs des coefficients de partition de l'oxygène et de sa solubilité dans les milieux hétérogènes complexes. De plus, les équations décrites concernent des molécules sphériques dans des milieux homogènes et non des milieux hétérogènes complexes. On parlera plutôt d'un coefficient de diffusion-solubilité de l'oxygène (Windrem et Piachy, 1980 ; McCabe, 1986).

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi de ne pas exprimer le phénomène de diffusion de l'oxygène par un coefficient de diffusion global, mais uniquement par les valeurs des constantes d'inhibition de fluorescence qui ne sont pas affectées des approximations dues aux calculs.

*DEUXIEME PARTIE*

*Matériels et Méthodes*



## **II.1) MATERIELS D'ORIGINE BIOLOGIQUE**

### **II.1.1) Hématies**

Des hématies de donneurs sains volontaires prélevées sur anti-coagulant ACD (Etablissement de Transfusion Sanguine de Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les Nancy, France) sont lavées 3 fois avec un tampon phosphate isotonique (PBS) pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mOsm). Après une étape d'incorporation de différentes quantités d'hémisuccinate de cholestérol (noté aussi cholestérol dans le reste du texte) ou de glutaraldéhyde, une partie de la suspension est écartée pour permettre de réaliser des mesures de fragilité osmotique et déformabilité des globules rouges. Sur la fraction écartée, les membranes d'érythrocytes sont préparées par choc osmotique. La quantité totale d'hémisuccinate de cholestérol incorporé dans la membrane après extraction est obtenue par une méthode colorimétrique à partir d'une courbe étalon d'hémisuccinate de cholestérol dans l'éthanol. La concentration en cholestérol dans la membrane est exprimée par le rapport cholestérol/protéine (C/Pt). Parallèlement aux méthodes rhéologiques traditionnelles (résistance à l'hémolyse et déformabilité), nous avons utilisé une technique de polarisation de fluorescence (fluidité membranaire) en vue d'apprécier les effets du cholestérol et du glutaraldéhyde sur la fluidité membranaire. Les influences du cholestérol et du glutaraldéhyde sur le phénomène de diffusion de l'oxygène dans la membrane érythrocytaire ont ensuite été abordées.

### **II.1.2) Plasma**

Nous avons utilisé des plasmas de donneurs volontaires sains (Etablissement de Transfusion Sanguine de Nancy-Brabois, Vandoeuvre-les Nancy, France) ainsi que des échantillons prélevés sur anti-coagulant EDTA provenant de patients (macroglobulinémie de Waldenström ou de Kahler) présentant en outre une hyperviscosité. Il existe chez ces patients une anomalie du taux d'IgM ou d'IgG (ou IgA) monoclonales sériques. Tout d'abord, nous avons mesuré les valeurs des viscosités. Nous avons ensuite abordé la diffusion de l'oxygène au sein de ces solutions. La sonde fluorescente sensible à la PO<sub>2</sub> était soit directement ajoutée au plasma, soit internalisée dans un film recouvert d'une monocouche de cellules endothéliales en culture sur laquelle était déposé le plasma. Parallèlement, le même type d'expériences a été réalisé pour des

solutions de PBS contenant différentes concentrations de glycérol pour apprécier l'influence de la viscosité d'une solution sur le phénomène d'inhibition de fluorescence.

### **II.1.3) Cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales utilisées dans notre étude (notées CE dans le reste du texte) ont été aimablement cédées par Monsieur le Professeur Boisseau (Laboratoire Universitaire d'Hématologie, groupe d'étude endothélium, ischémie et thrombose, Université de Bordeaux II, 33076 Bordeaux). Il s'agit d'une souche humaine [ECV 304 (ATCC)] spontanément transformée chez un nouveau-né japonais.

Ce sont des cellules adhérentes au support par une membrane basale. L'examen morphologique au microscope optique (lumière transmise) des cellules endothéliales à confluence met en évidence l'aspect en "pavés de chaussée" caractéristique des cellules endothéliales. Nous avons étudié l'influence de l'incorporation de cholestérol sur une monocouche de cellules endothéliales en culture, plus particulièrement au niveau de la fluidité membranaire et de la diffusibilité de l'oxygène.

#### **II.1.3.1) Culture cellulaire**

Les CE sont cultivées dans un milieu de culture liquide IM199 (réf. 22340-020, GibcoBRL, distribué par Life Technologies Sarl, Cergy Pontoise, France) complété en L-glutamine, sels d'earle et rouge de phénol. Le milieu de base, IM199 contient notamment des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques, des sels minéraux, des vitamines et du glucose.

On additionne au milieu de base des additifs filtrés (0,22 µm Minisart, Polylabo, Strasbourg, France) :

\* des antibiotiques :

Pénicilline	5000 IU/ml (réf. 15070, Life Technologies Sarl, Cergy Pontoise)	1 %
Streptomycine	5000 IU/ml (réf. 15070, Life Technologies)	1 %

\* un antifongique :

Fugizone	250 µg/mL (réf : 15290, Life Technologies Sarl)	0,06 %.
----------	---	---------

\* un système tampon :  $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ , HEPES 1 M (acide [(hydroxy-2-éthyl)-4 pipérazine]-1-éthane sulfonique) (réf. 15630, Life Technologies Sarl). Le pH du milieu est ajusté à pH 7,4 par addition de  $\text{NaHCO}_3$  le cas échéant.

\* du sérum de veau foetal (SVF) (réf. P30-1801, Dominique Dutscher, France) 10 % v/v. Il est préalablement décongelé ; décomplémenté à 56 °C pendant 30 min. Les lots de SVF ne présentant pas une activité biologique constante, le lot utilisé n°P972201 a été préalablement "testé" pour être sélectionné.

### II.1.3.2) Support de cultures « *in vitro* »

Les matériels utilisés comme support de culture sont les suivants :

- boîte de culture (25 ou 75 cm<sup>3</sup>, Costar, Dutscher, France)
- boîte de Pétri (Costar, Dutscher, France)
- lamelles couvre-objet, Ø 40 mm (réf. 79726, Polylabo, Paris, France)

### II.1.3.3) Entretien de la culture

Le milieu de culture est écarté et les cellules sont lavées 3 fois en ajoutant 7 mL de milieu isotonique (PBS, milieu sans  $\text{Ca}^{++}$ , ni  $\text{Mg}^{++}$ ). Ce lavage permet d'une part d'éliminer le sérum qui inhibe l'activité enzymatique de la trypsine, et d'autre part de libérer des ions  $\text{Ca}^{++}$  qui secondairement faciliteront l'adhésion des cellules. La solution de trypsine/EDTA, filtrée sur 0,22 µm est ajoutée (2 mL) au milieu. Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope. L'action enzymatique de la trypsine est alors stoppée par effet de dilution en ajoutant 10 mL de milieu de culture IM199. Cette suspension cellulaire est transvasée dans des tubes stériles en prenant soin de remettre les cellules en suspension. Une centrifugation à 1200 t/min pendant 10 min permet d'éliminer le surnageant et de remettre le culot en suspension dans 5 mL de milieu de culture IM199. Un comptage des CE et une estimation de la viabilité cellulaire sont ensuite effectués dans une cellule de Thoma afin de resuspendre la suspension cellulaire dans un volume de milieu adéquat pour obtenir une suspension cellulaire contenant 10<sup>3</sup> cellules/mL (passage). Cette suspension cellulaire dite "mère" servira à ensemercer les différents supports de culture utilisés (boîte de culture, lamelle couvre-objet) selon l'expérience envisagée.

#### Solution de trypsine/EDTA

Trypsine liquide (réf. 25050-014, Life Technologies Sarl) préparée dans une solution de :

KCl	0,4 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g/L
NaCl	6,8 g/L
Glucose	1 g/L
Rouge de phénol	0,005 g/L

Acide éthylènedinitrilotétraacétique (EDTA) (réf. K13490018, Merck)

La solution comprenant 2/3 de trypsine et 1/3 d'EDTA est préparée extemporanément, filtrée et congelée à -20 °C.

#### II.1.3.4) Concentration et viabilité cellulaire

La concentration cellulaire est évaluée par comptage des cellules présentes dans le prélèvement (100 µL), sur une cellule de Thoma.

La viabilité cellulaire est évaluée selon le test d'exclusion au bleu trypan. Les cellules ne permettant pas l'entrée du colorant sont considérées comme vivantes. La viabilité est déterminée par le pourcentage des cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules.

#### Réactifs et protocole :

NaCl	4,25 % (P/v)
Bleu trypan	0,2 % (P/v)

Solution extemporanée : 1 volume de la solution de NaCl + 4 volumes de la solution de bleu trypan.

A un volume de la solution de bleu trypan préparé extemporanément est additionné un volume de suspension cellulaire. Au moins trois comptages sont effectués sur chaque prélèvement.

#### II.13.5) Cultures en boîtes

Les milieux de culture sontensemencés de manière à obtenir une suspension cellulaire de  $10^5$  cellules par mL. Ils sont introduits dans des boîtes de culture de 25 ou 75 cm<sup>3</sup>.

Les boîtes préparées sont placées dans un incubateur à 37 °C dont l'atmosphère, saturée en vapeur d'eau contient 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture IM199 est changé tous les deux jours et un nouveau passage effectué tous les quatre jours.

#### II.1.3.6) Culture sur lamelles couvre-objet rondes

Les lamelles couvre-objet sont dégraissées à l'éthanol et s'incorporent dans une chambre d'analyse et d'observation en microscopie spécialement développée à cet effet permet de contrôler les différents débits et taux gazeux (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) lors des expériences nécessitant une atmosphère contrôlée (cf. plan en Annexe 4). Pourensemencer le support de culture (lamelle couvre objet Ø 40 mm, réf. 79726, Polylabo, Paris, France) 500 µL d'une suspension cellulaire de 10<sup>3</sup> cellules par mL sont déposés sur la lamelle. La lamelle est ensuite délicatement posée dans une boîte de Pétri stérile (Costar), qui une fois refermée, sera placée dans un incubateur à 37 °C, avec une atmosphère riche en vapeur d'eau et contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 15 min au repos, temps durant lequel les cellules sédimentent au centre de la lamelle, la suspension cellulaire est homogénéisée et répartie sur l'ensemble de la lamelle afin d'obtenir un tapis cellulaire régulier sur toute la surface du support de culture. Les premiers îlots endothéloïdes avec développement de la membrane basale (matrice) apparaissent une heure après l'ensemencement et 500 µL de milieu de culture sont ajoutés. Pour que le milieu de culture recouvre totalement la lamelle dans la boîte de Pétri, 3 mL de milieu sont ajoutés une heure après.

Le protocole des cellules en culture sur des lamelles recouvertes d'un gel de gélatine est décrit dans la partie II.2.10.1.b3.

## II.2) MATERIELS ET METHODES

### II.2.1) Incorporation de cholestérol

#### II.2.1.1) Principe

L'hémisuccinate de cholestérol a été utilisé à la place du cholestérol car ce produit présente une bonne miscibilité avec le cholestérol déjà présent et une meilleure solubilité que le cholestérol dans les solvants (Bach et al, 1990). Le cholestérol est un stéroïde qui s'insère dans la bicouche lipidique présentant son groupement OH à l'interface et interagissant avec les lipides avoisinants.

#### Tampon et réactifs

Tampon phosphate isotonique (PBS), pH 7,4, 300 mOsm

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Glucose	5 mM

#### Milieu d'incorporation

Polyvinyl-pyrrolidone(PVP)	3,5 % (Sigma)
Glucose	0,4 % (Sigma)
HEPES	0,8 %
"Serum albumine bovine" (BSA)	1 % (fraction V, Sigma réf. H-3375)
	Lot 54H0243

Hémisuccinate de cholestérol ("5-cholesten-3 $\beta$ -ol 3-hemisuccinate")

Sigma réf. C-6512, lot 73H5032

L'incorporation d'hémisuccinate de cholestérol est réalisée selon la procédure décrite par Shinitzky, 1979.

### II.2.1.2) Incorporation d'hémisuccinate de cholestérol dans les hématies

Des hématies de donneurs sains prélevées sur anti-coagulant EDTA sont lavées 3 fois avec un tampon PBS pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mOsm). A 2 mL d'une suspension d'érythrocytes à hématocrite 20 % sont ajoutés 20 mL de milieu d'incorporation comportant différentes concentrations en hémisuccinate de cholestérol (obtenues à partir d'une solution au 1/20 d'hémisuccinate de cholestérol solubilisé au préalable dans l'éthanol ; 0,25 mg/mL). Un témoin est réalisé dans des conditions similaires, sauf que le milieu d'incorporation est sans hémisuccinate de cholestérol avec toutefois la même proportion en éthanol. Un blanc dans du tampon phosphate permet d'évaluer l'influence de l'incubation. Après 12 h d'incubation à température ambiante, les hématies sont lavées 3 fois dans du PBS

### II.2.1.3) Incorporation d'hémisuccinate de cholestérol dans les cellules endothéliales

Des lamelles couvre-objet (Ø 40 mm) sontensemencées avec une suspension de cellules endothéliales et cultivées jusqu'à confluence. Le milieu de culture est écarté pour être remplacé par un milieu de culture enrichi ou non en cholestérol. L'hémisuccinate de cholestérol est préalablement dissous dans le milieu IM199 pour obtenir des concentrations finales de 3,42 µM, 6,84 µM et 17,11 µM. Après 4 heures d'incubation les cellules sont lavées avec du PBS puis marquées en fonction des expériences (polarisation de fluorescence ou inhibition de fluorescence par l'O<sub>2</sub>).

## **II.2.2) Fixation des hématies au glutaraldéhyde**

### Réactifs et protocole

Glutaraldéhyde	(TEBU, Versailles, France)	
Tampon Sorensen	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na	0,1 M
	PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	0,1 M
	QSP eau distillée	100 mL

Une suspension de globules rouges (0,5 mL) est incubée avec différents volumes d'une solution de glutaraldéhyde 1 % préparée dans du tampon Sorensen (pH 7,35), pour un volume final de 10 mL. Après une incubation de 30 min à 4 °C sous une agitation légère, les globules sont lavés 2 fois dans 10 mL de tampon Sorensen. Le culot est récupéré et dilué dans du PBS pour obtenir une suspension cellulaire dont l'hématocrite est de 20 %.

### **II.2.3) Mesure de la fragilité osmotique des hématies**

Le principe est de soumettre de façon continue, par dialyse, les hématies à l'action d'un milieu hypotonique décroissant (9 g/L NaCl à 0 g/L NaCl) entraînant l'hémolyse progressive des érythrocytes. Les mesures sont effectuées avec un appareil développé au laboratoire (Régulest, Florange, France ; sous licence de l'Université Henri Poincaré UHP Nancy I) par Didelon et al , 1996. Après étalonnage pour déterminer les valeurs hautes et basses de la résistivité du milieu de suspension par des électrodes, 160 µL d'une suspension d'hématies diluée au 1/40 (eau physiologique) sont injectés dans une enceinte composée d'une membrane à dialyse (SpectraPor Spectrum, seuil de coupure 10000 Daltons) plongée dans 90 mL d'eau distillée. L'hémolyse est suivie à 37 °C par une augmentation de la lumière transmise couplée à une diminution lente et progressive de la concentration saline. Un graphique représente les valeurs de transmission en fonction de la concentration saline de la solution. Un programme informatique de traitement des signaux de l'évolution de la lumière transmise en fonction du temps et de la concentration en électrolytes minéraux donne les valeurs dites «lyse initiale» calculées par ajustement à la technique de Dacie pour un seuil de transmission de 2 %.

### **II.2.4) Mesure de la déformabilité des hématies**

Le principe de la mesure de la déformabilité érythrocytaire par rétro-diffusion laser est largement développé dans l'Annexe 2. La déformabilité érythrocytaire est approchée par la mesure de l'Index d'Elongation (noté aussi EI) en fonction des contraintes tangentielles appliquées selon le principe de diffraction de la lumière par des particules (Bessis et Mohandas, 1975).

Après régulation de la température (37 °C) 2,5 mL d'une suspension homogène contenant 50 g/L de polyvinyl-pyrrolidone et 10 µL de suspension de globules rouges à hématocrite 20 % sont injectés dans l'entrefer d'un viscosimètre (LORCA, «Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser» (Hardeman et al, 1987) (Academic Medical Center 1105 AZ Amsterdam).



L'application de contraintes de cisaillement (de 0,3 à 53,65 Pa.) induit un allongement des hématies et les changements de formes des images de diffraction sont visualisés par projection sur un écran. Pour chaque valeur de la contrainte de cisaillement une caméra vidéo enregistre l'image et un programme permet le calcul de l'index d'élongation (EI) avec

$$EI = (A - B) / (A + B)$$

où A et B correspondent respectivement aux axes verticaux et horizontaux des clichés de diffraction.

### **II.2.5) Préparation des membranes d'hématies**

De nombreux protocoles ont été élaborés en vue de préparer des membranes d'érythrocytes par hémolyse (rapide ou lente) en solution hypotonique. Certains permettent d'obtenir avec un rendement assez élevé des membranes d'érythrocytes retournées (Kondo et al, 1980) ou refermées (Heven et Solomon, 1979). Nous avons choisi la méthode de Dodge et al 1963, modifiée et optimisée pour une libération maximale de l'hémoglobine résiduelle membranaire. Cette libération dépend essentiellement de la force ionique et du pH de la solution hémolysante.

#### **II.2.5.1) Tampons et solutions de lavages**

Solution physiologique :      NaCl              0,9 %

Tampon hémolyse :            NaCl              10 mM

   EDTA              1 mM

   TRIS                1mM

Solution de lavage : l'échantillon de sang est lavé 3 fois à 220 g, à +4 °C dans une solution de NaCl 9 % pour éliminer le plasma ainsi que les éléments figurés du sang tels que les leucocytes.

Le pH du tampon hémolyse est ajusté à 7,2 et l'osmolarité doit être comprise entre 10 et 30 mOsm (osmomètre Roebing).

### II.2.5.2) Hémolyse hypotonique rapide

Le culot d'hématies obtenu lors du dernier lavage est resuspendu dans du tampon hémolyse dans un volume correspondant à 10 fois le volume de sang de départ. Il est ensuite maintenu sous agitation à + 4 °C pendant 30 min, puis centrifugé à 20000 g pendant 10 min (J21, Beckman, Palo Alto, Ca, USA). Le culot de membranes obtenu est ensuite soumis à une série de lavages dans du tampon hémolyse, afin d'éliminer l'hémoglobine libérée au cours de l'hémolyse. L'opération est répétée jusqu'à obtention d'un culot de membranes parfaitement blanc, qui sera ensuite resuspendu dans du tampon hémolyse. Cette évaluation visuelle reste subjective car une petite modification de la coloration de la suspension membranaire est difficile à apprécier. Une série d'expériences montrant l'effet du nombre de lavages sur la quantité d'hémoglobine membranaire résiduelle (avec une technique modifiée de quantification mise au point au laboratoire) a été menée et est rapportée dans la partie 3. Il ressort de ces expériences que 8 lavages au moins sont nécessaires pour obtenir des fantômes d'hématies ne comportant plus d'hémoglobine résiduelle quantifiable ayant une influence significative sur les paramètres étudiés lors de nos expériences (fluidité membranaire, inhibition de fluorescence par l'oxygène). La suspension de membranes lavées est ensuite fractionnée pour les expériences de fluidité membranaire, d'inhibition de fluorescence et les dosages ultérieurs (protéines, stérols) puis conservée à -80 °C (congélateur Sanyo, Ultra Low, réf. MDF-492AT).

## **II.2.6) Mesure de la fluidité membranaire**

### II.2.6.1) Mesure des anisotropies de fluorescence

#### a) *Principe*

Les méthodes spectroscopiques d'émission moléculaire et en particulier la polarisation de fluorescence, permettent d'approcher la fluidité membranaire grâce à l'analyse de la faculté de rotation des sondes fluorescentes incorporées dans la structure membranaire. La technique de polarisation de fluorescence se révèle d'un grand intérêt dans l'étude des relations structures-fonctions des membranes biologiques. Une fois incorporés dans le système biologique, les marqueurs fluorescents traduisent les phénomènes de diffusion des lipides et/ou des protéines, et

reflètent également les interactions lipides-protéines ainsi que la cohésion membranaire (échelle locale, moléculaire).

#### b) Réactifs et sondes fluorescentes

Toutes les sondes proviennent du même fournisseur (Molecular probes, Eugene city, Oregon, USA). Le DPH et le TMA-DPH sont dissous respectivement dans du tétrahydrofurane (THF) et du N,N-diméthylformamide (N,N-DMF) à la concentration de 2 mM (solution mère).

Ces solutions sont stockées à l'obscurité à +4 °C et renouvelées tous les 15 jours. Les acides n-(9-anthroyloxy) stéariques (n = 6 et n = 12) sont dissous dans de l'éthanol à la concentration de 2 mM.

Ces solutions d'acide stéarique respectivement 6-AS et 12-AS sont stockées à l'obscurité à -20 °C et renouvelées tous les 15 jours.

Tampon phosphate (PBS) :	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
	Glucose	5 mM

Les sondes utilisées dans le cadre de cette étude et représentées sur la figure 9, ont été les suivantes :

#### 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH)

L'émission de fluorescence de cette sonde en milieu hydrophobe présente un rendement quantique élevé. Elle est par contre peu fluorescente en solution aqueuse. Cette molécule s'incorpore facilement dans les régions profondes de la membrane et le marquage est stable (Schachter et al, 1982).

#### Triméthyl ammonium 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH)

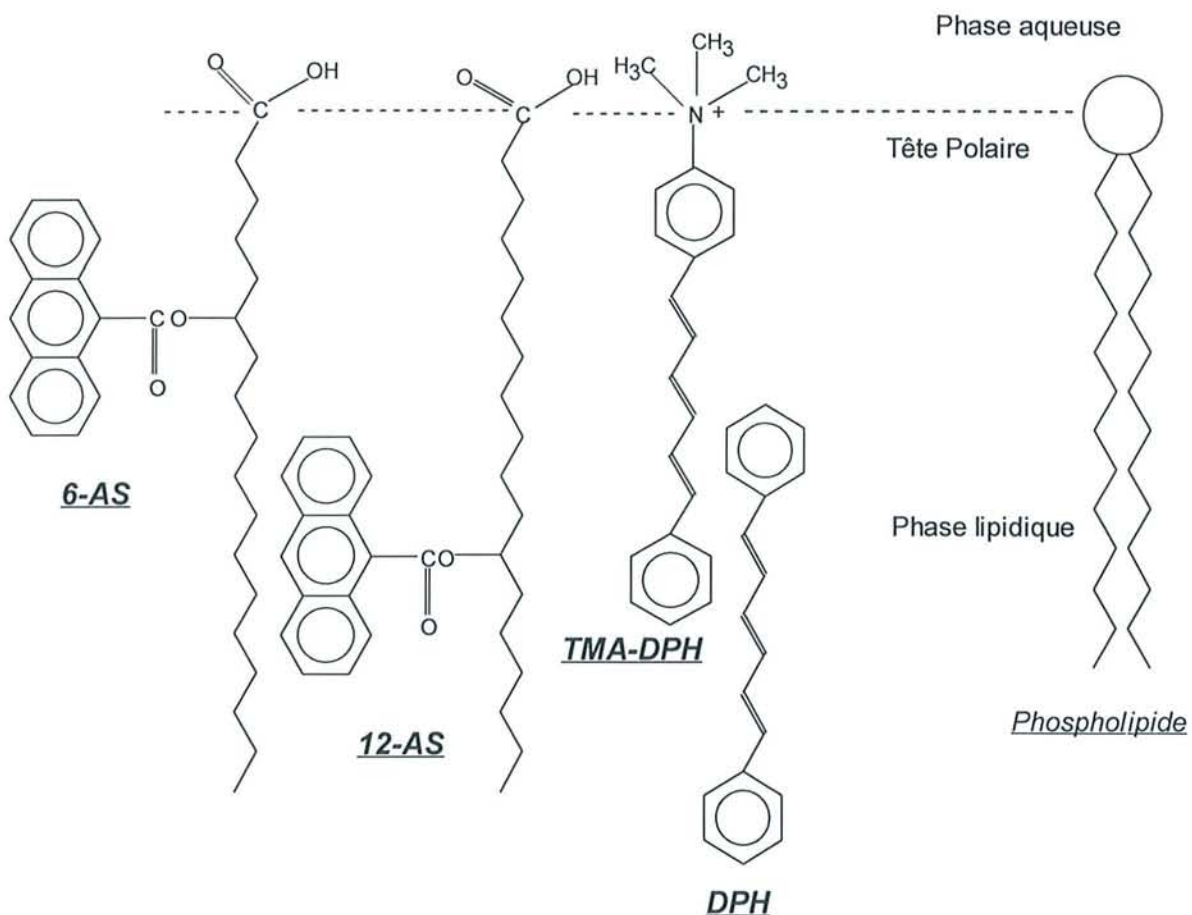
Grâce à un groupement triméthylammonium chargé, cette sonde se localise à la partie supérieure des chaînes d'acides gras des phospholipides (têtes polaires) (contrairement au DPH)

et pénètre beaucoup plus lentement à l'intérieur des cellules. Le TMA-DPH est un marqueur plus sélectif de la membrane (Illinger et al, 1995).

Acide 6-(9-anthroyloxy)stéarique (6-AS) et acide 12-(9-anthroyloxy)stéarique (12-AS)

Certains marqueurs ont l'avantage sur les précédents d'avoir une position plus définie dans les membranes. En effet, les acides gras fluorescents présentent un chromophore qui peut être greffé sur différents carbones de chaîne d'acide gras. Ainsi selon la position du chromophore sur le 6<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> carbone de la chaîne acyle, ces acides stéariques modifiés peuvent explorer des régions superficielles de la membrane (6-AS) et plus profondes (12-AS) (Thulborn et al, 1979).

Les caractéristiques spectrales des acides n-(9-anthroyloxy) stéariques n = 6 et n = 12 permettent une élimination partielle de l'effet inhibiteur de l'hémoglobine et autorisent des mesures sur des hématies intactes.



6-AS : acide 6-(9-anthroyl)stéarique; 12-AS : acide 12-(9-anthroyl)stéarique  
DPH : 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène ; TMA-DPH : triméthyl ammonium DPH

**Figure 9** : Structure chimique et localisation dans la bicouche membranaire des sondes utilisées en polarisation de fluorescence.

c) Protocole de marquage

c1) Marquage des hématies intactes avec les acides stéariques 6-AS et 12-AS

A une suspension cellulaire de  $10^6$  cellules, sont ajoutés 3  $\mu\text{L}$  de la solution de 6-AS ou de 12-AS pour une dilution finale de 2  $\mu\text{M}$ . Les échantillons marqués sont ensuite incubés 30 min à l'obscurité et à 25 °C.

Les acides n-(9-anthroyloxy) stéariques étant fluorescents en milieu aqueux, les déterminations de polarisation de fluorescence sont faites après un lavage supplémentaire, afin d'éliminer les molécules de marqueur libre dans la suspension. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 10 min à 300 g et les cellules resuspendues dans 3 mL de PBS avant d'effectuer les mesures à 25 °C.

c2) Marquage des membranes érythrocytaires avec le DPH et TMA-DPH

Les suspensions des membranes d'érythrocytes sont ajustées à une concentration de 100  $\mu\text{g}$  de protéines par mL. Pour le marquage, 0,5  $\mu\text{L}$  de la solution de marqueur sont ajoutés par mL de suspension membranaire pour obtenir une dilution finale du marqueur à  $10^{-6}$  M. L'incubation se fait à 25 °C à l'obscurité et les durées sont de 15 min pour le TMA-DPH et de 30 min pour le DPH. Les mesures d'anisotropie de fluorescence sont ensuite effectuées à + 25 °C.

c3) Marquage d'une monocouche de cellules endothéliales

Des cellules endothéliales cultivées à confluence sur des lamelles couvre-objets (cf. II.1.3.6) sont utilisées pour mesurer les valeurs d'anisotropie de fluorescence du DPH et du TMA-DPH. Pour le marquage, 3  $\mu\text{L}$  des solutions mères de DPH ou de TMA-DPH sont ajoutés à 3 mL de milieu IM199, volume nécessaire au bon recouvrement de la lamelle dans une boîte de Pétri. Après une demi-heure d'incubation, le milieu est écarté et les lamelles sont lavées en les plongeant 3 fois dans 3mL de PBS.

d) Appareillage

d1) Mesure en cuve sur des suspensions : hématies, membranes d'hématies

Les mesures sont effectuées sur un appareil prototype de polarisation de fluorescence en excitation continue de configuration « T » validé au laboratoire (Muller et al, 1986). La longueur

d'onde d'excitation ( $365 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ ) est sélectionnée par un filtre interférentiel. L'émission est mesurée à travers un filtre à bande passante centré sur  $420 \text{ nm} (\pm 20 \text{ nm})$  pour le DPH et le TMA-DPH et  $450 \text{ nm}$  pour l'étude avec les acides stéariques fluorescents (6-AS et 12-AS).

#### d2) Mesure sur lamelle : Monocouche de cellules endothéliales

Les CE, cultivées sur une lamelle couvre-objet ronde, n'ont pas subi de digestion enzymatique afin que la monocouche cellulaire (membrane basale en particulier) préserve ses caractéristiques morphologiques. Après incorporation de la sonde fluorescente dans les cellules, la lamelle couvre-objet est introduite dans une cuve en quartz. Les mesures sont effectuées sur un spectrofluorimètre SLM 48000 (SLM AMINCO Instruments, Bioritech, Chamarande, France). Un système de polariseurs placés à l'excitation permet de mesurer simultanément les composantes  $I_{\parallel}$  et  $I_{\perp}$  de l'intensité de fluorescence émise. La configuration optique (longueurs d'onde d'excitation et d'émission, filtres) est identique à celle du fluofluorimètre utilisé pour les suspensions cellulaires. Le facteur de corrélation entre les deux photomultiplicateurs (facteur G) est calculé et appliqué aux valeurs des intensités. L'appareil est couplé à un microordinateur qui calcule à partir des deux intensités les paramètres d'anisotropie et d'intensité de fluorescence.

#### II.2.6.2) Mesure de la formation d'excimères intermoléculaires de dérivés du pyrène

##### a) Principe

Des mesures de "fluidité membranaire" ont été réalisées en mettant à profit la formation d'excimères intermoléculaires (cf. II.2.10.2.2.) dont la cinétique est limitée par la diffusion l'une vers l'autre des molécules d'acide pyrène dodécanoïque (PDA) (Eisinger et al, 1986 ; Dix et Verkman, 1990 ; Gatt et Fibach, 1988; Galla et Sackmann, 1974). Cette technique ne renseigne pas directement sur la microviscosité membranaire, mais uniquement sur les processus diffusionnels des molécules de PDA, que certains auteurs relient à la "fluidité membranaire" (Caimi et al, 1993).

##### b) Mesure

Dans ces expériences, nous considérons le rapport des intensités de fluorescence des excimères ( $I_{\text{exc}}$ ) et des monomères ( $I_{\text{mono}}$ ) du PDA, mesurées respectivement à  $475 \text{ nm}$  et  $376 \text{ nm}$ . De plus amples détails figurent dans la partie "Materials and Methods" de l'article 1.

## II.2.7 Dosages biochimiques

### II.2.7.1) Protéines membranaires

La concentration en membrane érythrocytaire est déterminée par le dosage des protéines membranaires. La précision, la fiabilité et la reproductibilité de la méthode de dosage retenue conditionnent par la suite la validité des résultats expérimentaux exprimés en rapport des concentrations [cholestérol] / [protéines]. De plus les mesures de fluidité membranaire et d'inhibition de fluorescence, qui nécessitent l'incorporation d'un marqueur fluorescent dans la membrane, sont largement dépendantes du rapport [membrane] / [sonde].

Trois techniques de dosage des protéines membranaires ont été comparées :

- la méthode de Lowry (Lowry et al, 1951)
- la méthode primitive par la différence des absorbances à 260 et à 280 nm,
- la méthode à l'acide bicinchoninique («Bicinchoninic acid protein assay», kit Sigma).

Selon le standard utilisé pour établir les droites étalons avec chaque technique, les valeurs mesurées varient de manière importante. Plusieurs standards ont également été comparés avec chaque technique de dosage : HSA-globulines, HSA et BSA.

- HSA-globulines, mélange d'albumine humaine (50 g/L) et de globulines humaines (30 g/L) (réf. 540-10 Sigma).
- HSA "human serum albumine", Kit Sigma, réf. B-9643, Lot 14H8530.
- BSA" bovine serum albumine", Fraction V, Sigma, réf. A-3912, Lot 11H0103.

#### a) Méthode de Lowry

##### a1) Principe

Cette méthode consiste en un dosage colorimétrique, la coloration bleue finale étant due à une réaction se déroulant en deux étapes :

- Réaction des protéines avec le cuivre en milieu alcalin qui donne naissance à un complexe cuivrique.

- Oxydation du complexe cuivrique par le réactif de Folin-Ciocalteu. La réaction se fait essentiellement entre les résidus ayant des chaînes oxydables tels que la tyrosine ou le tryptophane et l'acide phosphomolybdique-phosphotungstique (Legler et al, 1985).

### a2) Réactifs et protocole

#### a) solution alcaline de tartrate

NaHCO <sub>3</sub>	49,0 mM	(Prolabo réf. 27778.293)
Tartrate de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	1,70 mM	(Prolabo réf. 27068.23)
NaOH	0,10 M	(Prolabo réf. 28252.293)
QSP eau distillée	1000 mL	

#### b) Solution cuivrique

CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	1,5 %	(Merck réf. 2790.0250)
---------------------------------------	-------	------------------------

#### c) Solution cuivrique alcaline préparée extemporanément

Solution alcaline de tartrate	50 mL
Solution cuivrique	1 mL

#### d) Réactif de Folin-Ciocalteu (Prolabo réf. 31360.264)

A 1 mL de suspension membranaire sont ajoutés 10 mL de solution cuivrique alcaline. Après 15 min d'incubation, 1 mL de réactif de Folin dilué au ¼ dans de l'eau distillée est ajouté au mélange. 1 mL de tampon hémolyse est traité de façon similaire et constituera le blanc de ce dosage. Au bout de 15 min, la lecture est effectuée à 750 nm sur un spectrophotomètre UV-visible (DU600 Beckman). Les valeurs d'absorbance obtenues sont rapportées à une courbe déterminée par rapport à l'albumine et qui est définie par l'équation suivante :

$$Y = 87,3 x^2 + 66,974 x - 0,567 \quad \text{avec } y : \text{la concentration en protéines}$$

et  $x$  : l'absorbance à 750 nm

#### b) Méthode à l'acide bicinchoninique (méthode BCA)

Nous avons utilisé le kit commercial "Bicinchoninic acid protein assay kit" BCA-1, Sigma N° B-9643



### b1) Principe

Il s'agit d'une méthode récente (kit de dosage commercial) qui combine la réduction de  $\text{Cu}^{++}$  par les protéines en  $\text{Cu}^+$  en milieu alcalin et la détection de  $\text{Cu}^+$  par l'acide bicinchoninique par la formation d'un complexe. Ce complexe est soluble dans l'eau et présente une forte absorption à 562 nm.

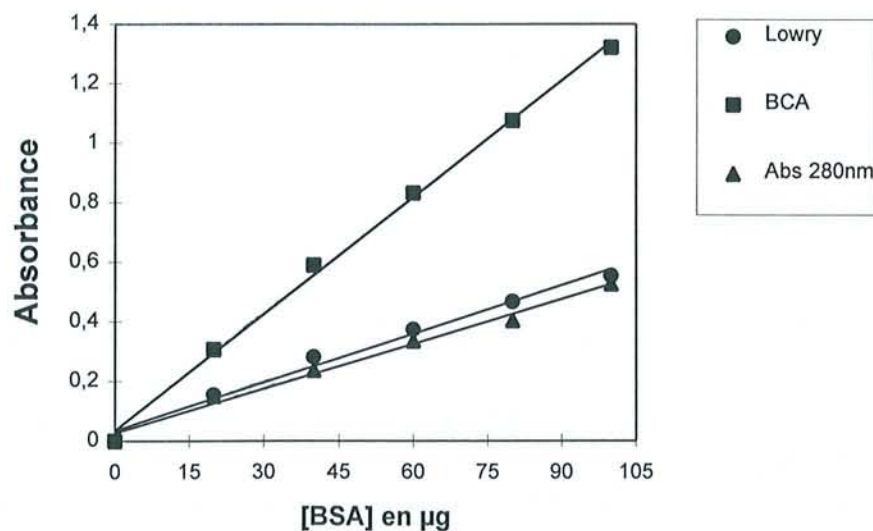
### b2) Réactifs et protocole

Solution d'acide bicinchoninic (réactif A), solution à 4 % de pentahydrate de sulfate de cuivre (II) et solution de protéine standard (HSA). Le protocole est décrit très précisément sur la notice du kit et ne comporte pas de difficultés particulières.

### c) Choix de la méthode de dosage des protéines et du standard

#### Méthode de dosage

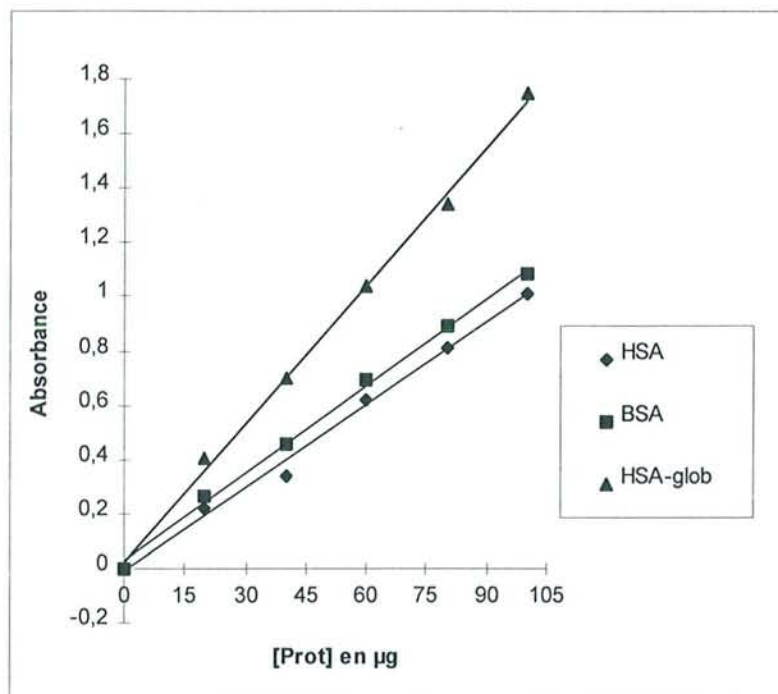
Pour un même standard (BSA), les trois méthodes de dosage des protéines membranaires ont été comparées. La figure 10 montre les droites étalon obtenues par ces dosages de référence. Il apparaît clairement que la méthode de dosage "BCA" présente une droite étalon plus appropriée à nos dosages.



**Figure 10** : Détermination des droites étalons pour chaque technique de dosage des protéines membranaires avec la "bovine serum albumine" (BSA) comme standard.

### Standard

Nous avons ensuite comparé les résultats des dosages avec la technique "BCA" de trois standards couramment utilisés pour le dosage des protéines : la BSA, la HSA et un mélange HSA-globulines humaines. Les résultats qui figurent sur la Figure 11 font état d'une meilleure linéarité de la droite étalon avec le mélange HSA-globulines humaines.



**Figure 11** : Comparaison des droites étalons de trois standards (BSA, HSA et HSA-Glob) par la technique "BCA".

#### II.2.7.2) Extraction du cholestérol membranaire

##### a) Principe

L'extraction des lipides membranaires est effectuée selon la méthode de Rose et Oklander, 1965. C'est une méthode simple, rapide et reproductible permettant l'extraction quantitative du cholestérol avec un rendement optimal. Le principe de la méthode est basé sur la combinaison d'un solvant polaire, l'isopropanol, déstabilisant les liaisons hydrogène, et d'un solvant non polaire, le chloroforme, entraînant les lipides membranaires.

##### b) Réactifs et protocole

Isopropanol	Prolabo, réf. 20848.321
Chloroforme	Prolabo, réf. 22716.321

L'extraction est faite avec 1 mL de suspension membranaire, la concentration protéique correspondante se situant toujours entre 300 et 500  $\mu\text{g}$  de protéines par mL de suspension. A 1 ml de suspension membranaire sont ajoutés 11 mL d'isopropanol. Le mélange est ensuite agité latéralement sur un plateau vibrant pendant 15 min avant d'ajouter 7 mL de chloroforme. Après une nouvelle incubation de 15 min, les extraits sont filtrés sur un filtre hydrophobe (Whatman 1 ps). L'étape de filtration permet d'éliminer les débris membranaires dénaturés par les solvants. Le traitement dans les mêmes conditions de 1 mL de tampon hémolyse permet d'obtenir un blanc. Les extraits lipidiques sont ensuite évaporés à 37 °C sous flux d'azote. L'évaporation est totale au bout de 60 à 90 min. Le résidu sec ainsi obtenu est ensuite resuspendu dans 2,5 mL de chloroforme. Ce volume est calculé de façon à obtenir des concentrations de cholestérol se situant vers le centre de la gamme étalon.

### II.2.7.3) Dosage du cholestérol

#### a) Principe

La détermination de la quantité de cholestérol membranaire a été faite par la méthode décrite par Zak et Zlatkis, 1969, utilisant l'ophtalaldéhyde. Elle est basée sur la réaction du cholestérol avec les aldéhydes aromatiques (Zlatkis, 1953). C'est une méthode sensible, permettant l'obtention d'une coloration rose stable. Elle offre de plus l'avantage d'éviter les interférences avec la bilirubine, comme c'est le cas dans la méthode de Liebermann et Burchard. D'autre part, l'ophtalaldéhyde réagissant spécifiquement avec le cholestérol, les interférences dues aux autres stérols existant dans la membrane peuvent être évitées (Zak, 1977).

#### b) Réactifs et protocole

Ophtalaldéhyde (OPT)	Sigma, réf. P1378
Acide acétique glacial	Prolabo, réf. 20104.298
Acide sulfurique	Merck, réf. K 04063331

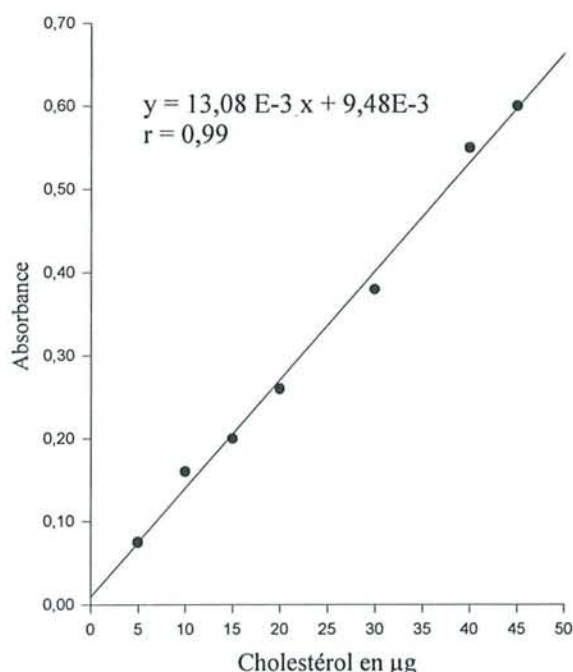
La solution d'OPT est préparée extemporanément à raison de 0,5 mg d'OPT/mL d'acide acétique.

A 250  $\mu\text{L}$  de chaque suspension chloroformique : extrait lipidique, blanc ou gamme étalon, sont ajoutés 2 mL de la solution d'OPT. Une agitation vigoureuse au vortex est

nécessaire. Après 15 min d'incubation, 1 mL d'acide sulfurique est ajouté. Le mélange est également homogénéisé vigoureusement jusqu'à obtention d'une coloration rose. La lecture de l'absorbance est effectuée à 560 nm.

### Courbe d'étalonnage

Sur la figure 12 est représentée la courbe d'étalonnage obtenue pour le dosage du cholestérol.



**Figure 12 :** Gamme étalon du cholestérol.

### II.2.7.4) Dosage de l'hémoglobine membranaire résiduelle

#### a) Principe

Les dosages d'hémoglobine se font généralement par la mesure de l'absorbance à 540 nm après transformation en cyanméthémoglobine sous l'action de ferricyanure de potassium. Cette technique se prête bien aux mesures de grandes quantités d'hémoglobine comme dans le sang total ; homme adulte 13 à 16 g/100 mL, femme adulte 11,5 à 15 g/100 mL. Pour ce dosage un kit commercial Sigma Diagnostics (total hemoglobin, réf. 525-A) a été utilisé.

De très petites quantités d'hémoglobine peuvent également être détectées par des mesures d'absorbance au niveau de la Bande de Soret (418 nm). Cette technique se prête mieux à de faibles concentrations en hémoglobine : de 0,2 à 4 µg hème/mL (Dodge et al, 1963).

Le dosage de l'hémoglobine membranaire résiduelle après hémolyse est délicat puisque porte sur de très faibles concentrations. Nous avons reporté les valeurs des absorbances à 420 nm et 540 nm pour différentes solutions de sang total après dilution (18 g/100 mL) afin d'établir une courbe d'étalonnage.

La concentration en hémoglobine membranaire résiduelle est déterminée par rapport à cette courbe d'étalonnage.

b) Réactifs et protocole

Réactif de Drabkin, Sigma, réf. 525-2	Bicarbonate de sodium	100
	Ferricyanure de potassium	20
	Cyanure de potassium	5

Hémoglobine standard, Sigma, réf. 525-18

Pour des suspensions de membranes d'érythrocyte ayant subi plusieurs étapes de centrifugation et de lavage au PBS (de 3 à 9), la quantité d'hémoglobine résiduelle a été estimée par des mesures d'absorbance à 420 nm et rapportée à une courbe étalon d'Hb pure.

II.2.7.5) Composition biochimique des plasmas humains

Les dosages biochimiques des différents plasmas prélevés chez des patients volontaires ont été réalisés au laboratoire de Chimie Hématologique de l'Etablissement de Transfusion Sanguine de Lorraine (Pr Vigneron), les immunoglobulines par néphélométrie et les protéines autres par électrophorèse.

**II.2.8.) Mesure de la viscosité des solutions de glycérol et des plasmas sanguins**

La viscosité sanguine est mesurée à l'aide d'un viscosimètre capillaire AMTEC (Sematech, Nice, France) à 37 °C. Avant chaque mesure, un étalonnage avec de l'eau distillée est réalisé. Deux cellules de détection permettent d'appréhender le temps que met la solution à tester pour parcourir la distance qui les sépare. L'appareil calcule la viscosité en centiStockes par rapport à celle de l'eau distillée (0,6961 cSt) (Expert, 1986)

## II.2.9) Etalonnage du mélangeur de gaz avec une électrode à oxygène : linéarité de la réponse

### II.2.9.1) Description des appareils

Pour les expériences nécessitant des pressions partielles en O<sub>2</sub> différentes, le mélange de gaz est distribué par deux débitmètres massiques Hastings HFM contrôlés par un régulateur de débit massique PSRCE2 (Coffret Schaeffer Technics, Nozay, France) qui comprend un potentiomètre de consigne pour chaque gaz. Un facteur de correction corrige selon la réponse des débitmètres dans les conditions normales de température et de pression : 1,02 pour l'azote et 0,97 pour l'oxygène. Pour que le mélange soit homogène malgré une petite différence des densités atomiques de l'oxygène et de l'azote (16 et 14 respectivement), le mélange est homogénéisé par bullage dans de l'eau distillée pour délivrer un mélange humidifié. Un afficheur digital délivre, pour une échelle d'affichage de 5 volts, une valeur de débit (cm<sup>3</sup>/min ou L/min). Les caractéristiques des débitmètres HFM 202 sont les suivantes :

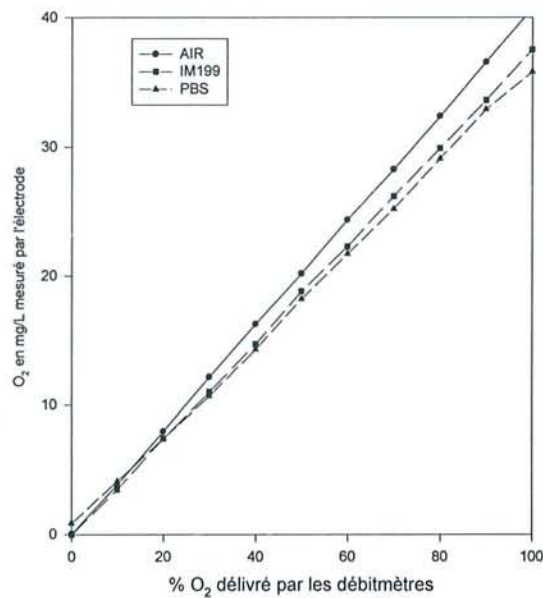
Gamme de 0 à 10 cm<sup>3</sup>/min ; Précision  $\pm 1$  % de l'échelle ; Pression 1 bar relatif  
 Pression Atmosphère ; Répétabilité  $\pm 0,2$  % de l'échelle ; Perte de charge 10 millibar  
 Taux de fuite 10<sup>-9</sup> cm<sup>3</sup>/s ; Facteur de température 0,2 %/°C (0 à 50 °C) ;  
 Signal de mesure 0 à 5 Volts continu intrinsèquement linéaire

La proportionnalité de la réponse par rapport à la quantité de gaz a été vérifiée en confrontant les valeurs des consignes imposées au régulateur des débitmètres aux valeurs délivrées par une électrode à oxygène (oxymètre Consort IP65, Turnhout, Belgique), matériel de référence. L'oxymètre et les électrodes fonctionnent selon le principe de Clark avec une cathode en platine et une anode en argent. La tension de polarisation est de 800 mV, et l'O<sub>2</sub> existant est réduit en ions OH<sup>-</sup> à la cathode. Le courant résultant de cette transformation est proportionnel à la concentration en O<sub>2</sub> dans la solution à mesurer ou gazeux, amplifié, corrigé et affiché en ppm ou mg/L d'O<sub>2</sub>.

Gamme de 0 à 60 ppm (mg/L) ; Saturation de 0 à 600% ; Température de 0 à 50°C  
 Précision 0,01 ppm/0,1 %/0,1 °C ou 1 % de la lecture ; Entrées BNC + Banane pour l'électrode à O<sub>2</sub> ; Compensation de température automatique ; Sortie digitale RS232 programmable ; Sortie analogique 0 à 2 Volts ; Affichage LCD 8 unités/caractères  
 Humidité relative 0 à 90 % (sans condensation)

### II.2.9.2) Mesure de la linéarité de la réponse des débitmètres

Une étape d'étalonnage est nécessaire car la précision des mélanges des gaz délivrés par des débitmètres massiques conditionne les résultats des expériences d'inhibition de fluorescence par l'O<sub>2</sub>. L'exactitude des valeurs des constantes d'inhibition (Ks et Kd) est donc directement liée à la précision des mélanges gazeux. A partir d'un gaz riche en N<sub>2</sub> (100 %) et par pas de 10 %, le mélange gazeux était enrichi en oxygène durant 10 minutes (bullage). Des mesures sont ensuite effectuées à l'aide de l'électrode à O<sub>2</sub> qui donne une concentration en O<sub>2</sub> (mg/L). La figure 13 montre la linéarité de la réponse en milieu gazeux (air) ou en solution dans du PBS ou du milieu de culture (IM199).



**Figure 13** : Relation entre la précision des débits délivrés par les débitmètres massiques et la concentration en O<sub>2</sub> mesurée par une électrode à oxygène.

Nous avons ainsi vérifié que les débitmètres massiques délivraient des débits en gaz de manière proportionnelle aux valeurs de consigne demandées. La linéarité de la réponse mesurée par polarographie, qui reste la méthode de référence, nous assure d'une parfaite calibration des débitmètres qui délivrent un mélange gazeux avec exactitude et précision.

De plus, cette relation permet d'exprimer les résultats aussi bien en atm<sup>-1</sup>, % ou mg/L.

## II.2.10) Expériences d'inhibition de fluorescence par l'oxygène moléculaire

### II.2.10.1) Configurations matérielles et mesures des signaux de fluorescence

Les caractéristiques matérielles et spectroscopiques des appareils utilisés sont décrits dans le tableau 6.

#### a) Mesures du signal de fluorescence dans une cuvette à circulation en quartz.

Nous utilisons des cuvettes à circulation (199QS, Hellma, France) de 3 mL qui permettent l'injection d'un mélange gazeux délivré par un mélangeur de gaz. Le gaz est injecté dans une tubulure de la cuvette et bulle par le fond de la cuvette, ce qui facilite la mise en suspension des particules contenues dans la solution et contribue à une meilleure reproductibilité des résultats.

Cette configuration a été utilisée pour les mesures des intensités de fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluoromax-2 ou Fluorolog (Spex-Jobin-Yvon) et pour la détermination des durées de vie de fluorescence aussi bien en modulation de phase (SLM 48000, Aminco) qu'en comptage monophotonique (appareil construit au DCPR).

Des mesures de déclin des intensités de fluorescence en cuvette ont également été effectuées à l'aide d'un montage développé au laboratoire et dénommé Boxcar **MC**

Ce dernier a essentiellement permis de comparer les valeurs des durées de vie déterminées sur des solutions (en cuvette) à celles obtenues dans les mêmes conditions dans une configuration microscopique Boxcar **MM**.

#### b) Mesure dans une chambre d'analyse en "configuration microscopie".

Le montage expérimental permet la capture d'images à l'aide d'une caméra CCD, ou l'acquisition d'un signal de fluorescence à l'aide d'un photomultiplicateur (schéma 1).

Une chambre d'analyse, (schémas 1 et 2 et plan en Annexe), a été conçue et réalisée par J. Didelon pour recevoir une lamelle couvre-objet. Celle-ci, d'une épaisseur de 0,17 mm respecte les recommandations liées à l'optique des objectifs et sert de support à la culture de cellules endothéliales dans le cadre des expériences d'inhibition de fluorescence par l'oxygène. Une



deuxième lamelle, des joints en silicone et deux couvercles vissés assurent l'étanchéité de la chambre.

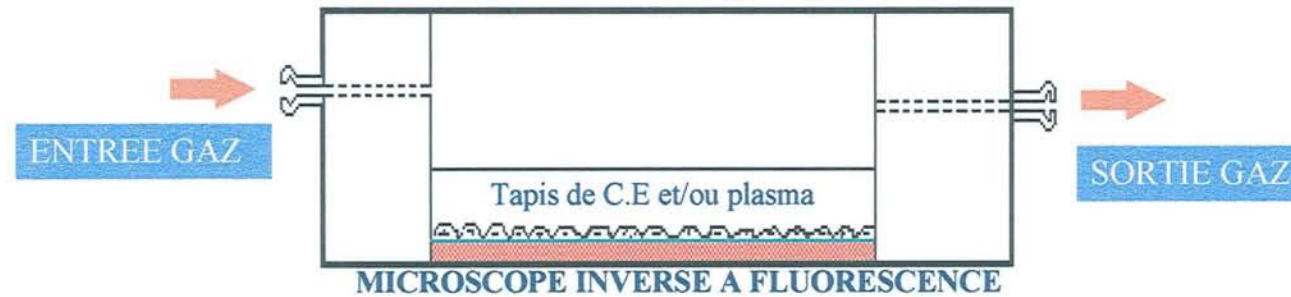
La chambre d'analyse est solidarisée à la platine d'un microscope inversé à fluorescence (Olympus, IX-70) dont les caractéristiques techniques figurent dans le tableau 6.

Différents mélanges gazeux (% O<sub>2</sub>/ % N<sub>2</sub>) humidifiés (par bullage dans de l'eau distillée) sont injectés dans la chambre d'analyse à l'aide de deux débitmètres massiques et d'un régulateur.

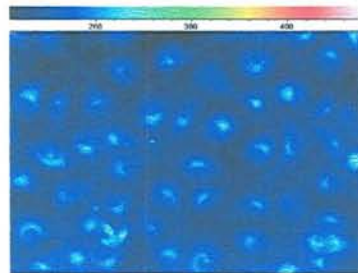
Pour chaque mélange et après 15 min d'injection très précisément, les mesures des intensités de fluorescence ou les déterminations des durées de vie de fluorescence sont effectuées.

# MICROSCOPIE A FLUORESCENCE

Chambre de mesure en atmosphère contrôlée

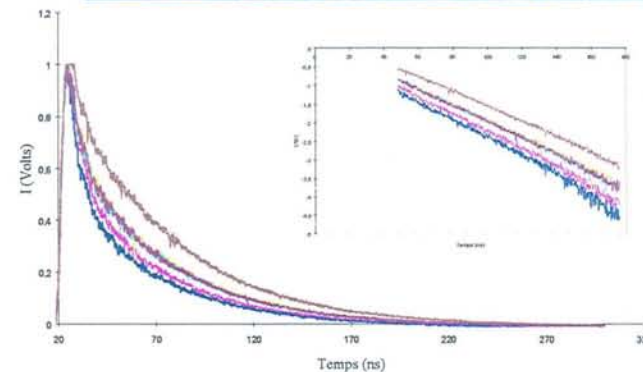


## CAMERA CCD



**1a** : Exemple d'une image de fluorescence capturée à l'aide d'une caméra CCD en "configuration microscopie" : monocouche de cellules endothéliales marquées (PBA,  $1\mu\text{M}$ ,  $20\text{ }^\circ\text{C}$ ). x20.

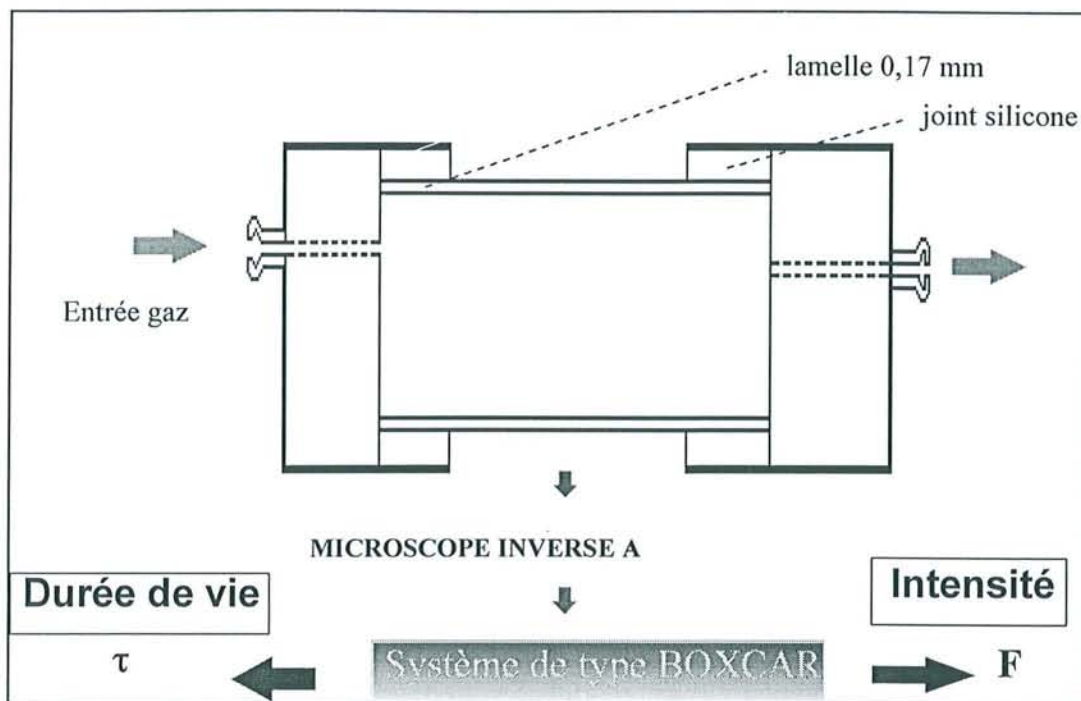
## PHOTOMULTIPLICATEUR



**1b** : Exemple de déclin des intensités de fluorescence mesurée à l'aide d'un photomultiplicateur en "configuration microscopie" marquées (PBA,  $1\mu\text{M}$ ,  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , gain : 0,460 v, fenêtre : 3).

**Schéma 1** : Mesure dans une chambre d'analyse en configuration microscopie : Capture des images (niveaux de gris) et recueil des intensités de fluorescence.





**Schéma 2** : Représentation de la chambre d'analyse utilisée en "configuration microscopie".

Selon les types d'expériences, différentes combinaisons ont été utilisées en "configuration microscopie" :

- Inhibition de fluorescence par l'oxygène des dérivés pyréniques dans les cellules endothéliales.
- Inhibition de fluorescence par l'oxygène du Ru(phen) incorporé dans un gel de gélatine.

b1) Inhibition de fluorescence par l'oxygène des dérivés pyréniques dans les cellules endothéliales en "configuration microscopie".

Une monocouche de cellules endothéliales à confluence est marquée à l'aide des sondes PBA et PDA selon un protocole décrit le chapitre "Matériels et Méthodes" de l'article 5.

b2) Inhibition de fluorescence du Ru(phen) par l'oxygène dans les cellules endothéliales en "configuration microscopie".

Une monocouche de cellules endothéliales à confluence est marquée à l'aide d'une solution de Ru(phen)  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M dans du milieu de culture IM199. Le protocole est décrit dans la partie II.2.10.2.b2.

b3) Inhibition de fluorescence du Ru(phen) par l'oxygène dans un gel de gélatine en "configuration microscopie"

Gel de gélatine : Une solution de gélatine est reconstituée à chaud par dissolution d'une poudre blanche de gélatine dans de l'eau distillée (G-1890, Lot 54H07245, type A de porc, Sigma). Une solution de Ru(phen) solubilisé dans de l'eau distillée y est incorporée. Ce mélange est ensuite stérilisé sur filtre 0,22  $\mu\text{m}$ , puis 0,5 mL sont déposés sur une lamelle couvre-objet préalablement dégraissée et stérilisée à l'éthanol. Pour le dépôt, une table plane avec niveaux de contrôle est recommandée. Après 2 heures à température ambiante, le gel est solidifié. En respectant le volume du dépôt et une répartition uniforme sur toute la surface de la lamelle, l'épaisseur du gel solidifié est de 1 mm  $\pm$  0,2.

Film de PLGA : Le PLGA nous a été aimablement confié par le Groupe Polymères & Biosystèmes (LCPM, URA CNRS 494 ENSIC, Dr R. Gref, Pr E. Dellacherie). Il s'agit d'un polymère d'acides organiques hydrophobes. Pour le dépôt du film, 0,5 mL d'une solution de PLGA, préalablement dissoute dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mg / mL) sont déposés délicatement à la surface du gel. Après évaporation du solvant (quelques min), un film légèrement blanchâtre apparaît à la surface du gel. Nous avons vérifié qu'une couche de 4 films s'avérait nécessaire pour annuler totalement l'effet de la température sur le gel et ainsi stopper la diffusion du fluorophore dans le milieu de culture.

Culture cellulaire : Une lamelle sur laquelle a été coulé un gel (recouvert d'un film de PLGA) est déposée dans une boîte de Pétri (Costar, Dutscher, France) à température ambiante durant 2 h. L'adhésion des cellules endothéliales dans un incubateur à 37 °C a lieu une heure après l'ensemencement.

Les mesures des signaux de fluorescence du Ru(Phen) sont réalisées en fonction de plusieurs paramètres :

- Influence de la concentration en gélatine dans un gel

A des gels contenant différentes concentrations en gélatine (de 2 à 8 g/L), une solution de Ru(phen) dans l'eau a été ajoutée pour obtenir une concentration finale en sonde de  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M

- Influence de la concentration en Ru(phen) dans un gel de gélatine

Différents volumes d'une solution mère en Ru(phen) sont introduits dans des gels de gélatine (6 g / L) pour des concentrations finales de :  $10^{-4}$  M ;  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M ;  $2 \cdot 10^{-4}$  M et  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M.

Pour atteindre les molécules de Ru(phen) et inhiber la fluorescence, l'oxygène doit traverser latéralement et transversalement le gel de gélatine.

- Influence de la viscosité de solutions de plasmas déposés sur un gel de gélatine

0,5 mL de plasmas provenant de patients atteints de macroglobulinémie sont délicatement déposés sur une lamelle recouverte d'un gel de gélatine (6 g/L). Les expériences sont reproduites dans les mêmes conditions mais avec du plasma de donneur sain et du PBS.

Pour atteindre les molécules de Ru(phen) incorporées dans le gel, l'oxygène doit traverser la suspension de plasmas sanguins ou de PBS.

- Influence d'une monocouche de cellules endothéliales cultivée sur un gel de gélatine

Les cellules endothéliales en culture synthétisent une membrane basale. L'emploi d'un support de culture (boîte, lamelle...) prétraité (revêtement d'un gel) n'est pas indispensable, mais facilite l'adhésion et la croissance. Dans notre cas, le gel évite le contact direct entre les cellules endothéliales et la sonde fluorescente qui est incorporée dans le gel. Les conditions d'ensemencement (concentration cellulaire) et de culture sont identiques à celles décrites dans la partie II.1.3.6, sauf que la lamelle est recouverte d'un gel de gélatine (6 g/L) et d'un film de PLGA (4 couches).

Pour atteindre les molécules de Ru(phen) incorporées dans le gel, l'oxygène doit traverser la monocouche de cellules endothéliales.

- Influence d'une monocouche de cellules endothéliales cultivée sur un gel de gélatine et recouverte de plasmas plus ou moins visqueux.

Cette expérience est réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que la précédente, et comporte une étape en plus ; 0,5 mL de solutions de plasmas sanguins ou de PBS sont déposés sur la monocouche cellulaire.

Pour atteindre les molécules de Ru(phen) situées dans le gel, l'oxygène doit traverser la suspension de plasma et la monocouche de cellules endothéliales.

## II.2.10.2) Réactifs et sondes fluorescentes

### a) Formules chimiques

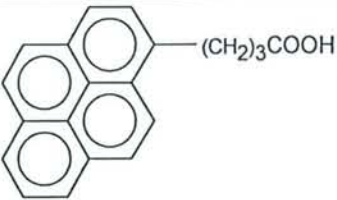
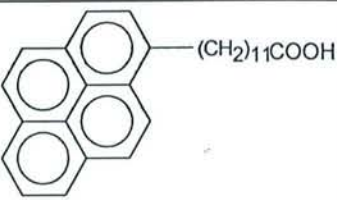
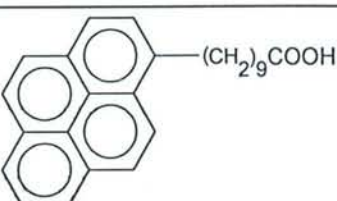
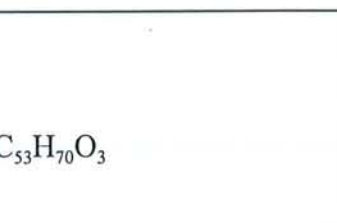

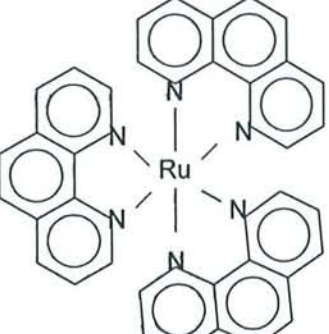
Les formules chimiques des différents composés utilisés sont présentées dans le tableau 6.

b) Concentration en sondes fluorescentes

b1) Dérivés pyréniques : PBA, PDA, P<sub>10</sub>DA, P<sub>10</sub>DA-Chol

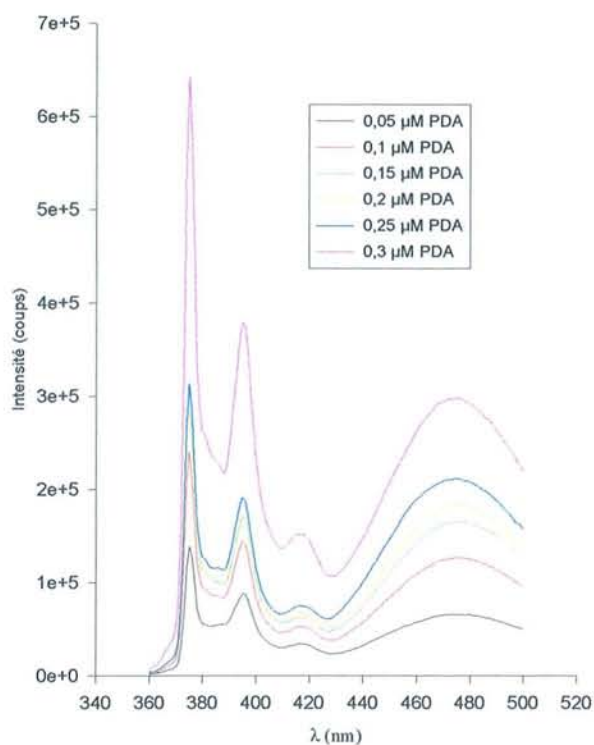
Les divers protocoles de marquage ainsi que les concentrations en sondes fluorescentes figurent dans les chapitres "Matériels et Méthodes" de la partie III.

Dans le cas des dérivés pyréniques, lorsque la concentration locale en sondes augmente au delà d'une concentration dite "concentration critique", il y a formation d'excimères intermoléculaires (Lee-Gau et Thompson, 1985 ; Vekshin, 1987 ; Dix et Verkman, 1990). Ceux-ci participent au phénomène d'inhibition de fluorescence. Un excimère est un complexe qui se forme entre une molécule excitée et une molécule de même espèce dans l'état fondamental. Ce complexe n'a d'existence que dans l'état excité et se désactive en un état répulsif qui se dissocie immédiatement en ses deux composants. La fluorescence d'excimère est très caractéristique, car elle ne présente pas de structure fine de vibration et apparaît comme une bande large. De plus, elle est perçue à une longueur d'onde plus grande que la fluorescence normale (470 nm) (Figure 14). Cette propriété a été mise à profit pour la mesure de la cinétique de formation d'excimères intermoléculaires en rapport avec la "fluidité" membranaire.

Nom	Formule chimique	Pureté	Solvants
<b>PBA</b> Acide 4-(1-pyrényl)-butyrique Molecular Probes P-32 Sigma P-1407 (Lot 32H3608)		98 %	Chloroforme Cyclohexane Diméthylformamide
<b>PDA</b> Acide 12-(1-pyrényl)-dodécanoïque Molecular Probes P-96 Sigma P-7209 (Lot 75H0575)		99 %	Chloroforme Cyclohexane Diméthylformamide
<b>P<sub>10</sub>DA</b> Acide 10-(1-pyrényl)-décanoïque Sigma P-8409 (Lot 84H4073)		96 %	Chloroforme Cyclohexane Diméthylformamide
<b>P<sub>10</sub>DA-Chol</b> Acide 10-(1-pyrényl)-10 Ketodecanoyl-cholesterol Sigma P-4025 Lot 20H4006	 $C_{53}H_{70}O_3$	95 % CLHP	Chloroforme Cyclohexane Diméthylformamide
<b>Pyrène</b> Aldrich		99 %	Chloroforme Cyclohexane Diméthylformamide
<b>Ru(phen)</b> Tris(1,10-phenantroline) ruthenium(II)chloride hydrate Aldrich 34,371-4		98 %	Méthanol Eau

**Tableau 7** : Formules chimiques des produits fluorescents utilisés pour les expériences d'inhibition de fluorescence par l'oxygène moléculaire.



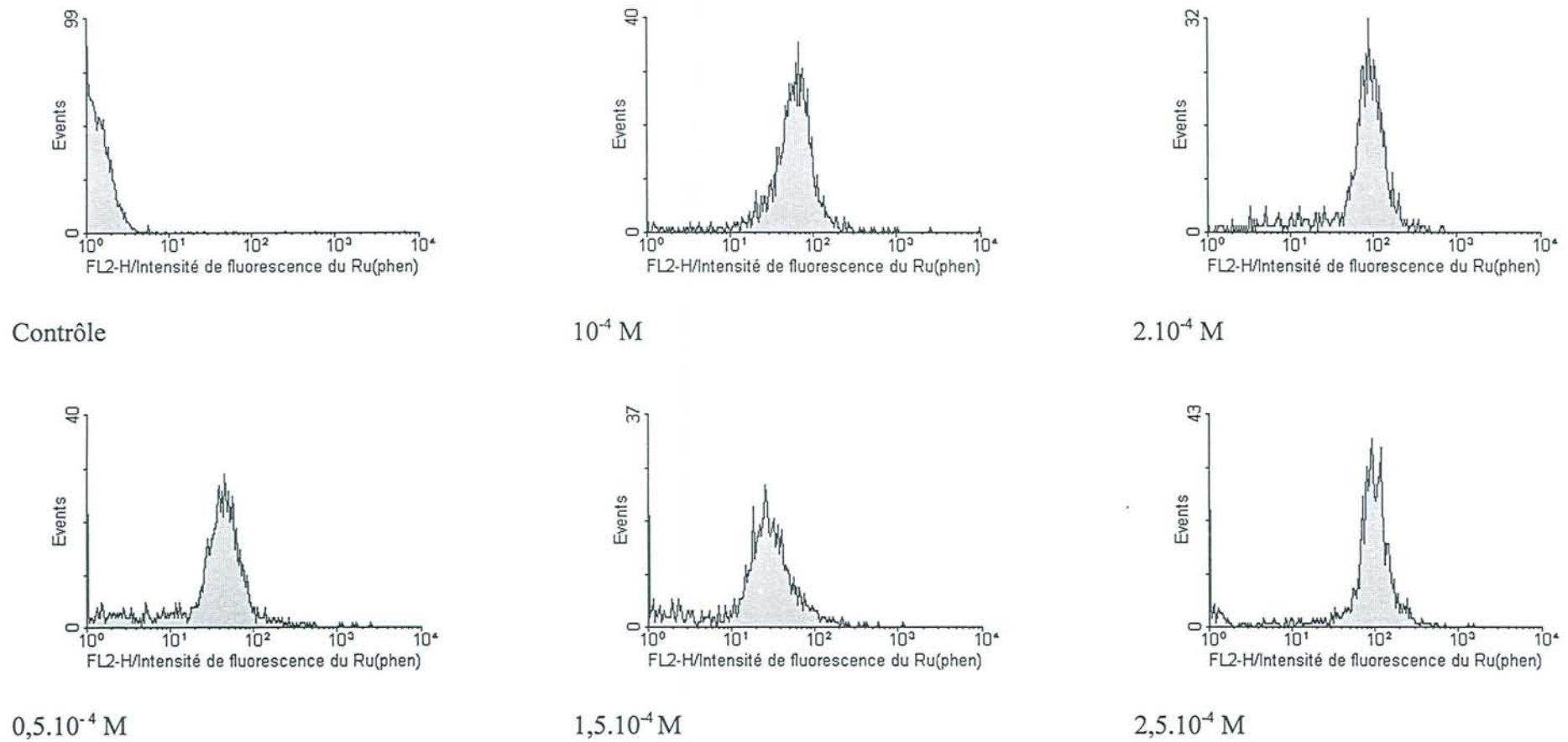


**Figure 14** : Spectres d'émission de fluorescence du PDA dans du PBS à 20 °C.

### b2) Dérivé du ruthénium : Ru(phen)

Pour déterminer la concentration en Ru(phen) pour laquelle une monocouche de cellules endothéliales serait marquée de manière optimale, nous avons conduit une étude en cytométrie en flux. Les cellules endothéliales sont cultivées sur une lamelle jusqu'à confluence. Le milieu de culture est écarté puis remplacé par 4 mL de milieu de culture contenant des quantités différentes de Ru(phen). Après 4 heures d'incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du milieu de culture IM199, puis la monocouche est détachée du support par addition d'une solution de trypsine/EDTA. Les cellules sont ensuite analysées sur un FACScan (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) utilisant un laser argon émettant à la longueur d'onde de 488 nm, ce qui excluait de réaliser le même type d'études avec des dérivés pyréniques dont l'excitation se situe dans l'UV. La fluorescence du Ru(phen) est détectée à 550 nm. L'acquisition se fait sur 10000 évènements analysés en mode logarithmique (fluorescence). Les histogrammes de distribution de la fluorescence pour différentes concentrations ( $0,5 \cdot 10^{-5}$  ;  $10^{-4}$  ;  $1,5 \cdot 10^{-4}$  ;  $2 \cdot 10^{-4}$  et  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M) de Ru(phen) sont montrés sur la figure 15. La concentration optimale en Ru(phen) pour obtenir un signal détectable de fluorescence est de  $2 \cdot 10^{-4}$  M pour une monocouche composée d'environ  $10^{+5}$  cellules endothéliales.





**Figure 15 :** Histogrammes de distribution des intensités de fluorescence des cellules endothéliales après incorporation durant 4 heures de différentes concentrations de Ru(phen).

### b3) Protocoles de marquage

Pour les travaux ayant fait l'objet d'un article, les protocoles de marquage sont décrits dans les chapitres "Matériels et Méthodes" des publications présentées dans la troisième partie "Résultats et discussions".

#### b31) Solutions de glycérol dans l'eau distillée

L'analyse du déclin des intensités de fluorescence du PBA dans des solutions de différentes viscosités (de 1 à 5,37 cSt) a été réalisée dans une cuvette en quartz (cuvette à circulation, 199QS, Hellma, Paris) à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluoromax-2 (Spex-Jobin-Yvon, Longjumeau, France). Les caractéristiques de cet appareil sont présentées dans le tableau 6. Pour le marquage, 3  $\mu$ L de PBA sont ajoutés à 3 mL de plasmas dans une cuvette pour obtenir une concentration finale en sonde de 1  $\mu$ M, afin d'éviter la formation d'excimères. Après une homogénéisation douce de la suspension pour éviter la formation de bulles, un mélange de gaz d'oxygène et d'azote est injecté par la tubulure de la cuvette à circulation, ce qui permet un bullage par le dessous. Cette opération dure 10 min et se pratique à l'obscurité.

#### b32) Suspensions de plasmas sanguins humains

Nous avons déterminé les valeurs des durées de vie du PBA (3  $\mu$ L) incorporé dans des suspensions de plasmas sanguins (3 mL) dans une cuvette à circulation à l'aide de la fluorimétrie de phase.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites pour le marquage d'une suspension de glycérol, à l'exception du fluorimètre qui dans ce cas est un SLM 48000S Aminco (décrit dans le tableau 6).

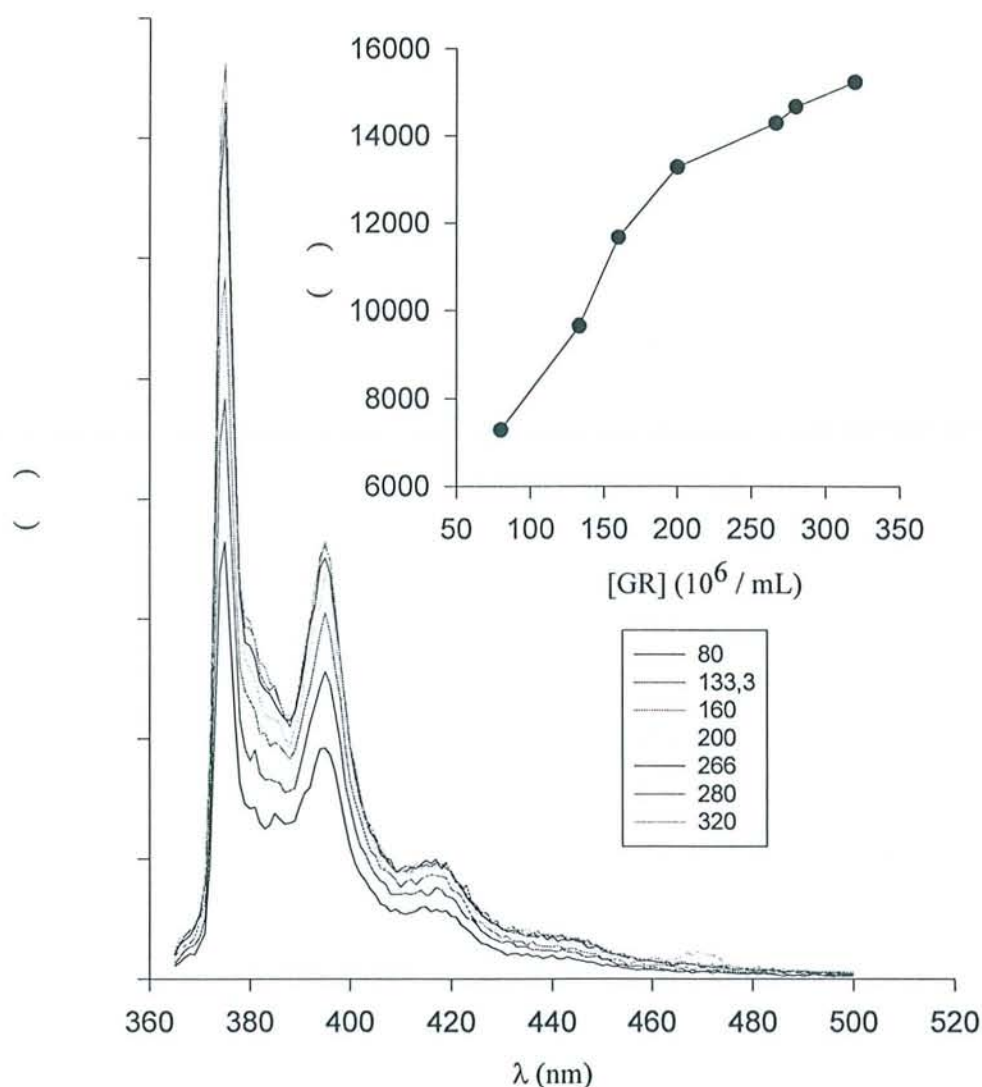
#### b33) Suspensions d'érythrocytes humains

Le protocole est décrit dans la partie III.1.1, plus précisément dans le chapitre "Matériels et Méthodes" de l'article 1. Dans ce type d'expériences, au moins deux facteurs peuvent jouer sur le signal de fluorescence :

- l'absorption du signal d'excitation par la suspension cellulaire,

- l'absorption du signal d'émission de fluorescence par les molécules d'hémoglobine contenues dans la suspension d'érythrocyte.

Au préalable à toute étude, nous avons montré que la concentration cellulaire en érythrocyte représente un paramètre important. La figure 16 montre l'évolution des spectres d'émission du PBA ( $1 \mu\text{M}$ ) à  $20^\circ\text{C}$  lorsque ce fluorophore est incorporé dans des suspensions d'érythrocytes à différentes concentrations. Les résultats montrent une augmentation du signal de fluorescence avec l'augmentation de la concentration cellulaire ce qui indique que les phénomènes d'auto-inhibition de fluorescence (entre molécules de PBA) et de filtre interne n'interviennent pas pour les concentrations cellulaires considérées.



**Figure 16** : Influence de la concentration en érythrocytes marqués (PBA,  $1 \mu\text{M}$ ) sur le spectre d'émission de fluorescence,  $20^\circ\text{C}$ ,  $\text{PO}_2 = 0,21$ .

b34) *Suspensions de membranes d'érythrocytes humains*

Le protocole est décrit dans la partie II.2.2, plus précisément dans le chapitre "Matériels et Méthodes" de l'article 3.

b35) *Suspensions de cellules endothéliales humaines*

Le protocole de marquage est décrit dans la partie III.5, plus précisément dans le chapitre "Matériels et Méthodes" de l'article 5.

b36) *Monocouche de cellules endothéliales humaines*

Le protocole de marquage à l'aide des dérivés pyréniques est décrit dans la partie III.5, plus précisément dans le chapitre "Matériels et Méthodes" de l'article 5. Le protocole de marquage à l'aide du Ru(phen) est décrit dans la partie II.2.10.2.b2.

II.2.10.3) Mesure des intensités et détermination des durées de vie

L'organigramme présenté sur le schéma 3 illustre les différentes résolutions de la fluorescence que nous avons mises en œuvre dans ce travail.

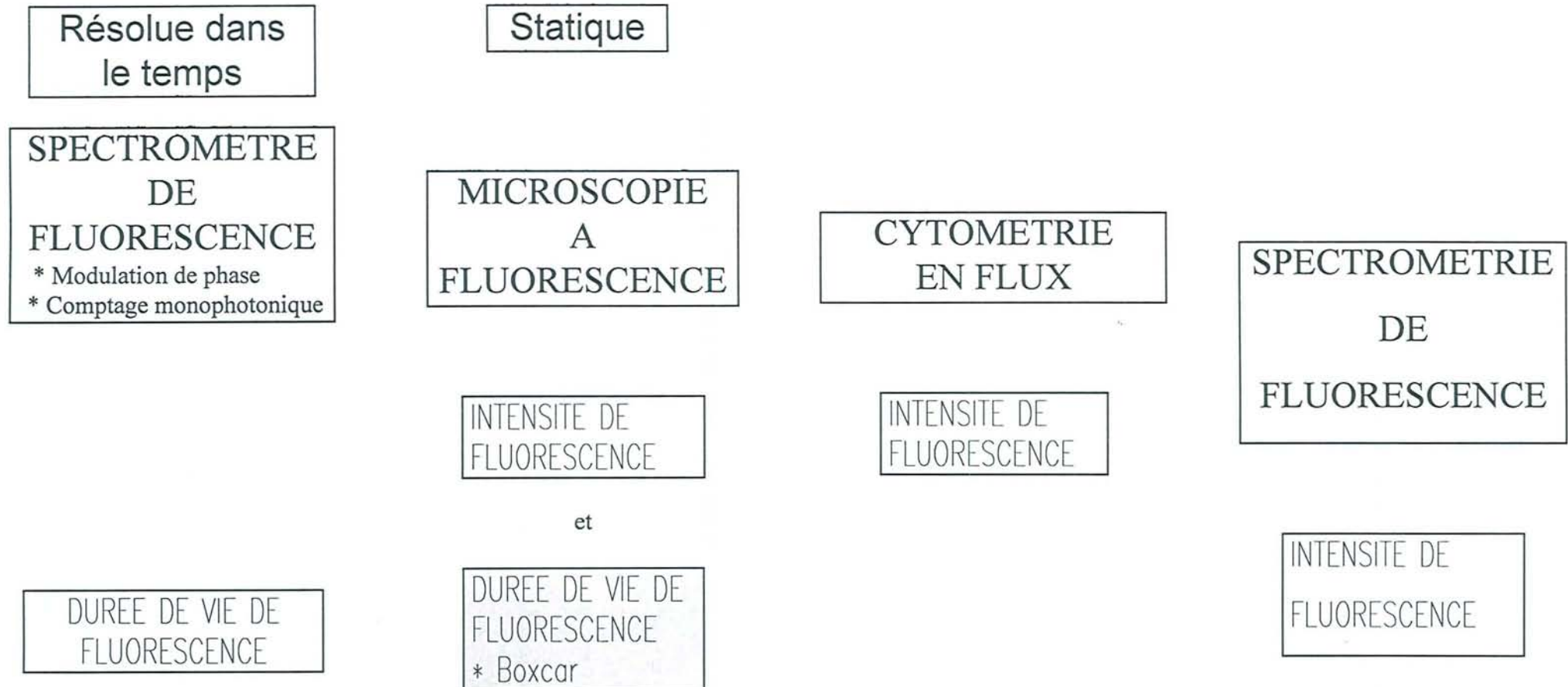
La fluorescence résolue dans le temps donne accès aux valeurs des durées de vie principalement grâce à la fluorimétrie à modulation de phase et à la technique de comptage monophotonique. Ces mesures sont réalisées sur des suspensions cellulaires contenues dans des cuvettes, ce qui nécessite une étape de décrochement du support de culture pour un certain type de cellules, par exemple des cellules adhérentes comme les cellules endothéliales. La détermination des durées de vie dans les conditions physiologiques pose le problème de la validité des résultats pour une population de cellules dites non circulantes.

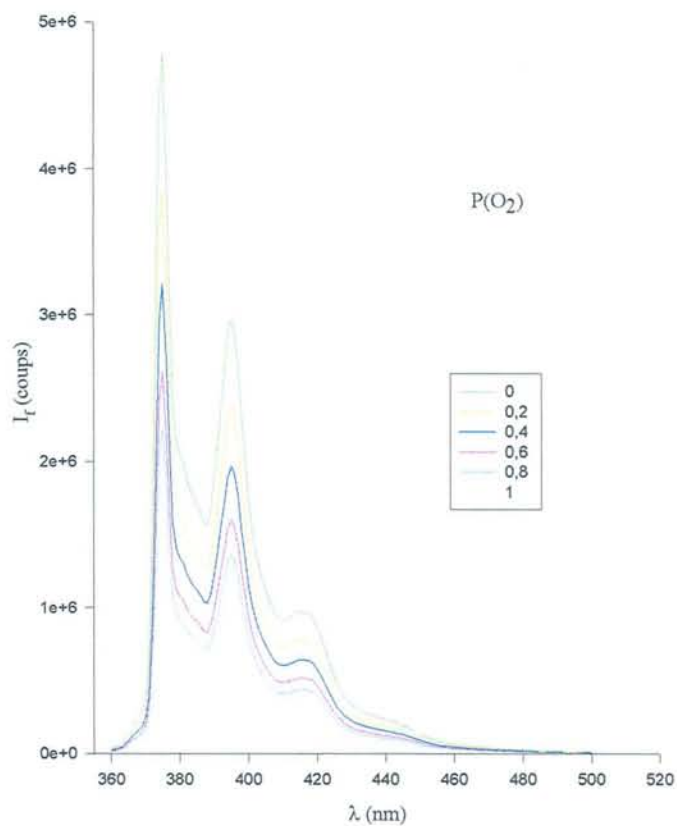
Les valeurs des intensités en fluorescence statique sont mesurées par diverses approches technologiques, principalement la microscopie à fluorescence, la cytométrie en flux et la spectrofluorimétrie de fluorescence. Parmi ces dernières, seule la microscopie à fluorescence permet l'observation des cellules adhérentes sans dommage pour la monocouche.

Pour aborder les mesures des durées de vie en respectant l'intégrité morphologique d'une monocouche de cellules adhérentes, notre équipe a développé en collaboration avec le GRAPP-DCPR de l'ENSIC, une nouvelle approche alliant la résolution temporelle à la microscopie à fluorescence.

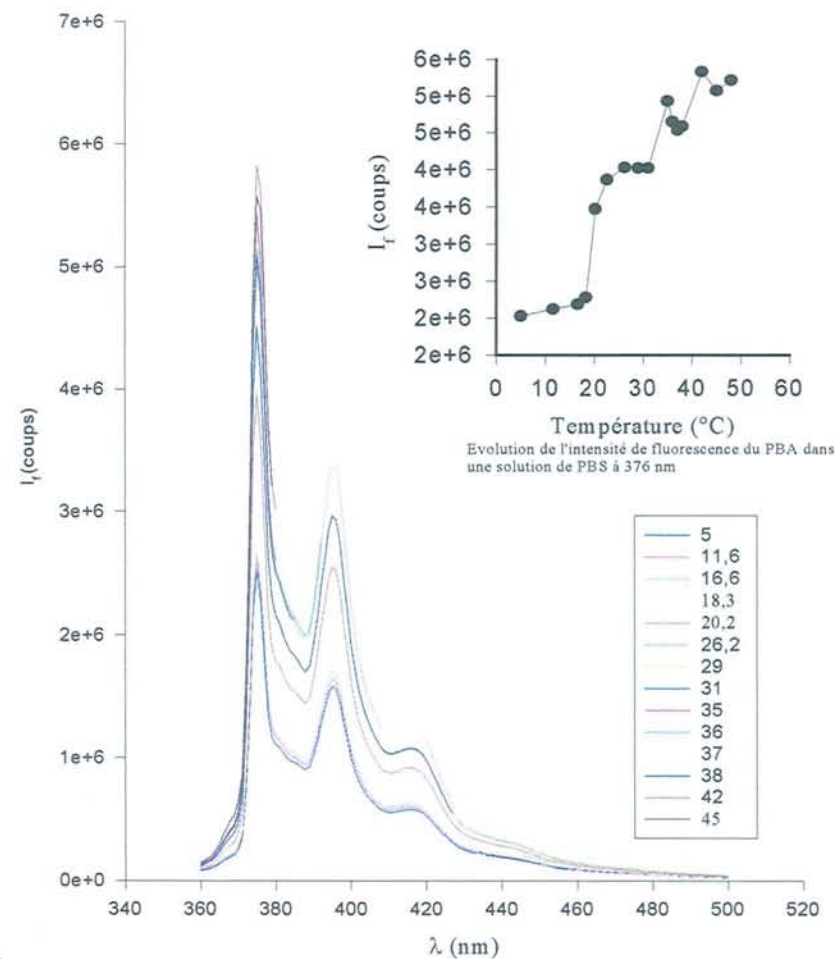
**Schéma 3** : Organigramme des méthodes de mesures des intensités et des durées de vie de fluorescence

## Spectrométries de Fluorescence





**Figure 17** : Influence de l'oxygène sur le spectre d'émission de fluorescence du PBA ( $1\mu\text{M}$ ) dans du PBS à  $+25\text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figure 18** : Influence de la température sur le signal d'émission de fluorescence du PBA ( $1\mu\text{M}$ ) dans du PBS.



a) Mesure des intensités de fluorescence

a1) Mesure à l'aide d'un photomultiplicateur

Les mesures des intensités de fluorescence sont réalisées en vue d'obtenir soit un spectre d'émission de fluorescence (intensité pour chaque longueur d'onde), soit une valeur d'intensité à une longueur d'onde précise (à un temps donné). Les photomultiplicateurs utilisés font partie d'un spectrofluorimètre du marché (Fluoromax-2, SLM48000C, Fluorolog) ou d'un montage du laboratoire comme les systèmes Boxcar **MC** ou Boxcar **MM**.

A titre d'illustration, la figure 17 représente l'évolution des spectres des émissions de fluorescence du PBA (1 $\mu$ M) dans du PBS en fonction du taux d'oxygène. Ce spectre a été réalisé en cuvette (+25 °C) à une longueur d'onde d'excitation de 343 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluoromax-2. L'influence de la température sur le spectre du PBA (1 $\mu$ M) dans du PBS est montrée sur la figure 18.

a2) Mesure à l'aide d'un capteur CCD (Coupled Charge Device)

Des mesures de microscopie quantitative sont permises par la connection d'un capteur CCD à un microscope. Le choix de la caméra (Slow-Scan Camera Kuv1317, Princeton Instruments Inc, USA) a répondu à de nombreuses contraintes, en particulier

- la détection de faibles niveaux de lumière (10<sup>-7</sup> lux)
- une résolution importante (1035x1017 pixels), numérique, 12 bits
- une intégration du signal (temps d'acquisition) modulable et sans génération de "bruit de fond" par un refroidissement de type Peltier à 3 niveaux.
- bonne sensibilité dans l'UV (excitation 343 nm, émission >376 nm) : le capteur est revêtu d'une surface sensible (revêtement à l'aide de lumogène qui absorbe dans l'UV et réémet dans le visible).



	SPECTROFLUORIMETRIE		COMPTAGE MONOPHOTONIQUE	MICROSCOPIE		
<b>Marque</b>	<i>Spex - Jobin-Yvon</i>	<i>SLM-Aminco</i>	<i>Construit au DCPR</i>	Microscope <i>Olympus</i>	Caméra CCD <i>Princeton, Inc</i>	Boxcar <i>EG &amp; G PARC</i>
<b>Modèle</b>	Fluoromax-2	48000	Construit au DCPR	IX70	Kodak UV 1317	PM : Hamamatsu
<b>Programme</b>	Datamax Grams 4	Déconvolution SLM	Développé au DCPR	Winview Visilog 4.1.5	Winview Visilog 4.1.5	EG & G PARC
<b>Excitation</b>	Lampe Xénon 343 nm	Lampe Xénon 343 nm	Laser à colorant pulsé 340 nm	Lampe Hg 320 > $\lambda$ > 360 nm		Laser pulsé N <sub>2</sub> 357 nm
<b>Emission</b>	monochromateur 376 nm	filtre 365-415 nm	filtre 365-415 nm	dichroïque > 375 nm	> 375 nm	> 375 nm
<b>Résolution de la fluorescence</b>	statique	temporelle	temporelle	statique	statique	temporelle
<b>Méthode</b>	comptage de photons	dynode	comptage de photons		niveaux de gris	déclin d'intensité
<b>Référence</b>	fluorescence intrinsèque solvant	glycogène (9,24 ns / EtOH)		fluorescence intrinsèque bruit de fond courant d'obscurité		
<b>Mesure</b>	intensité	durée de vie (ns)	durée de vie (ns)	intensité	niveaux de gris	durée de vie
<b>Principe</b>		modulation phase	comptage monophotonique		balayage (trame)	balayage (temps)
<b>Intégration</b>	fentes 5/3 nm 1 s		comptage continu		100 ms	fenêtre de temps 3 ns
<b>Accumulation</b>		5	-	1	1	5

**Tableau 6** : Présentation des appareils utilisés et leurs caractéristiques.

Les caractéristiques du capteur CCD Kodak KAF-1400 sont données ci-dessous :

Format	1317 x 1035
Taille du pixel ( $\mu\text{m}$ )	6,8 x 6,8 $\mu\text{m}$
Surface efficace (mm)	8,98 x 7,04
Capacité du puits potentiel ( $\text{Ke}^-$ )	45
Bruit de fond ( $e^-$ )	10 à 1 MHz
Dynamique (bits)	12 à 14
Temps de balayage de la trame (sec)	1,4 à 1 MHz
Refroidissement ( $^{\circ}\text{C}$ )	-40
Thermostabilité ( $\text{m}^{\circ}\text{C}$ )	40
Courant d'obscurité à 50 $^{\circ}\text{C}$ ( $e^- / \text{pixel-sec}$ )	< 0,005

Une étape de calibration se révèle nécessaire pour vérifier la linéarité de la réponse (valeurs de niveaux de gris) du capteur CCD en fonction de l'intensité lumineuse (lumière transmise ou fluorescente). Un kit d'intensité de calibration (InSpeck, Molecular Probes, USA) est utilisé à cet effet et comprend des billes fluorescentes d'intensités relatives définies (0 % à 100).

#### b) Détermination des durées de vie de fluorescence

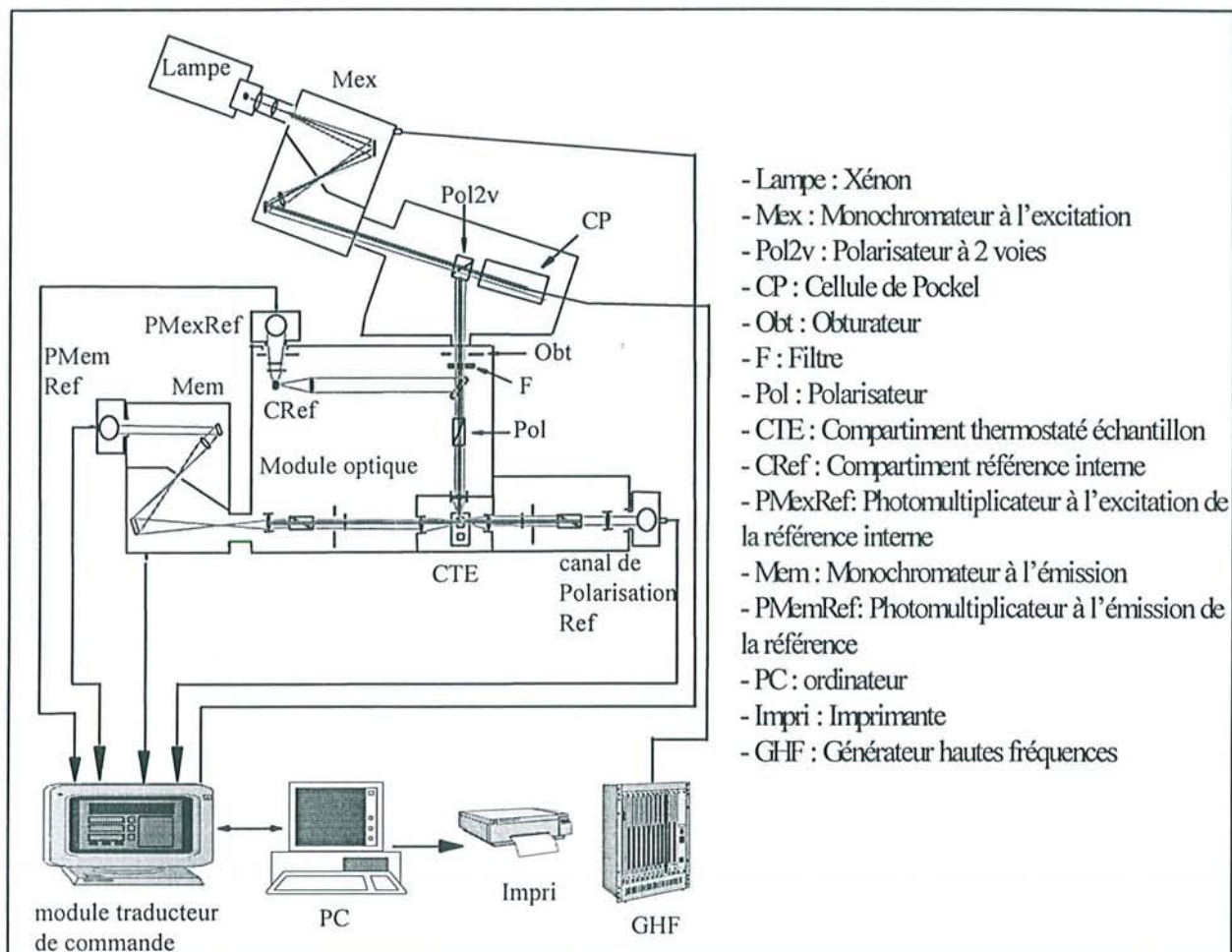
Il existe plusieurs méthodes de détermination de la durée de vie des états excités, précurseurs de la fluorescence, soit dans le domaine des fréquences (fluorimétrie de phase) soit dans le domaine temporel (Boxcar et comptage monophotonique). Une description des aspects théoriques de chaque méthode figure dans l'Annexe 1. Nous développerons ici les montages expérimentaux ainsi que les principes de fonctionnement de chaque appareil.

##### b1) Fluorimétrie de phase

La partie théorique de cette méthode est largement décrite dans l'Annexe 1. Les modalités d'utilisation (fréquences utilisées, référence, etc.) sont reportées dans le chapitre "Matériels et Méthodes" des articles figurant dans la partie 3. Seul le matériel sera décrit ci-dessous.

b11) *Montage expérimental*

Le fluorimètre de phase SLM 48000 S (SLM AMINCO, Bioritech, France) est représenté sur le schéma 4.



**Schéma 4** : Diagramme fonctionnel du SLM 48000S.

Il comporte les équipements suivants :

- \* Une lampe Xénon de 450 W comme source lumineuse.
- \* Deux monochromateurs dont le réseau holographique présente une dispersion de 2 nm/mm.
- \* Une cellule de Pockel qui permet la modulation de la lumière de 1 à 250 MHz avec des intervalles de 100 KHz.
- \* Un miroir qui permet d'éliminer la cellule de Pockel du chemin optique et par conséquent la réalisation des mesures de fluorescence en excitation continue.
- \* La possibilité d'adopter à l'émission la configuration traditionnelle en « L » ou une configuration en « T » permettant d'effectuer des mesures simultanées à deux longueurs d'onde d'émission ou des déterminations de polarisation de fluorescence.

b12) *Fonctionnement*

L'émission de fluorescence, suite à une excitation modulée, est retardée dans le temps de manière proportionnelle à la durée de vie de la sonde. Le déphasage  $\phi$  et le facteur de démodulation par rapport à l'excitation modulée sont utilisés pour la détermination du déclin de fluorescence (cf Annexe 1).

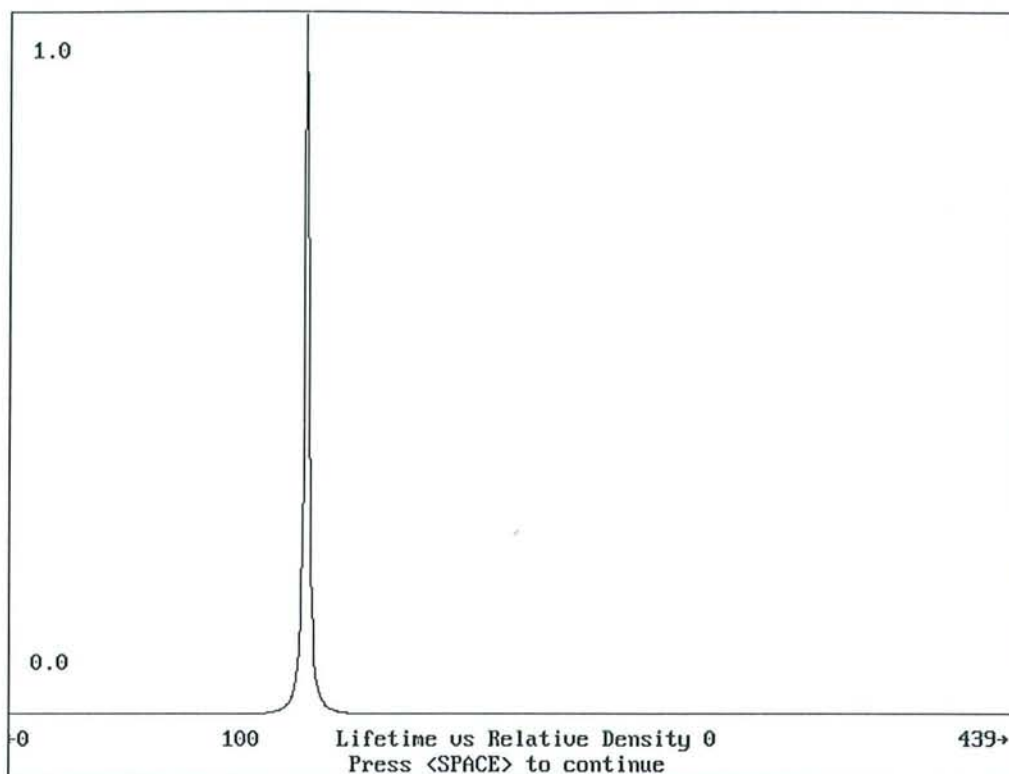
Les mesures sont effectuées par rapport à un fluorophore de référence, le diphénylanthracène (DPA, 9,24 ns dans l'éthanol) ou le glycogène (0 ns dans l'eau). Plusieurs durées de vie peuvent caractériser un fluorophore, ce qui nécessite de mesurer le déphasage et le facteur de démodulation sur une gamme de fréquence de modulation la plus large. Les données sont analysées à l'aide d'un modèle de composants exponentiels discrets ou d'un modèle tenant compte d'une distribution continue des valeurs des composantes de la durée de vie. Ces composantes sont caractérisées par une forme « Lorentzienne » dont les pics sont centrés sur des durées de vie  $\tau_n$  (figure 19) et ont une largeur à mi-hauteur des pics (LMH). Un test des moindres carrés est utilisé ainsi que le test du  $\chi^2$  afin de juger de la qualité de la détermination.

Les paramètres obtenus sont les suivants (tableau 8) :

$\tau_n$	composante(s) de la durée de vie
P(%)	proportion relative de $\tau_n$
LMH	largeur à mi-hauteur du pic

Lorentzian Distribution			
File: PYR2348C			
PBA 100%N2 CHOL40 CE			15:14:55 08-12-1997
Initial values of parameters			
Center: 128.000 ns U	Width: 0.050 U	Fraction: 0.999	
Center: 128.000 ns U	Width: 0.050 U	Fraction: 0.001	
Average phase error:	0.50000		
Average modulation error:	0.00500		
Initial Chi-squared R = 1.941060E+00			
Final values of parameters			
Center: 129.754 ns U	Width: 2.044 U	Fraction: 0.919	
Center: 130.284 ns U	Width: 1.196 U	Fraction: 0.081	
Final Chi-squared R = 1.829566E+00			
Press <SPACE> for deviation information, <P> for a printout			

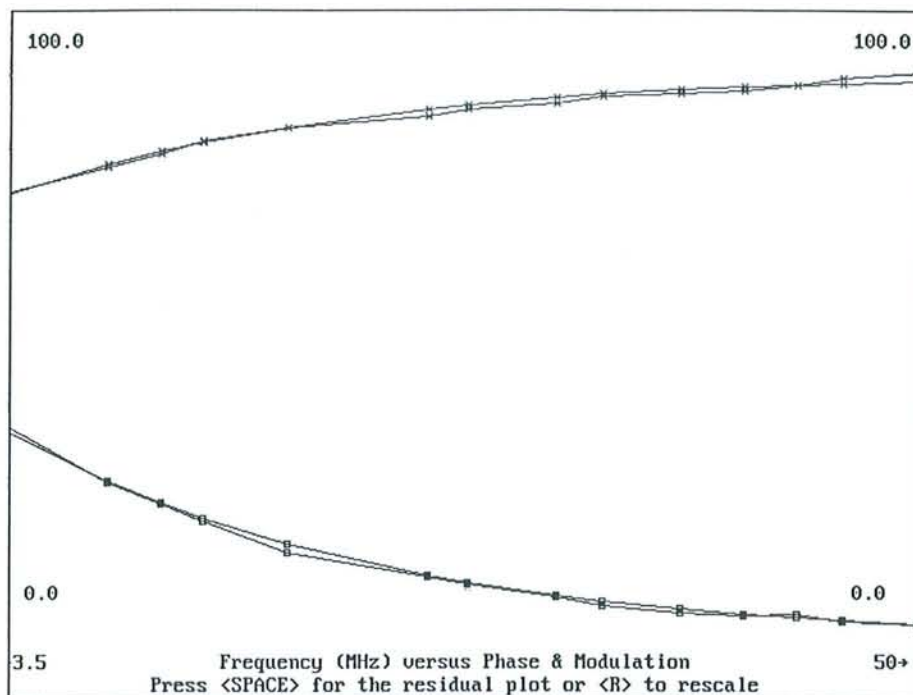
**Tableau 8** : Paramètres de la distribution des composantes des durées de vie.



**Figure 19** : Distribution des durées de vie de fluorescence centrée autour de 128,5 ns.

b13) *Détermination des durées de vie.*

A titre d'exemple de détermination, nous avons mesuré la (les) durée(s) de vie du PBA (1  $\mu\text{M}$ ) dans une suspension de membranes d'érythrocyte contenues dans une cuvette en quartz à 25 °C par rapport à un fluorophore dont la durée de vie est définie (PDA, 9,24 ns). La solution est saturée en azote, ce qui permet d'obtenir la valeur de la durée de vie des états excités en absence d'oxygène ( $\tau_0$ ). Le protocole de marquage est décrit dans la partie II.2.10.2.b3. La Figure 20 montre l'évolution du déphasage  $\phi$  et du facteur de démodulation en fonction d'une gamme de fréquence de modulation (tableau 9). La qualité de la réponse est donnée par la répartition de ces mêmes valeurs autour de zéro (en %) (figure 21). Deux modèles ont été comparés et les données sont analysées soit en régression mono-exponentielle soit en bi-exponentielle. Les valeurs calculées des durées de vie ne sont pas significativement différentes selon le modèle employé (128,5 ns et 128,6 ns) et les valeurs du  $\chi^2$  indiquent que les modèles sont bons.



**Figure 20** : Evolution des valeurs de phase et de modulation en fonction de la fréquence (3,5 à 50 MHz) pour l'émission de la fluorescence du PBA (1 $\mu$ M) dans les membranes d'érythrocyte à 25 °C en absence d'oxygène.

```

Final values of parameters
Component #1    Tau 128.599 ns U
                Fi   1.0000 C
Average phase error:      0.50000
Average modulation error: 0.00500
Final Chi-squared R = 1.772741E+00

```

Modèle mono-exponentiel

```

Final values of parameters
Component #1    Tau 128.600 ns U
                Fi   1.0000 U
Component #2    Tau   0.667 ps U
                Fi   0.0000 C
Average phase error:      0.50000
Average modulation error: 0.00500
Final Chi-squared R = 1.926893E+00

```

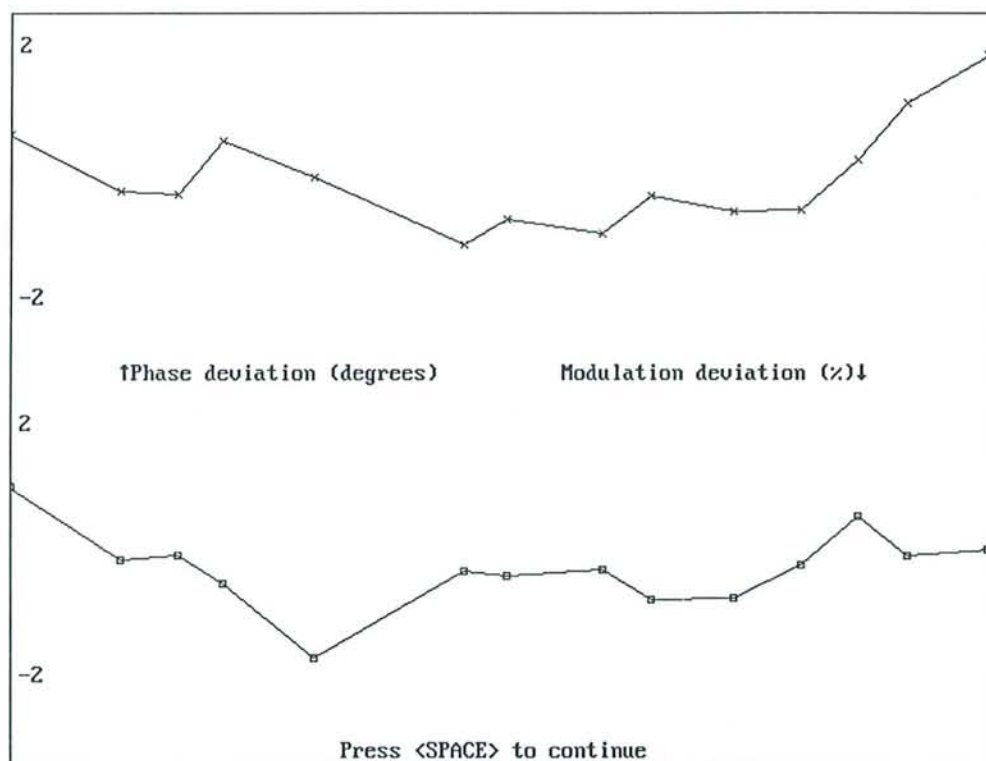
Modèle bi-exponentiel



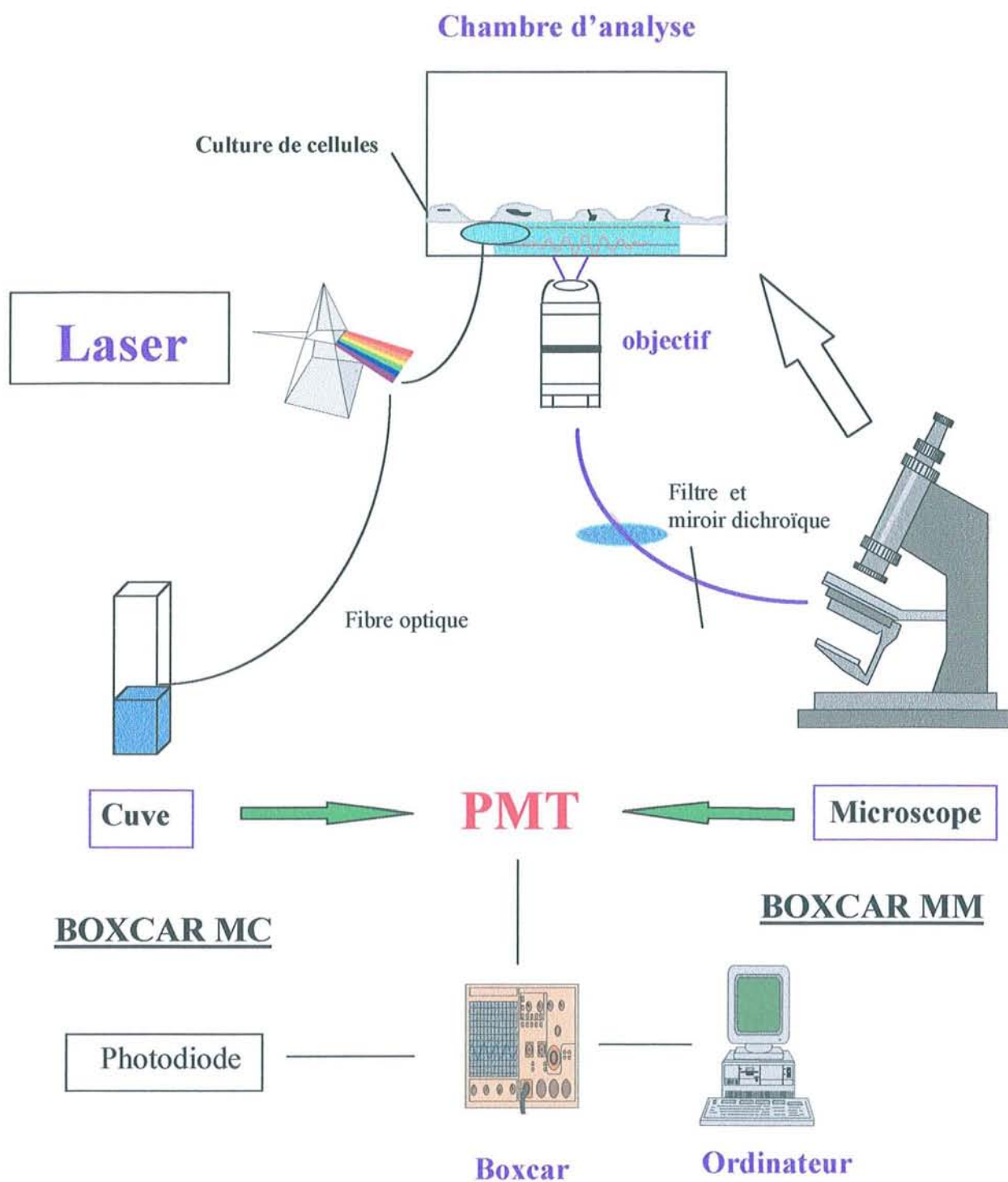
Frequency	Measured Phase	0.00 nm		Measured Modul.	Calc. Modul.	Modulation Deviation
		Calc. Phase	Phase Deviation			
3.500000 MHz	70.8720	70.5263	+0.3457	0.3421	0.3334	+0.0087
4.750000 MHz	75.0000	75.3964	-0.3964	0.2510	0.2521	-0.0011
5.550000 MHz	77.0000	77.4292	-0.4292	0.2172	0.2176	-0.0004
6.250000 MHz	79.0705	78.7994	+0.2711	0.1900	0.1942	-0.0042
8.000000 MHz	81.0000	81.2060	-0.2060	0.1390	0.1529	-0.0139
12.000000 MHz	83.0000	84.1117	-1.1117	0.1000	0.1026	-0.0026
13.500000 MHz	84.0000	84.7621	-0.7621	0.0881	0.0913	-0.0032
17.500000 MHz	85.0000	85.9548	-0.9548	0.0683	0.0705	-0.0022
20.000000 MHz	86.0000	86.4590	-0.4590	0.0555	0.0618	-0.0063
25.000000 MHz	86.5000	87.1659	-0.6659	0.0435	0.0494	-0.0059
30.000000 MHz	87.0000	87.6377	-0.6377	0.0396	0.0412	-0.0016
35.000000 MHz	88.0000	87.9749	+0.0251	0.0401	0.0353	+0.0048
40.000000 MHz	89.0000	88.2278	+0.7722	0.0305	0.0309	-0.0004
50.000000 MHz	90.0000	88.5821	+1.4179	0.0251	0.0247	+0.0004

Average phase deviation = 0.60391      Average modulation deviation = 0.00398

**Tableau 9** : Valeurs du déphasage  $\phi$  et du facteur de modulation en fonction de la fréquence de modulation (3,5 à 50 MHz) pour l'émission de la fluorescence du PBA (1 $\mu$ M) dans les membranes d'érythrocyte à 25 °C.



**Figure 21** : Répartition des valeurs des déviations de phase et de modulation autour de zéro (%).



**Schéma 5 :** Représentation du montage expérimental du Boxcar MC (cuvette) et Boxcar MM (configuration microscopie).

## b2) Boxcar

Le montage expérimental est représenté sur le Schéma 5.

### b21) Montages expérimentaux

Il s'agit d'un Boxcar EG & G PARC modèle 4100 en partie piloté par ordinateur avec une acquisition informatisée. Ce matériel, acquis par le DCPR-GRAPP (ENSIC-INPL à Nancy) enregistre et analyse les déclinés des intensités de fluorescence pour déterminer les valeurs des durées de vie de fluorescence (Gouin, 1996). Selon le type d'analyse, nous avons développé des mesures en cuve (Boxcar MC) et des mesures à partir d'un microscope à fluorescence (Boxcar MM).

### b22) Excitation avec un laser pulsé

Un laser à azote (VSL-337, Laser Science Inc.) émet un éclair lumineux à une fréquence de tir maximale proche de 20 Hz. Les caractéristiques sont les suivantes :  $\lambda$  : 337,1 nm ; durée de l'impulsion : 3 ns ; taille du faisceau : 3 x 8 mm ; taille : 250 x 120 x 70 mm ; poids : 2,3 kg. La raie excitatrice d'émission se situe à 337,1 nm ce qui correspond tout à fait à la longueur d'onde d'excitation des dérivés pyréniques qui se situe vers 340 nm.

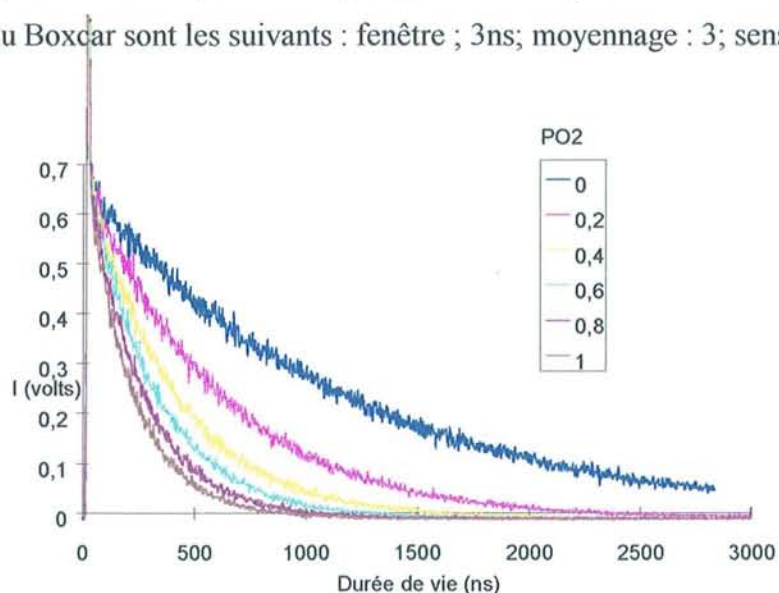
Pour d'autres sondes, comme le Ru(phen) dont le pic d'absorption se situe vers 450 nm, l'éclair peut être coloré (colorant coumarine 440 Otilas, France) afin de délivrer une raie à 440 nm, ce qui est compatible avec cette sonde. Le problème de ce module de coloration (DLM120) réside dans la perte d'énergie de l'éclair laser, et ceci pour trois raisons principales : le rendement de fluorescence, le recueil de la lumière excitatrice dans un plan orienté uniquement et enfin la sélection de l'unique longueur d'onde désirée dans un réseau. Ce module additionnel qui se fixe en sortie du laser n'a pas été utilisé dans nos travaux, car il délivre une excitation d'intensité trop faible.

Pour notre application, la concentration en Ru(phen) était suffisamment importante (dans le gel) pour que l'excitation laser à 337,1 nm produise un signal de fluorescence détectable. Ce qui était vrai pour du Ru(phen) incorporé dans une matrice (gélatine) revêtu d'un polymère (PLGA) ne l'était pas pour de faibles concentrations incorporées au niveau cellulaire.

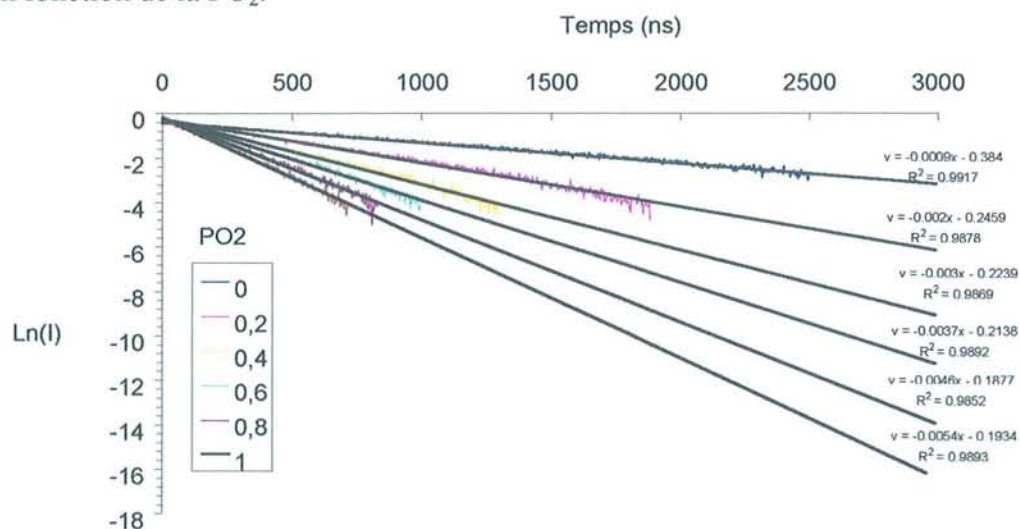


### b28) Détermination des durées de vie

L'exemple de détermination des durées de vie à l'aide du système porte sur l'inhibition des durées de vie du Ru(phen) par l'oxygène dans une chambre d'analyse en configuration microscopie. Une solution de gélatine (0,5 mL, 6 g/L) contenant une solution de Ru(phen)  $10^{-4}$  M est coulée sur une lamelle ( $\varnothing$  40 mm) posée sur une table plane. La lamelle est introduite dans une chambre d'analyse fixée sur la platine du microscope et le film de gélatine est observé à l'aide d'un objectif x20. Différents mélanges de gaz sont introduits dans la chambre (0, 20, 40, 60, 80 et 100 %  $O_2/N_2$ ) et le déclin de fluorescence recueilli pour chaque  $PO_2$  est montré sur la Figure 22. Nous donnons sur la Figure 23 le logarithme de l'intensité de fluorescence ainsi que la droite de régression correspondante (image du comportement idéal). Les paramètres d'expériences du Boxcar sont les suivants : fenêtre ; 3ns; moyennage : 3; sensibilité : 2).



**Figure 22** : Déclin des intensités de fluorescence normalisées du Ru(phen) dans un gel de gélatine en fonction de la  $PO_2$ .



**Figure 23** : Représentation en mode logarithmique des intensités de fluorescence normalisées du Ru(phen) dans un gel de gélatine en fonction de la  $PO_2$ .

b26) Boxcar et système de *Mesure couplé à un Microscope à fluorescence (Boxcar MM)*

Le PM (connecté au Boxcar) est monté sur la sortie photomicrographique d'un microscope inversé à fluorescence (Olympus, IX-70) et délivre des valeurs d'intensités de fluorescence. Le déclin de l'intensité de fluorescence est analysé pour la détermination de la durée de vie de sondes fluorescentes d'un échantillon microscopique (microscopie à fluorescence résolue dans le temps).

De nombreux paramètres inhérents au système Boxcar ont été préalablement étudiés pour valider cette nouvelle approche microscopique. Les résultats figurent dans la partie II.2.11 et concernent la mise au point, le temps d'exposition, la concentration en sonde, l'objectif, l'état de confluence cellulaire, etc.

Avant d'effectuer des mesures de durées de vie par microscopie (Boxcar **MM**), nous devons nous assurer que les valeurs obtenues par le système Boxcar EG & G PARC étaient cohérentes avec celles obtenues avec d'autres méthodes de détermination (modulation de phase, comptage monophotonique) sur des suspensions cellulaires en cuvette. C'est la raison du montage du système Boxcar **MC** présenté sur le Schéma 5.

b27) Boxcar et système de *Mesure en Cuvette (Boxcar MC)*

Ce système a été développé pour vérifier la bonne concordance des résultats obtenus avec le boxcar MC et les autres systèmes de mesure sur des suspensions cellulaires en cuvette. Il a essentiellement été utilisé pour valider les déterminations des durées de vie par le système Boxcar **MM**, puisque toutes les composantes sont identiques à l'exception du trajet optique propre au microscope.

Dans le système Boxcar **MC** en suspension dans une cuvette (fluorimétrie résolue dans le temps), le PM est monté sur un boîtier intégrant un porte-cuvette (mis au point au laboratoire par J. Didelon) et un porte filtre. Le PM recueille l'émission du signal à 45° par rapport à l'excitation laser pulsée. Les filtres sont choisis pour correspondre au spectre d'émission du fluorophore utilisé.







Une régression linéaire permet d'obtenir la pente de la courbe de tendance, dont l'inverse représente la durée de vie de fluorescence de l'état excité ( $\tau$ ) selon  $F \approx e^{-t}$

Les valeurs des durées de vie calculées sont 1111 ns; 500 ns; 333 ns; 270 ns; 217 ns et 185 ns pour respectivement 0, 20, 40, 60, 80 et 100 % O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>. La valeur de R<sup>2</sup> donne la précision de l'ajustement de la courbe de tendance à la courbe expérimentale.

La constante d'inhibition dynamique K<sub>d</sub> est définie comme la pente de la représentation des rapports des durées de vie en absence et en présence d'oxygène en fonction de la pression partielle en oxygène.

### b3) Comptage monophotonique par excitation pulsée:

#### b31 Principe et montage expérimental

Les concepts théoriques à la base du développement de cette méthode figurent en Annexe 1.

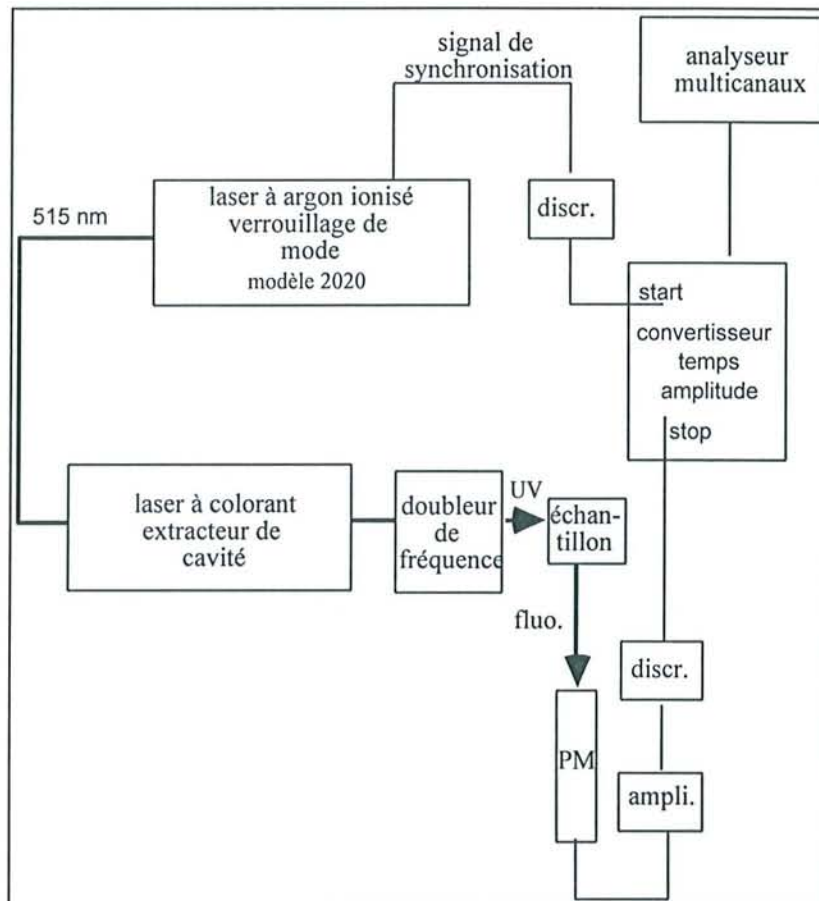
La mesure de déclin de fluorescence par comptage monophotonique repose sur l'idée que la distribution des probabilités d'émission d'un seul photon, à la suite d'une excitation, reproduit la véritable distribution de l'intensité en fonction du temps de tous les photons émis. En échantillonnant l'émission monophotonique produite par un très grand nombre d'éclairs d'excitation, l'expérience permet de reconstruire cette distribution de probabilité.

Une source électronique de référence ("trigger") génère un signal électrique à un instant exactement corrélé à l'instant d'émission d'un éclair optique. Le signal est dirigé sur l'entrée < START > d'un convertisseur temps - amplitude, qui commence alors à charger un condensateur. Dans le même temps, l'éclair optique excite l'échantillon et produit donc des photons de fluorescence. Dans les conditions où un seul photon est enregistré, après chaque excitation sur un photomultiplicateur à fort gain, on dirige le signal électrique ainsi produit (et amplifié) sur l'entrée < STOP > du convertisseur. Ceci a pour effet de stopper la charge du condensateur. L'impulsion émise par le convertisseur a une hauteur proportionnelle au temps écoulé entre les signaux < START > et < STOP >. Cet "événement" est alors stocké dans un analyseur multicanaux à l'adresse correspondant à la hauteur de l'impulsion du convertisseur. Cette expérience, répétée un grand nombre de fois, permet de reconstituer l'histogramme

recherché. On notera que cette représentation du déclin est discrétisée, le nombre de "coups" dans chaque canal correspondant à un domaine temporel de largeur finie.

Le signal obtenu doit être déconvolué, ce qui nécessite d'enregistrer la fonction de réponse de l'appareillage. Celle-ci est obtenue en remplaçant l'échantillon fluorescent par un simple diffuseur de lumière. L'étalonnage en temps se fait à l'aide d'un générateur d'impulsions calibré.

Le schéma 6 représente le principe d'un appareil de comptage monophotonique, qui permet la mesure des durées de vie.



**Schéma 6** : Appareil de comptage monophotonique, fondé sur l'utilisation d'une excitation pulsée (ampli : amplificateur ; discr. : discriminateur ; fluo. : émission de fluorescence ; PM : photomultiplicateur).

L'éclair et le bruit de fond électronique perturbent la forme de déclin de la fluorescence (fonction d'appareil). Le comptage monophotonique permet de s'affranchir de la fonction d'appareil sur la forme du déclin, fonction non disponible avec le Boxcar. La déconvolution tient en effet compte de la fonction d'appareil au cours du traitement pour donner un résultat plus précis concernant la forme du déclin.

Les déclinés obtenus sont modélisés en une ou une somme d'exponentielles à une ou deux composantes. Outre le résultat des régressions (linéaire ou exponentielle), le programme donne les résidus relatifs à cette régression ainsi que l'auto-corrélation des résidus.

Nous avons confronté les résultats d'un même échantillon obtenus par comptage monophotonique, Boxcar et fluorimétrie de phase pour nous assurer que les différences des déclinés de fluorescence n'étaient pas des fonctions d'appareils.

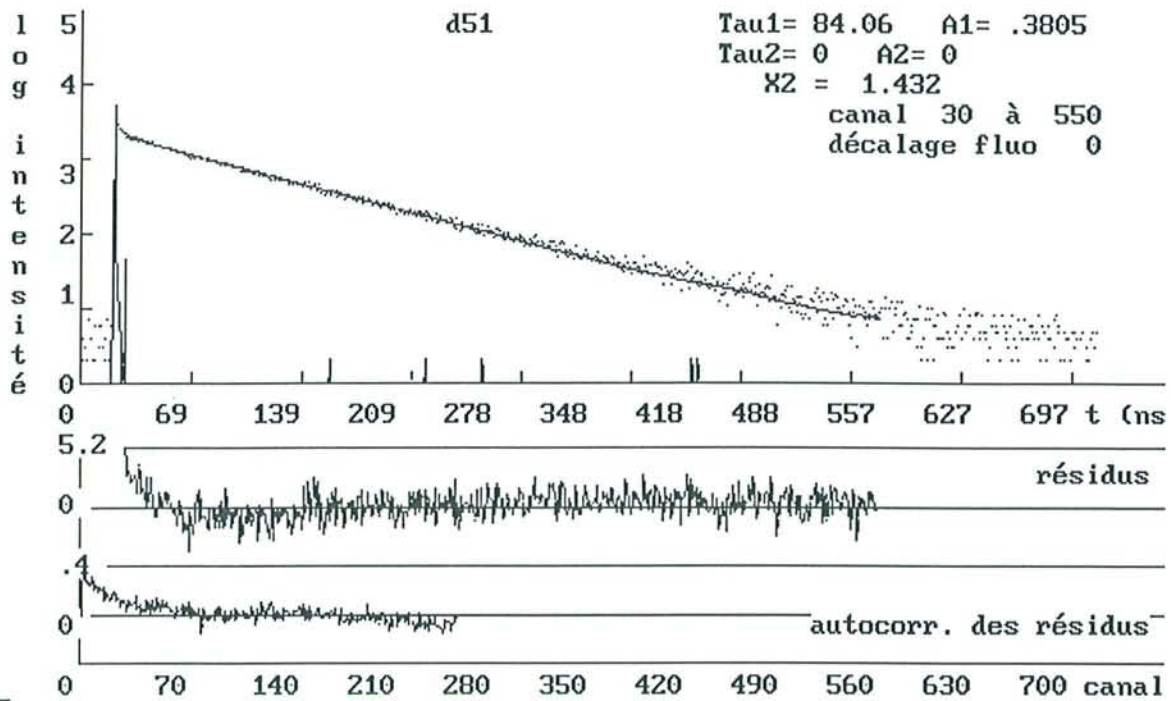
### b32) Détermination des durées de vie

Nous avons comparé les résultats des régressions mono-exponentielles (Figure 24) et bi-exponentielles (Figure 25) des déclinés de fluorescence du PBA (1  $\mu\text{M}$ ) à température ambiante incorporé dans les membranes d'érythrocyte.

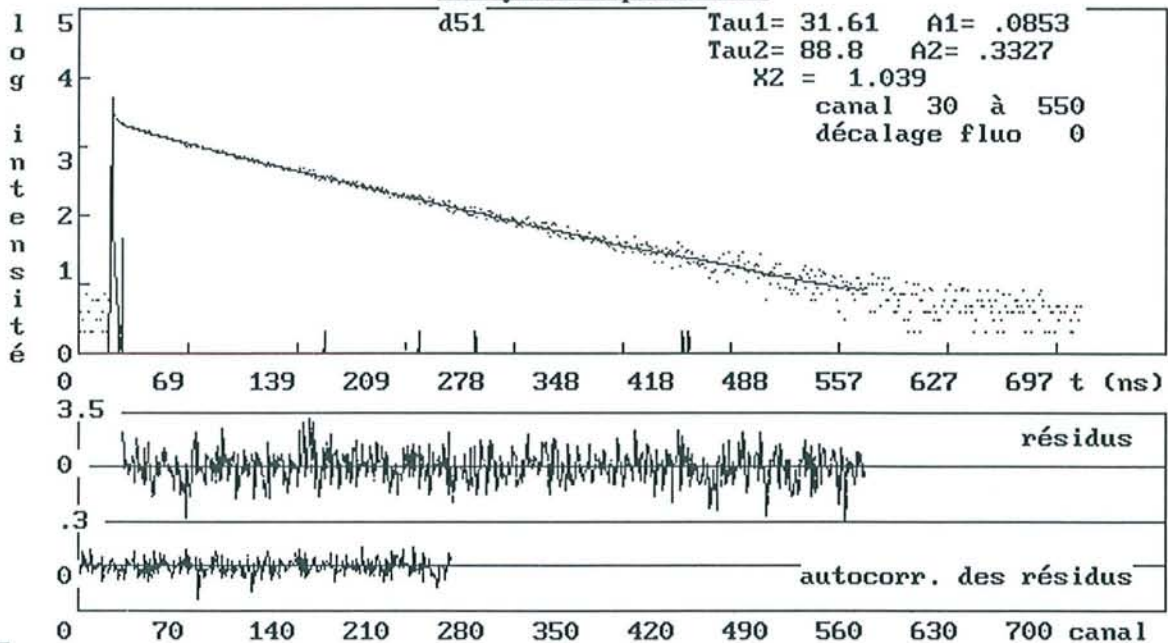
Les valeurs des durées de vie mentionnées sur ces graphiques sont multipliées par une constante de 1,69 dans ce cas (temps par canal), et ne sont pas significativement différentes :

- régression mono-exponentielle : 142,06 ns
- régression bi-exponentielle : 150,07 ns et 53,42 ns.

La qualité des résultats est meilleure dans le cas de la régression bi-exponentielle, comme l'indique le  $\chi^2$ , la répartition des résidus et leur auto-corrélation.

Analyse monoexponentielle

**Figure 24** : Détermination de la durée de vie du PBA ( $1\mu\text{M}$ ) dans une suspension de membranes d'érythrocyte, par la régression mono-exponentielle du déclin de la fluorescence  $\text{PO}_2 = 0,2$ .

Analyse bi-exponentielle

**Figure 25** : Détermination de la durée de vie du PBA ( $1\mu\text{M}$ ) dans une suspension de membranes d'érythrocyte, par la régression bi-exponentielle du déclin de la fluorescence  $\text{PO}_2 = 0,2$ .

### II.2.11) Validations des paramètres de détermination des durées de vie

La nature précise du déclin de fluorescence peut révéler certains détails sur les interactions du fluorophore avec son environnement. Ainsi, un déclin multiple peut résulter de la présence du fluorophore dans des environnements distincts (Lackowicz et al, 1989). Notamment en milieu aqueux, la durée de vie d'un fluorophore peut être très diminuée du fait du nombre de collisions de la sonde avec les molécules d'eau. Le déclin de l'intensité de fluorescence dépend donc des caractéristiques moléculaires de l'échantillon comme l'homogénéité de l'environnement de la sonde, la taille, la forme de la molécule.

Il apparaît donc important de définir les conditions permettant de déterminer de manière optimale les durées de vie de fluorescence en fonction de la méthode de détermination. Ces paramètres sont différents en fonction des techniques abordées (modulation de phase, boxcar et comptage monophotonique) et doivent être étudiés préalablement à toute détermination des durées de vie.

#### II.2.11.1) Modulation de phase

##### *a) Influence de la concentration en PBA dans un solvant (EtOH)*

Cette partie est développée en II.2.11.5.

##### *b) Influence de la concentration en sondes dans la membrane érythrocytaire*

Les durées de vie sont mesurées pour des suspensions de membranes d'érythrocytes (100 mg/mL) selon le protocole décrit dans les parties II.2.10.a, II.2.10.2.b34 et marquées avec différentes concentrations de PBA ou de PDA (Figure 26 A) Les expériences sont réalisées en absence d'oxygène pour obtenir les valeurs de  $\tau_0$ . Il apparaît que la formation d'excimères intermoléculaires (Figure 26 B) du PDA interfère sur les valeurs des composantes principales des durées de vie, qui ont tendance à diminuer. Ces résultats peuvent être dus à des fluidités membranaires différentes dans les compartiments membranaires renfermant ces sondes, favorisant les rencontres des molécules sondes et la formation d'excimères intermoléculaires. Ce phénomène n'est pas rencontré avec le PBA.

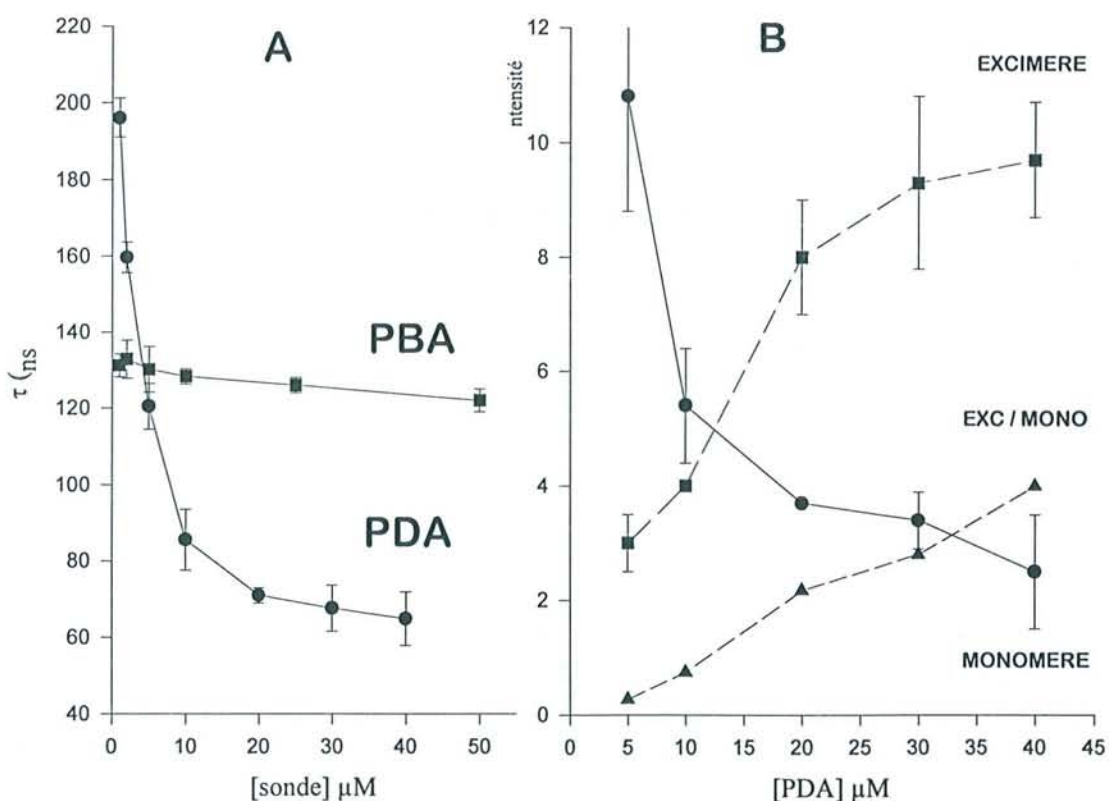
##### *c) Influence du solvant et du lavage après marquage*

La Figure 27 reporte la représentation des valeurs des durées de vie de fluorescence du PBA en fonction du solvant de la solution mère : Ethanol (EtOH) ou diméthylformamide (DMF).

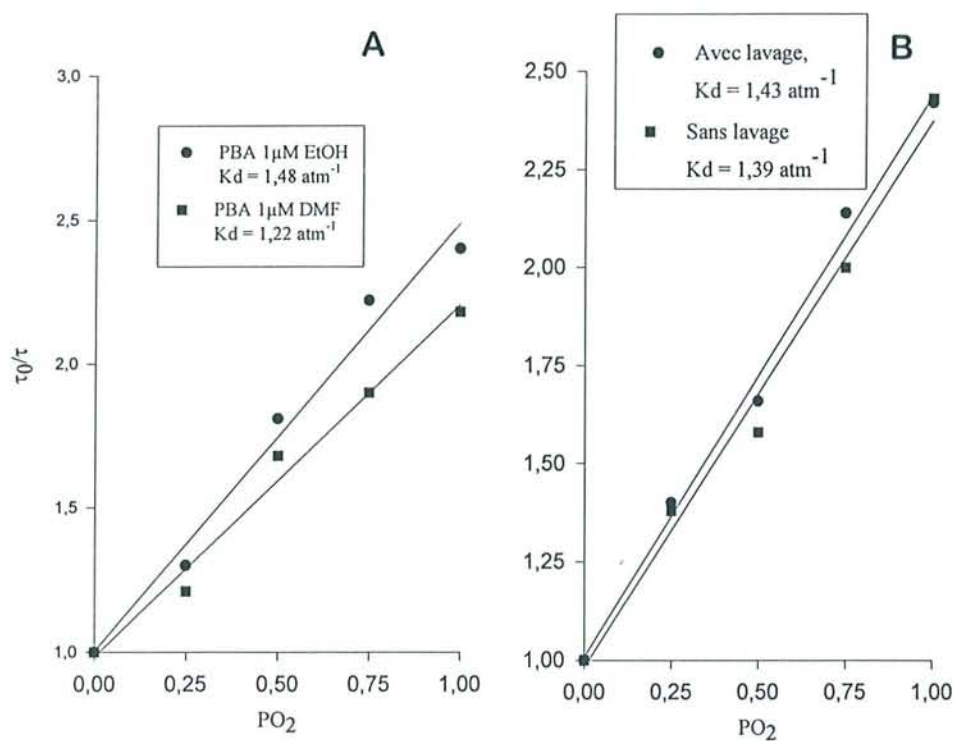
Nous avons retenu le DMF comme solvant, et pratiquons plusieurs étapes de lavage après marquage afin de s'assurer qu'il ne reste pas de sondes fluorescentes dans le surnageant.

*d) Inhibition de fluorescence des dérivés stéariques par l'oxygène*

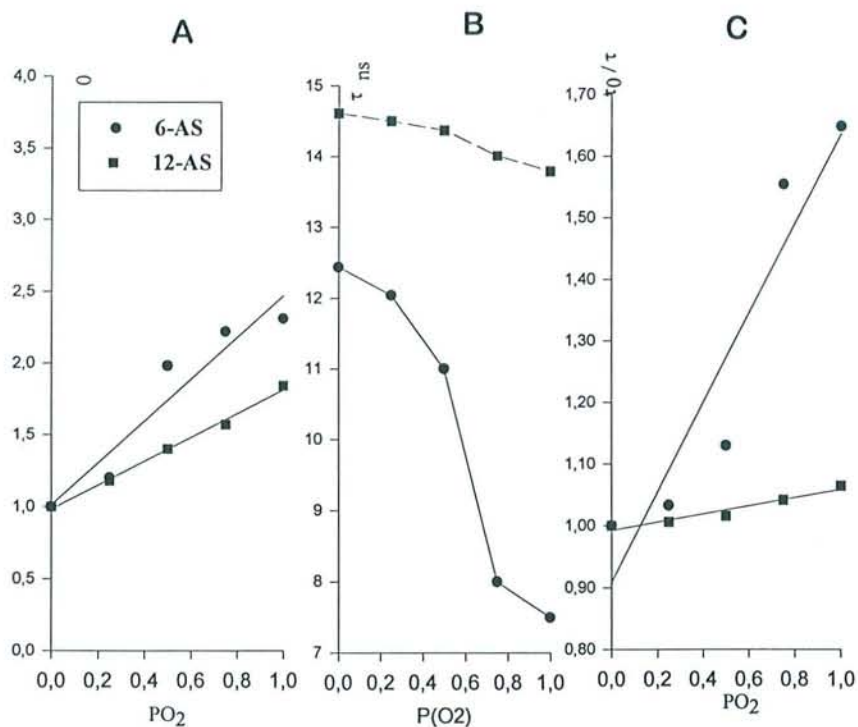
Les valeurs des anisotropies des acides 6-(9-anthroyloxy)stéarique (6-AS) et 12-(9-anthroyloxy)stéarique (12-AS) donnent accès à des mesures de fluidité membranaire. En vue d'apprécier si ces sondes pouvaient également présenter un intérêt dans l'étude de la diffusion de l'oxygène par inhibition de fluorescence, nous avons déterminé les intensités et durées de vie de ces deux sondes. Les données expérimentales reportées sur la Figure 28 nous indique que la linéarité des représentations de Stern-Volmer (intensités et durées de vie) était retrouvée avec la sonde 12-AS et non avec la sonde 6-AS. Les constantes d'inhibition sont difficilement exploitables ( $K_{sv_{12-AS}} = 0,88 \text{ atm}^{-1}$  avec  $R^2 = 0,99$  ;  $K_{d_{12-AS}} = 0,066 \text{ atm}^{-1}$  avec  $R^2 = 0,99$  ;  $K_{sv_{6-AS}} = 1,45 \text{ atm}^{-1}$  avec  $R^2 = 0,912$  ;  $K_{d_{6-AS}} = 0,72 \text{ atm}^{-1}$  avec  $R^2 = 0,88$ ) et l'amplitude (dynamique) du déclin est trop faible (de 14 ns à 13,7 ns pour le 12-AS et de 12 à 7,5 ns pour le 6-AS) pour correspondre aux critères de notre étude.



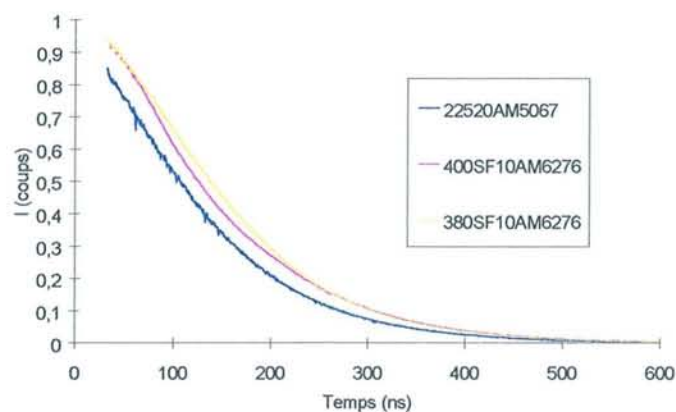
**Figure 26 :** Evolution des valeurs des durées de vie du PDA et du PBA (A), et des intensités de fluorescence correspondant au monomère (376 nm), à l'excimère (470 nm) du PDA et au rapport excimère / monomère du PDA(B).



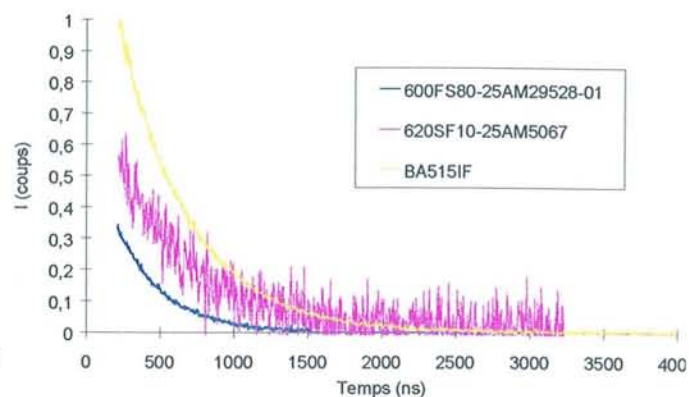
**Figure 27 :** Evolution du rapport  $\tau_0/\tau$  vs  $PO_2$  du PBA 1  $\mu$ M (A) : du solvant (EtOH ou DMF), (B) : d'une étape de lavage de la suspension membranaire après marquage.



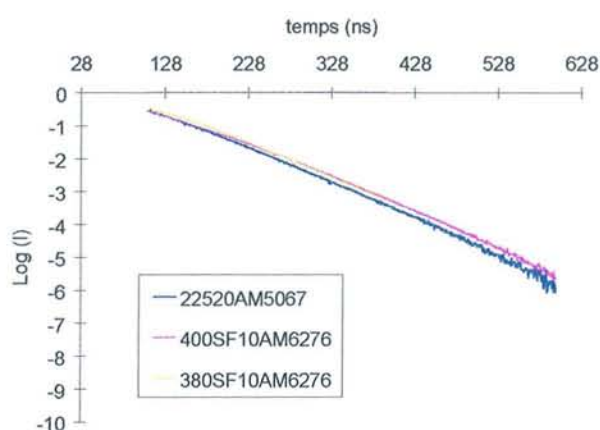
**Figure 28 :** Influence de la  $PO_2$  sur le rapport  $F_0/F$  mesurée à 450 nm (A), sur les valeurs des durées de vie (B) et le rapport  $\tau_0/\tau$  (C) des sondes 6-AS et 12-AS dans des membranes érythrocytaires, 20 °C.



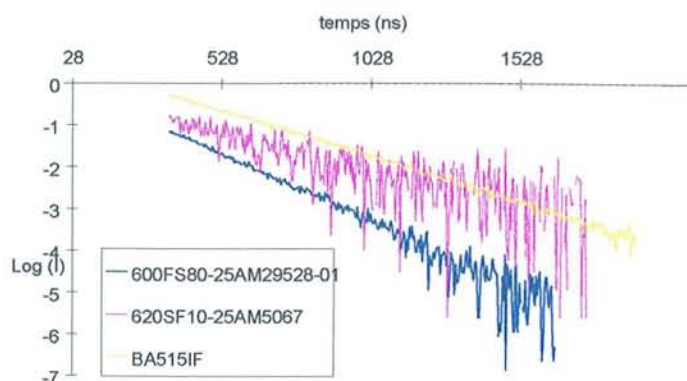
Effets des filtres sur le déclin de la fluorescence du PBA ( $1\mu\text{M}$ ) dans du PBS suite à une excitation pulsée.



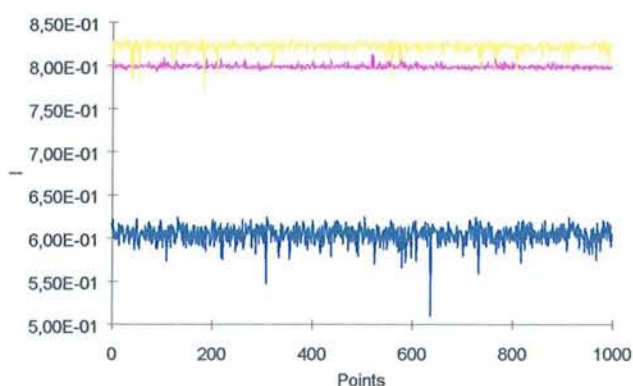
Effets des filtres sur le déclin de la fluorescence du Ru(phen)  $2.10^{-4}$  M dans le PBS suite à une excitation pulsée.



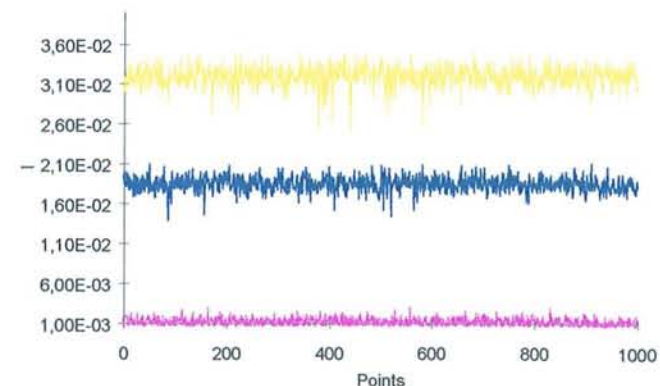
Normalisation et analyse logarithmique de la fluorescence du PBA ( $1\mu\text{M}$ ) dans du PBS.



Normalisation et analyse logarithmique de la fluorescence du Ru(phen)  $2.10^{-4}$  M dans du PBS.



Valeur de l'intensité de fluorescence du PBA ( $1\mu\text{M}$ ) dans du PBS mesurée 150 ns après une excitation pulsée.



Valeur de l'intensité de fluorescence du Ru(phen)  $2.10^{-4}$  M dans le PBA mesurée 150 ns après l'excitation.

**Figure 34a** : Influence des filtres sur la fluorescence du PBA ( $1\mu\text{M}$ ) dans du PBS (pression  $\text{O}_2$  atmosphérique).

**Figure 34b** : Influence des filtres sur la fluorescence du Ru(phen) ( $10^{-4}$  M) dans du PBS (pression  $\text{O}_2$  atmosphérique).

**Figure 34** : Influence des filtres sur le déclin des intensités de fluorescence du PBA,  $1\mu\text{M}$  (Fig.34a) et du Ru(phen),  $2.10^{-4}$  M (Fig.34b) dans du PBS.  $+20\text{ }^\circ\text{C}$ .

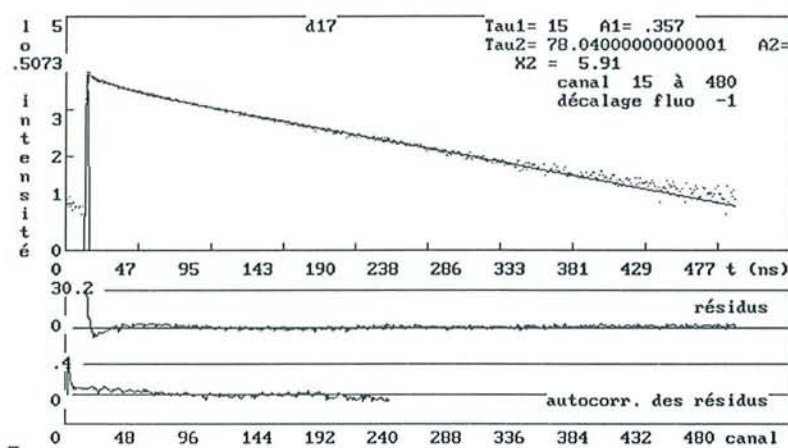


### II.2.11.2) Comptage monophotonique

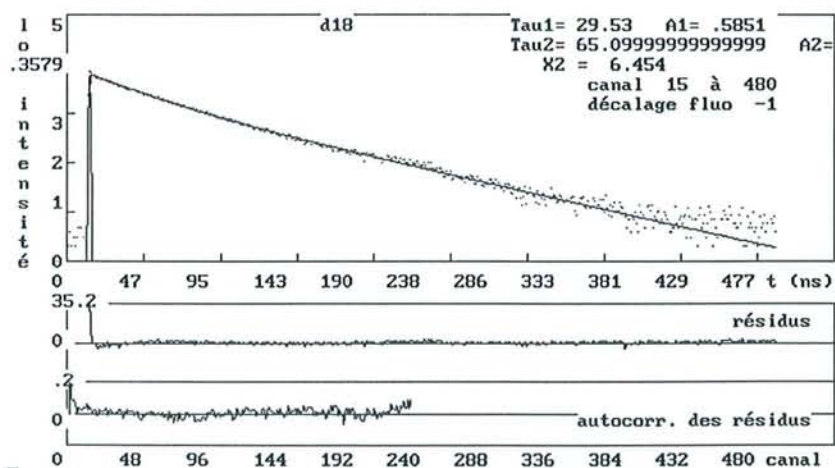
Les durées de vie du PDA en absence d'oxygène pour des suspensions de membranes érythrocytaires (100 mg/mL) ont été mesurées avec ou sans incubation dans un tampon riche en hémisuccinate de cholestérol ( $10^{-3}$  M ou  $10^{-4}$  M). Ces mesures avaient pour but d'évaluer l'incidence du cholestérol sur le déclin de fluorescence du PDA. Les valeurs des durées de vie reportées sur ces graphiques (Figure 29) sont multipliées par un facteur correctif (temps par canal) de 1,13. Les résultats sont les suivants :

Témoin	Mono-exponentiel	$\tau = 53,08$ ns , $\chi^2 = 3,76$
	Bi-exponentiel	$\tau_1 = 30,14$ ns et $\tau_2 = 65,79$ ns , $\chi^2 = 1,45$
Cholestérol $10^{-4}$ M	Mono-exponentiel	$\tau = 58,88$ ns , $\chi^2 = 2,47$
	Bi-exponentiel	$\tau_1 = 41,99$ ns , $\tau_2 = 77,39$ ns , $\chi^2 = 0,84$
Cholestérol $10^{-3}$ M	Mon-oexponentiel	$\tau = 74,06$ ns , $\chi^2 = 2,19$
	Bi-exponentiel	$\tau_1 = 38,13$ ns et $\tau_2 = 85,13$ ns , $\chi^2 = 0,92$

#### Avec incubation (Cholestérol, $10^{-3}$ M)



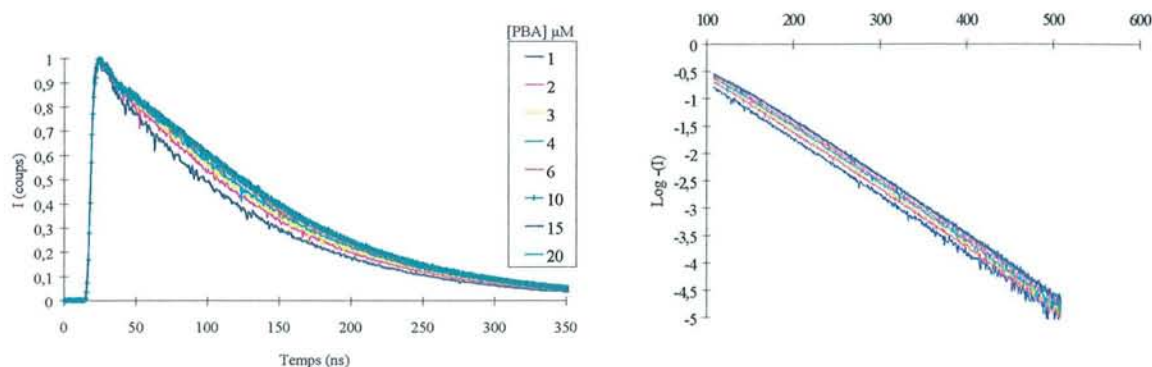
#### Sans incubation



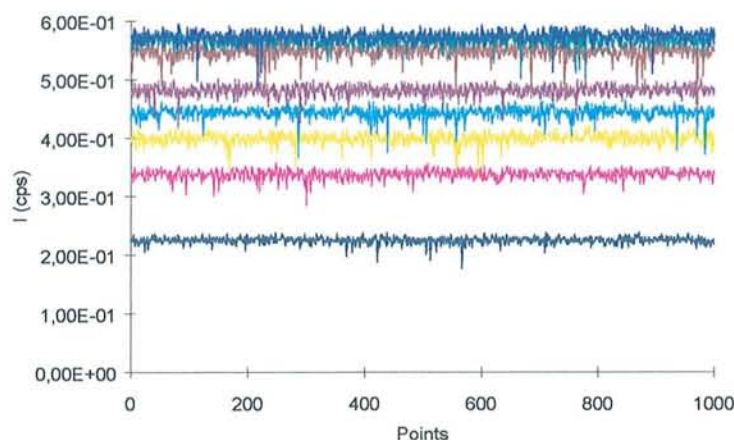
**Figure 29** : Détermination de la durée de vie du PDA ( $1 \mu\text{M}$ ) dans une suspension de membranes d'érythrocyte, par la régression bi-exponentielle du déclin de la fluorescence, en présence ou non de cholestérol.  $\text{PO}_2 = 1$ . +  $20^\circ\text{C}$ .

b) Influence de la concentration en sonde dans un solvant (EtOH)

Les réglages sont les suivants : fenêtre : 3ns; gain : 0,420 ; sensibilité: 2 Volts. Le signal est recueilli en mode Scan par balayage de la porte (Figure 30) ou en mode statique (150 ns) après l'excitation (Figure 31).



**Figure 30** : Déclin du signal de fluorescence avec le temps en fonction de la concentration en PBA ( $\mu\text{M}$ ) dans du PBS.



**Figure 31** : Déclin en mode statique du signal de fluorescence mesuré 150 ns après l'excitation. La légende des couleurs est identique à celle des deux graphiques précédents.

Les résultats (Figure 32) montrent une courbe en cloche pour la représentation des intensités de fluorescence en fonction de la concentration alors que les valeurs des durées de vie restent constantes ( $96 \pm 2$  ns). La concentration en fluorophore n'affecte donc pas les valeurs des durées de vie déterminées avec le système Boxcar.

### II.2.11.3) Boxcar MC et mesure sur une suspension cellulaire

#### a) *Influence des filtres sur le signal de fluorescence*

Au regard des caractéristiques spectroscopiques différentes aussi bien à l'excitation qu'à l'émission pour les différentes sondes utilisées dans ce travail (dérivés pyréniques et du ruthénium), nous avons étudié l'influence des filtres sur les déterminations des valeurs des durées de vie de fluorescence du PBA ( $1 \mu\text{M}$ ) et du Ru(phen)  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  dans le PBS (Figure 34).

Les valeurs des durées de vie calculées sur cinq mesures pour chaque filtre sont les suivantes :

Pyrène:

Filtre 22520AM5067	$92 \pm 4 \text{ ns}$
Filtre 400SF10AM6276	$97 \pm 5 \text{ ns}$
Filtre 380SF10AM6276	$100 \pm 2 \text{ ns}$

Ru(Phen):

Filtre 600FS80-25AM29528-01	$294 \pm 10 \text{ ns}$
Filtre BA515IF	$454 \pm 7 \text{ ns}$

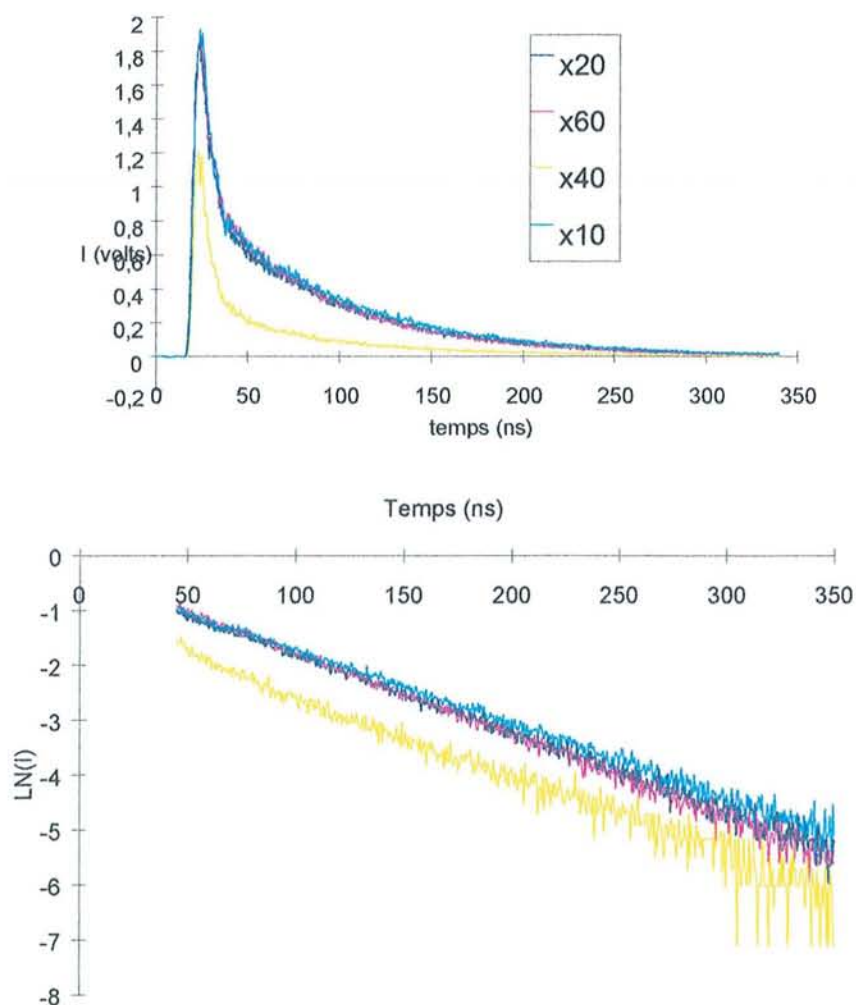
La détermination des durées de vie par le système Boxcar est en principe indépendante des niveaux des intensités de fluorescence puisqu'elle ne dépend en théorie que de leurs déclin. Les différences au niveau des valeurs des durées de vie calculées pourraient s'expliquer par une absorption du signal lumineux par les filtres. Dans notre cas, la différence est due aux seuils de coupure de ces filtres.

Dans les expériences portant sur les dérivés du pyrène et du ruthénium, nous utiliserons respectivement le filtre 380SF10AM6276 et le filtre BA515IF.

Objectif	Durée de vie (ns)
10	$74 \pm 3$ ns
20	$69 \pm 5$ ns
40	$68 \pm 8$ ns
60	$66 \pm 6$ ns

**Tableau 10** : Valeurs des durées de vie du PBA dans une monocouche de cellules endothéliales en fonction de l'objectif utilisé en microscopie.

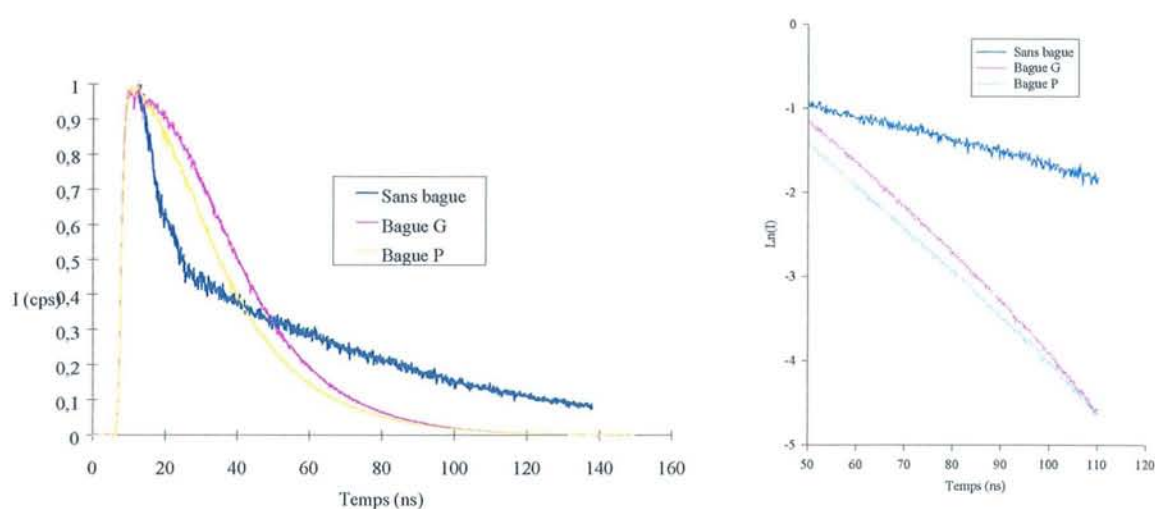
Pour les applications ultérieures (sauf précision contraire) l'objectif x20 sera utilisé puisqu'il correspond d'une part à un bon compromis entre l'ouverture numérique et le grossissement et d'autre part permet l'observation de nombreuses cellules de grande tailles ( $\varnothing$  30  $\mu$ m).



**Figure 33** : Déclin du signal de fluorescence avec le temps recueilli à l'aide des objectifs 10, 20, 40 et 60 x.

### b) Influence de la bague de correction plastique/verre de l'objectif

Des bagues spécifiques des objectifs sont fournies par le constructeur du microscope et corrigent les différences des indices de réfraction de la lumière en fonction de l'épaisseur des matériaux (verre ou plastique). Elles sont particulièrement bien adaptées à l'observation en lumière transmise d'échantillons microscopiques en boîte de culture (plastique) ou sur lames (verre). Nous avons mesuré les durées de vie du PBA ( $1 \mu\text{M}$ ) localisé dans la membrane des cellules endothéliales à confluence avec et sans les bagues de correction G (glass pour verre) ou P (plastique). Les résultats sont montrés sur la Figure 35. Les différentes valeurs des durées de vie mesurées pour trois expériences ( $68,9 \pm 5 \text{ ns}$  ;  $17,4 \pm 4 \text{ ns}$  et  $18,9 \pm 3 \text{ ns}$  respectivement sans bague, avec bague G et avec bague P) nous ont conduits à retirer les bagues pour les mesures des signaux de fluorescence.

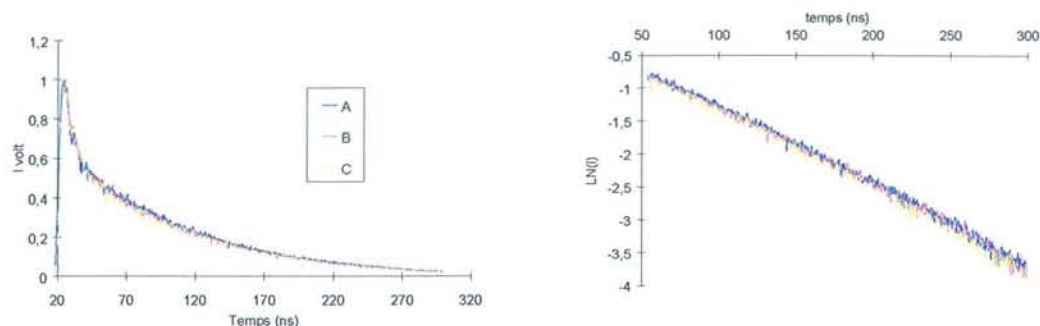


**Figure 35 :** Déclin de la fluorescence avec le temps sans bagues et avec bagues G et P.

### c) Influence de la mise au point/focalisation

La netteté de l'objet microscopique, c'est-à-dire sa "mise au point" optique a-t-elle une influence sur le signal de fluorescence recueilli par le photomultiplicateur ? En d'autres termes, le flou généré par les plans adjacents au plan objet (qui peut être corrigé par déconvolution numérique) est-il un paramètre important à considérer pour la détermination des durées de vie ? La fluorescence du PBA ( $1 \mu\text{M}$ ) est recueillie à l'aide d'un objectif x20 sur une monocouche de cellules endothéliales, avec mise au point (A) et après manèment de la vis micrométrique pour obtenir deux plans extrêmes flous (B) et (C). La Figure 35bis montre le déclin de la fluorescence avec le temps pour chaque cas, pour une  $\text{PO}_2$  atmosphérique (0,21), avec une fenêtre de mesure de 3 ns, un gain de 0,570 et une échelle de sensibilité de 2 Volts. Les valeurs des durées de vie mesurées pour les positions A, B et C sont respectivement de  $83,3 \text{ ns} \pm 2 \text{ ns}$ ,  $84 \pm 4 \text{ ns}$  et  $83,6 \pm 1 \text{ ns}$ . La mise au point sur la

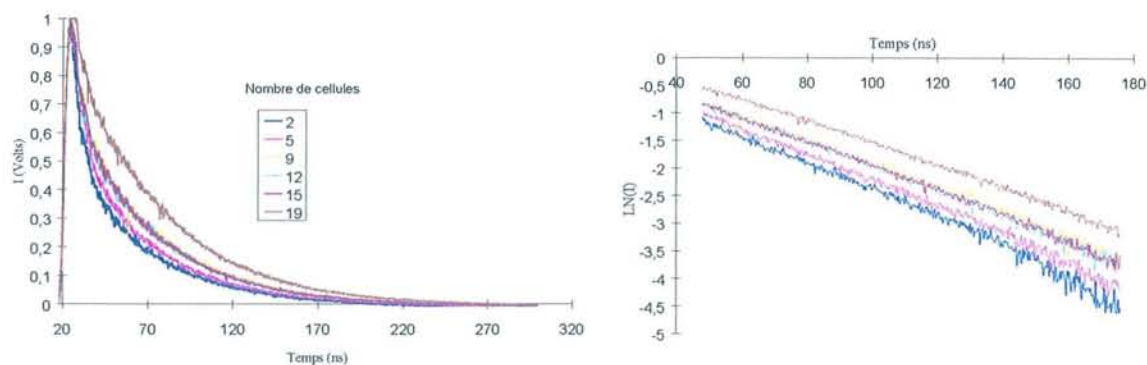
monocouche cellulaire fluorescente entraîne une émission de fluorescence dans différents plans (flou ou halo), et l'ensemble de l'intensité de fluorescence est recueillie quel que soit le plan observé. Il n'en résulte pas de variation significative dans les valeurs mesurées des durées de vie.



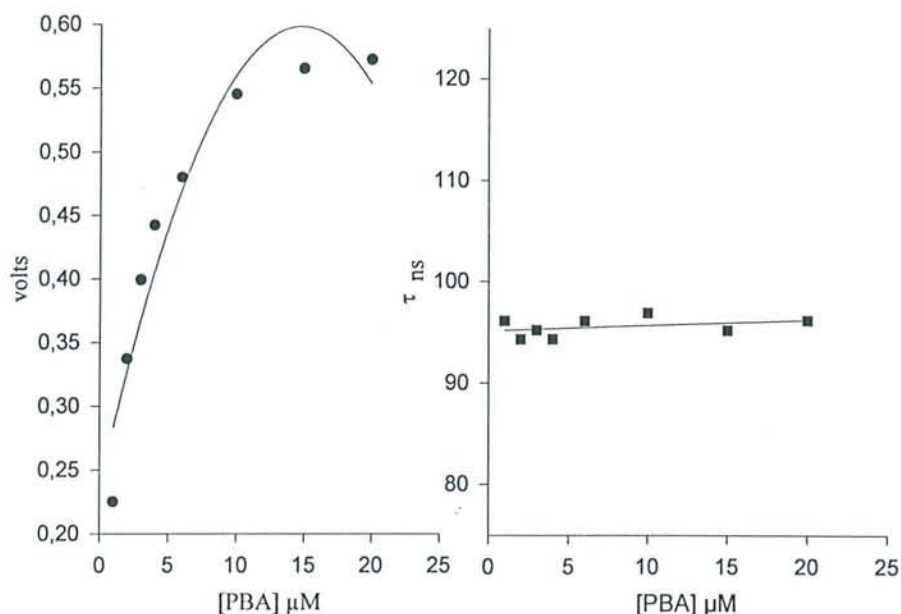
**Figure 35 bis** : Déclin de la fluorescence du PBA (1  $\mu\text{M}$ ) incorporé dans une monocouche de CE à 20 °C selon la mise au point de l'objet.  $\text{PO}_2 = 0,21$ .

d) *Influence du nombre de cellules observées dans l'objectif*

La Figure 36 montre le déclin de fluorescence du PBA (1  $\mu\text{M}$ ) incorporé dans une monocouche en fonction du nombre de cellules (de 2 à 19) observées à l'aide d'un objectif x20. Cette expérience a été réalisée dans une chambre d'analyse en présence de 100 % d' $\text{O}_2$ . Les valeurs des durées de vie (mesurées sur trois expériences) sont  $39 \pm 3$ ,  $41 \pm 2$ ,  $44 \pm 3$ ,  $44 \pm 1$ ,  $44 \pm 3$  et  $49 \pm 2$  ns pour respectivement 2, 5, 9, 12, 15 et 19 cellules observées. Il est à noter que ces valeurs ne sont pas significativement différentes de celles obtenues dans les mêmes conditions sur un tapis entier de cellules ( $51 \pm 4$  ns), ce qui vérifie que la variation des intensités de fluorescence n'affecte pas les déterminations des durées de vie avec le système Boxcar et que la distribution du PBA dans les cellules est homogène.



**Figure 36** : Déclin du signal de fluorescence du PBA (1  $\mu\text{M}$ ) avec le temps dans une monocouche de cellules endothéliales selon le nombre de cellules observées dans une chambre d'analyse en microscopie saturée en oxygène (100 %).



**Figure 32** : Evolution des valeurs des intensités et des durées de vie de fluorescence en fonction de la concentration en PBA à 20 °C dans l'EtOH.

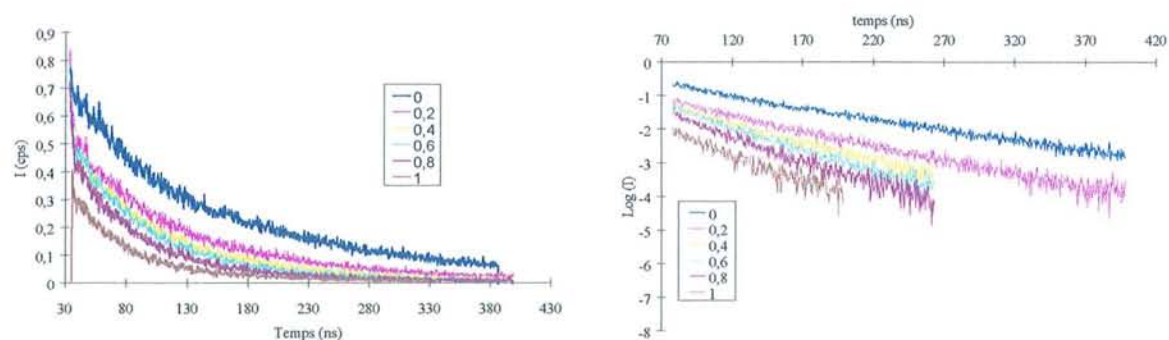
#### II.2.11.4) Boxcar **MM** (microscope) et mesure sur une monocouche cellulaire

##### a) *Influence de l'objectif*

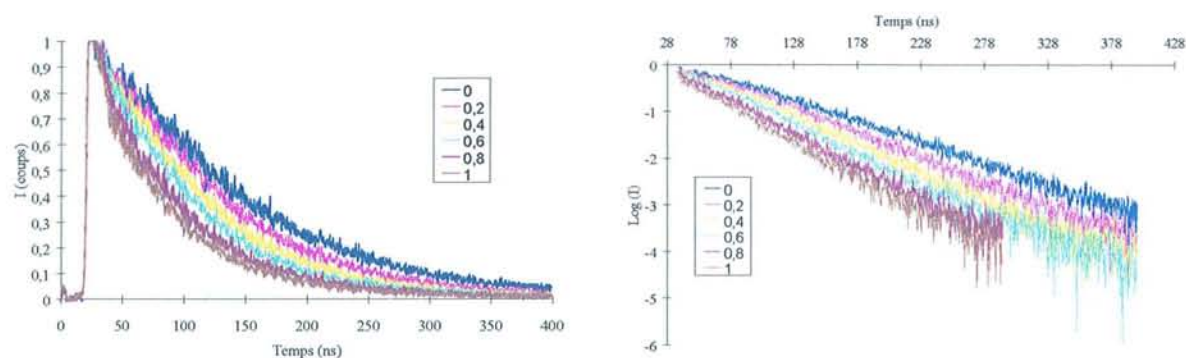
Le microscope IX-70 Olympus est équipé de 5 objectifs (CPL 10xPH/0,25 - LCPLFL 20xPH/0,40 - LCPLFL 40xPH/0,60 - LCPLFL 60x/0,7 - SP 100x-0,95 Olympus) montés sur une tourelle manuelle. Ceux-ci ont respectivement des grossissements de 10, 20, 40, 60 et 100 fois et sont spécifiquement traités UV pour une utilisation optimale en fluorescence. En recueillant le signal de fluorescence à l'aide de chacun de ces objectifs, nous avons déterminé la durée de vie du PBA incorporé dans une monocouche de cellules endothéliales à +25 °C sans conditions particulières d'oxygénation. La Figure 33 montre le signal de fluorescence pour chacun de ces objectifs et la régression linéaire en mode logarithmique. Les valeurs moyennes des durées de vie de quatre expériences sont rassemblées dans le Tableau 10.

### e) *Effet de l'état de confluence*

Lorsque le support de culture (lamelle ou boîte) des cellules endothéliales est entièrement recouvert, l'état de confluence est atteint c'est-à-dire que les cellules se présentent sous l'aspect d'une monocouche cellulaire (inhibition de contact). Pour nos expériences, l'état de non confluence, c'est-à-dire l'absence de jonction entre les îlots épithéloïdes, pourrait avoir une importance non négligeable sur le déclin du signal de fluorescence et ceci pour plusieurs raisons : formation d'excimères intermoléculaires entre cellules adjacentes, diffusion des gaz latéralement aussi bien que transversalement, etc. Pour en évaluer l'importance, nous avons mesuré le déclin de la fluorescence du PBA ( $1 \mu\text{M}$ ) avec le temps des cellules endothéliales en l'état de confluence (Figure 37) ou de non confluence (Figure 38), et ceci en présence de différentes  $\text{PO}_2$  dans une chambre d'analyse. Les constantes d'inhibition dynamiques ( $K_d$ ) sont déterminées à partir des représentations  $\tau_0/\tau$  vs  $\text{PO}_2$  (Figure 39) et mettent en évidence l'influence de l'état de confluence sur le phénomène de diffusion de l'oxygène. La valeur de la constante  $K_d$  à l'état confluent ( $1,33 \text{ atm}^{-1}$ ) est du même ordre de grandeur que celle obtenue par ailleurs dans ce travail et diffère considérablement de celle obtenue à l'état de non confluence ( $0,61 \text{ atm}^{-1}$ ). Dorénavant, pour toutes les études portant sur des cellules endothéliales en microscopie à fluorescence, l'état de confluence est admis.



**Figure 37** : Déclin de la fluorescence du PBA ( $1 \mu\text{M}$ ) en fonction de la  $\text{PO}_2$  pour des cellules endothéliales à l'état confluent.



**Figure 38** : Déclin de la fluorescence du PBA ( $1 \mu\text{M}$ ) avec le temps en fonction de la  $\text{PO}_2$  pour des cellules endothéliales ne formant pas de monocouche (à l'état non confluent).

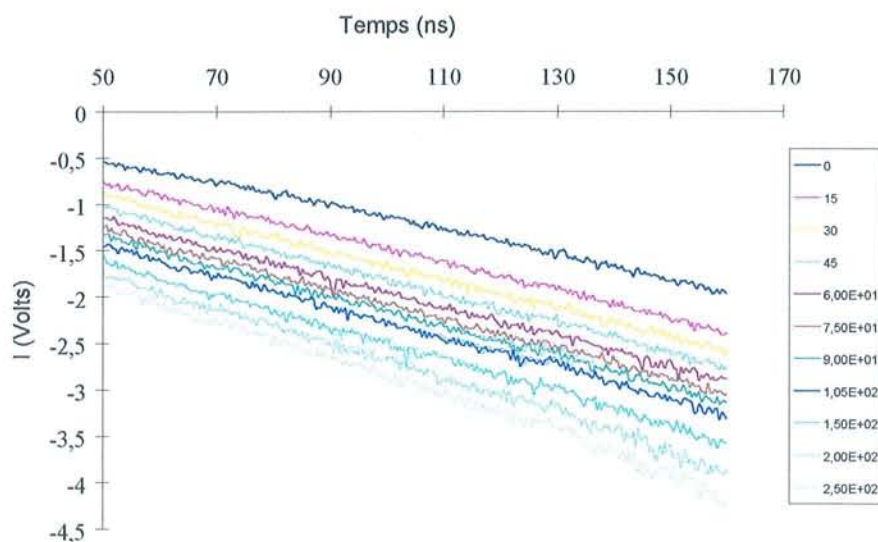




Durée d'illumination en secondes (lampe HBO)	Durée de vie du PBA
0	76,9 ± 3 ns
0,25	77 ± 2 ns
0,5	76 ± 5 ns
0,75	76 ± 4 ns
1	75 ± 3 ns
1,5	78 ± 1 ns
2	76 ± 4 ns
3	77 ± 5 ns
4	71 ± 1 ns
5	72 ± 3 ns
10	67 ± 5 ns

15	68,0 ± 4 ns
30	65,3 ± 7 ns
45	64,1 ± 5 ns
60	63,2 ± 8 ns
75	62,5 ± 4 ns
90	61,3 ± 3 ns
105	60,6 ± 8 ns
150	58,8 ± 9 ns
200	52,3 ± 8 ns
250	49,0 ± 11 ns

**Tableau 11 :** Effet du temps d'illumination d'une monocouche de cellules endothéliales marquées (PBA 1 $\mu$ M) à l'aide d'une excitation continue HBO 100W sur les valeurs des durées de vie.



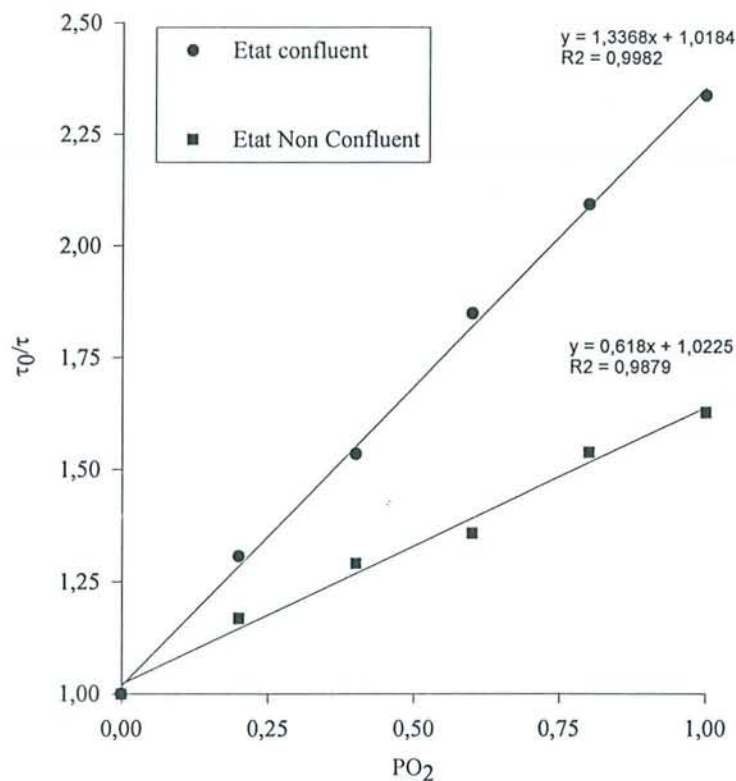
**Figure 40 :** Influence de la durée d'illumination d'une monocouche de cellules endothéliales) sur le déclin du logarithme de la fluorescence du PBA (1 $\mu$ M) avec le temps.

#### II.2.11.5) Comparaison entre les techniques de détermination des durées de vie

Nous avons mené une étude comparative sur l'inhibition de la fluorescence du PBA par l'oxygène dans un solvant (EtOH) d'une part et dans une suspension de membranes érythrocytaires d'autre part. Les résultats obtenus, à l'aide des trois méthodes, ont confirmé la bonne concordance des modes de détermination (cf. tableau 12).

Ces valeurs restent assez proches, du même ordre de grandeur malgré quelques légères différences attribuées au traitement des déclinés de la fluorescence.





**Figure 39** : Représentation de Stern-Volmer. Evolution de l'inhibition des durées de vie par l'oxygène selon l'état de confluence des cellules endothéliales en culture.

#### f) *Influence du temps d'exposition*

Le temps d'exposition d'un fluorophore à une source d'excitation constitue un paramètre important et sa photosabilité conditionne la validité des expériences de quantification du signal de fluorescence. Pour vérifier si une excitation continue (330-360 nm) à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure HBO 100 W est à l'origine de ce phénomène de photodégradation, nous avons déterminé les valeurs des durées de vie après différentes durées d'illumination. Une monocouche de cellules endothéliales en culture marquée avec du PBA (1  $\mu$ M) est illuminée pendant des temps différents (de 0 à 250 s). Les déterminations des durées de vie sont ensuite effectuées à partir d'une excitation pulsée à 337 nm. La Figure 40 montre l'évolution de la fluorescence recueillie à l'aide d'un objectif x20 en fonction des temps d'exposition (de 0 à 250 s) dans une chambre d'analyse pour une PO<sub>2</sub> atmosphérique. Les moyennes des résultats de trois expériences (Tableau 11) font état d'une diminution des valeurs des durées de vie après une illumination de 3 s. Au-delà de ce temps, les molécules sondes ont subi un grand nombre d'excitation et la photostabilité diminue pour atteindre 49 ns après 250 s.



Milieu	Méthode		
	Comptage monophotonique	Fluorimétrie de phase	Boxcar MC
EtOH	1,5 ± 0,15	1,35 ± 0,1	1,44 ± 0,2
Membrane	1,8 ± 0,4	1,29 ± 0,3	-

**Tableau 12** : Valeurs des constantes d'inhibition dynamiques du PBA par l'oxygène ( $K_d$  en  $\text{atm}^{-1}$  pour trois méthodes et dans deux milieux (EtOH et membrane érythrocytaire).

#### II.2.11.6) Qualités des mesures

La qualité des mesures varie selon la méthode et l'instrumentation utilisée.

##### a) *Fluorimétrie de phase*

La qualité de la mesure repose essentiellement sur le choix du fluorophore de référence. En effet, celui-ci doit posséder une durée de vie unique, comme le diphénylanthracène (9,24 ns dans l'éthanol) ou le glycoène (0 ns dans l'eau). La valeur de la durée de vie de la référence doit correspondre au plus près à celle attendue pour l'échantillon. La gamme de fréquence de modulation est également importante pour détecter plusieurs durées de vie d'un fluorophore. La précision de la mesure est donnée par la répartition des valeurs de déphasage  $\phi$  et du facteur de démodulation rapportée à la valeur 0 (en %). Le choix du modèle est validé par les valeurs calculées du  $\chi^2$  (proches de 1 lorsque le modèle est bon).

Les déterminations des durées de vie à l'aide de la fluorimétrie de phase sont très reproductibles et la précision porte sur des valeurs de l'ordre de la picoseconde.

##### b) *Système de type Boxcar*

La principale source d'erreurs est la position des bornes entre lesquelles est faite la régression. Dans le cas du Ru(phen) incorporé dans le gel de gélatine, le déclin est mono-exponentiel. Cette situation ne se retrouve pas dans tous les cas avec les dérivés pyréniques.

Il est possible d'améliorer le rapport signal sur bruit en considérant la moyenne de l'intensité mesurée sur un nombre d'éclairs laser définis  $N_{\text{avg}}$ . Les bruits de moyenne nulle (bruits blancs) sont alors éliminés. Ce paramètre est à considérer lorsque les intensités sont faibles

(rapport signal sur bruit faible) comme dans le cas d'une inhibition totale de fluorescence par l'oxygène et lorsque le gain du photomultiplicateur est figé. Dans notre cas, le moyennage est fixé à 3, ce qui est un bon compromis entre le temps d'une expérience (3 x 1000 mesures) et la précision des résultats. L'erreur maximale dans ces conditions est de 4 % (Gouin, 1996).

### c) Comptage monophotonique

La qualité des résultats est donnée par la valeur du  $\chi^2$  mais une meilleure précision est apportée par l'estimation des résidus et de l'auto-corrélation entre eux. Si leur répartition est aléatoire autour de zéro et de faible amplitude, on considère que le modèle est bon. Si le modèle ne suit pas correctement les points expérimentaux, les résidus présentent une variation non aléatoire par rapport à zéro.

En cas de doute (bruit de fond important) le caractère aléatoire est donné par le résultat provenant du calcul de l'auto-corrélation des résidus.

#### II.2.11.7) Précision des valeurs de $\tau_0$

La représentation de Stern-Volmer est classiquement utilisée pour déterminer les constantes d'inhibition. La constante  $K_d$  est définie comme la pente de la droite des rapports  $\tau_0/\tau$  en fonction de la  $PO_2$ . Il apparaît clairement que la valeur de  $\tau_0$  a une importance fondamentale sur la valeur de ce rapport et donc sur celle de  $K_d$ . Pour limiter les incertitudes, nous avons calculé  $\tau_0$  d'après les valeurs de la durée de vie acquise sur toute la gamme de la  $PO_2$ . En effet  $1/\tau$  varie avec la  $PO_2$  de manière linéaire.

La valeur de  $\tau_0$  est ainsi définie comme la valeur à l'origine de la droite de régression obtenue avec les valeurs de  $1/\tau$ . La pente de cette droite donne la valeur de la constante de vitesse de la réaction d'inhibition  $k_q$ . En absence d'inhibition de type statique  $K_{sv} = k_q \cdot \tau_0$ .

*TROISIEME PARTIE*

*Résultats et discussions*



### III.1) EFFET DE L'HEMOGLOBINE SUR LA FLUORESCENCE

#### III.1.1.) INFLUENCE DU GLUTARALDEHYDE SUR LA DIFFUSION DE L'OXYGENE DANS LES HEMATIES

##### Article 1 :

**Effect of glutaraldehyde on hemoglobin-dependent quenching of pyrene fluorescence. Application to oxygen diffusion in erythrocyte. Clin Hemorheol (1997), 5 (sous presse).  
D Dumas, F Gouin, ML Viriot, JF Stoltz.**

Dans cet article, nous avons appliqué le phénomène d'inhibition de fluorescence par l'oxygène moléculaire sur des suspensions de globules rouges marquées à l'aide de dérivés pyréniques. De nombreuses études considèrent la bicouche membranaire comme la principale barrière au passage diffusif de l'oxygène (Stroeve et al, 1976). Pour apprécier l'influence des propriétés rhéologiques de la membrane sur la diffusion de l'oxygène, le degré de rigidification des cellules était contrôlé par la concentration en glutaraldéhyde ajoutée (% v/v). Nous devions également nous affranchir du phénomène d'inhibition de fluorescence par transfert d'énergie entre les molécules d'hémoglobine et les molécules des dérivés pyréniques. Nous avons mis à profit deux caractéristiques physico-chimiques du glutaraldéhyde.

En premier lieu, le glutaraldéhyde présente la particularité d'induire une rigidification des membranes cellulaires. Il est en effet souvent utilisé comme fixateur en microscopie électronique.

En second lieu, le glutaraldéhyde possède la capacité chimique de polymériser les molécules d'hémoglobine. Ceci se traduit par une diminution du nombre de molécules d'hémoglobine libre (non polymérisées) présentant la potentialité d'inhiber la fluorescence par un transfert d'énergie non radiatif.

Le taux de polymérisation des molécules d'hémoglobine a été suivi par le rapport des valeurs des absorbances respectivement à 420 nm (hémoglobine) et 341 nm (acide pyrène butyrique, PBA). Il apparaît très nettement que l'absorption spécifique liée aux molécules d'hémoglobine libre diminue avec l'augmentation du taux de glutaraldéhyde.

Les propriétés rhéologiques microscopiques sont également affectées. Nous avons montré que les propriétés élongationnelles des hématies soumises à un champ de cisaillement variaient avec la concentration (en %) de glutaraldéhyde ajouté. La déformabilité cellulaire atteint un minimum pour la plus grande concentration de glutaraldéhyde.

L'influence du glutaraldéhyde sur les propriétés rhéologiques au niveau moléculaire (fluidité) a été étudiée par une technique de formation d'excimères intermoléculaires, dont la cinétique de formation est limitée par la diffusion l'une vers l'autre des molécules d'acide pyrène dodécanoïque (PDA). Les résultats ont confirmé une diminution de la fluidité membranaire avec la concentration en glutaraldéhyde.

L'inhibition de la fluorescence du PBA par les molécules d'hémoglobine est levée en partie par la polymérisation des molécules d'hémoglobine. Ce phénomène s'observe très nettement par une plus grande amplitude des signaux d'intensité de fluorescence du PBA en présence de quantité croissante de glutaraldéhyde.

La constante d'inhibition statique ( $K_{sv}$ ), calculée comme la pente de la droite de régression selon la représentation classique de Stern-Volmer ( $F_0/F$  vs  $PO_2$ ) augmente avec le taux de rigidification membranaire. Ces données indiquent que l'accessibilité du PBA à l'oxygène diminue avec le degré de rigidification de la membrane. Ces résultats soulignent le fait que la membrane rigidifiée présente effectivement une résistance significative à la diffusion passive de l'oxygène.

En conclusion, la polymérisation des molécules d'hémoglobine sous l'action du glutaraldéhyde qui s'accompagne également d'une rigidification tant membranaire que cellulaire, se révèle être un modèle efficace et simple d'emploi pour l'étude de la diffusion de l'oxygène par inhibition de fluorescence des dérivés pyréniques. Cependant, cette rigidification artificielle se révèle être un handicap majeur pour une étude dans des conditions physiologiques.

---

# Effect of glutaraldehyde on hemoglobin-dependent quenching of pyrene fluorescence. Application to oxygen diffusion in erythrocyte\*

D. Dumas<sup>a,\*\*</sup>, F. Gouin<sup>a,\*\*\*</sup>, M.-L. Viriot<sup>b</sup> and J.-F. Stoltz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Hémorhéologie-Angiohématologie, EA 1728, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>b</sup>DCPR (GRAPP)-URA 328 CNRS, ENSIC-INPL, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France

**Abstract.** In the present study, we investigate the effect of glutaraldehyde incorporation on the erythrocyte deformability, membrane fluidity and process of molecular oxygen diffusion. The erythrocyte deformability variations were inversely related with the glutaraldehyde concentration incorporated. The membrane fluidity, as assessed by a method based on the kinetics of pyrene dodecanoic acid excimers formation, decreased as the glutaraldehyde concentration increased. So, we verified that glutaraldehyde incorporation was accompanied by membrane rigidification. In the presence of glutaraldehyde, decreased absorption of hemoglobin heme group (420 nm) and decreased hemoglobin-dependent quenching of pyrene butyric acid (PBA) fluorescence would result from hemoglobin polymerization. Using a technique of fluorescence intensity quenching by molecular oxygen (accessibility to oxygen), we showed that oxygen diffusion was decreased in the presence of glutaraldehyde. To conclude, membrane rigidification induced by glutaraldehyde incorporation would affect oxygen molecular process.

## 1. Introduction

Non-invasive optical procedures are obviously the methods of choice for probing oxygen concentration in the biologic membrane. Few techniques have been developed to quantify the diffusiveness of oxygen in biologic membrane but they all suffer major flaws [11,13]. A direct technique of pyrene fluorescence quenching by molecular oxygen in erythrocyte membrane was proposed [16]. If a given solvent is very viscous, then the diffusion of the quencher (molecular oxygen) decreases and the quenching is decreased. Hence, the quenching of pyrene fluorescence is used to study oxygen molecular transport processes on a larger scale. Depending on the chemical structure of these probes, interactions with other more or less specific intrinsic inhibitors (hemoglobin in erythrocyte) constitute a secondary pathway towards fluorescence quenching [6,14]. Pyrene emission is quenched

---

\*Manuscript presented at the Symposium on Cellular Aggregation and Adhesion held at the 21st French Congress on Biomechanics and the 9th French Congress on Biorheology, September 1996. Organized by Prof. Dr. J.-F. Stoltz.

\*\*Address to which correspondance should be sent: Fax: +33 03 83 59 26 43; Email: Dumas@hemato.u-nancy.fr.

\*\*\*Grant for Ph.D. by Negma Laboratories-Toussous Le Noble.

by non-radiative energy transfer to hemoglobin [2]. The Förster distance for the pyrene-hemoglobin donor acceptor system (43 Å) is within the order of magnitude of the membrane bilayer thickness [6]. To escape the influence of allosteric effectors and of hemoglobin, we used erythrocyte membrane to investigate the correlation between incorporation of cholesterol on rheological properties (membrane deformability, osmotic fragility [3]), on membrane fluidity and on oxygen diffusion [4]. The effect of cholesterol on lipid dynamics is similar to that of glutaraldehyde on protein network [15]. For these two products, the mechanical properties of the membrane revealed a membrane rigidification. So, human erythrocytes extensively cross-linked with glutaraldehyde displayed very high mechanical resistance [10], but still bind oxygen completely and reversibly [1]. It was shown that glutaraldehyde penetrated the membrane and resulted in the cross-linking of hemoglobin molecules (polymerized hemoglobin) [12,15]. The conformation and ligation state of hemoglobin during the glutaraldehyde reaction are important in determining the functional behaviour of fixed cells. It is generally assumed that the predominant site of reaction of glutaraldehyde with the hemoglobin tetramer is at the  $\epsilon$ -amino group of the lysine residues and the N-terminal amino groups, where Schiff bases are formed.

In this work, pyrene butyric acid (PBA) was anchored on the internal part of the erythrocyte membrane surface and the efficiency of hemoglobin polymerization by glutaraldehyde was used to study the behavior of the PBA fluorescence. We examined the effects of glutaraldehyde on hemoglobin-dependent quenching and on oxygen diffusion. We have also verified that glutaraldehyde incorporation was accompanied by membrane rigidification (fluidity of fixed erythrocyte membrane and erythrocyte deformability).

## 2. Materials and methods

*Fixed erythrocyte preparation.* Human red cells suspensions (Etablissement de Transfusion sanguine, Vandoeuvre-les-Nancy) were washed three times in PBS. Erythrocytes treated with glutaraldehyde was obtained as follows: erythrocytes (at 20% hematocrit) were immersed in glutaraldehyde solution (0.001–0.1%) for 30 min at 4°C, then washed with Sorensen medium. In oxygen quenching experiments, 3  $\mu$ l stock solutions pyrene butyric acid (PBA, Molecular Probes, Eugene City, OR, USA, 1 mM in dimethylformamide) were added to 1 ml of the fixed or normal erythrocyte suspension in 2 ml PBS. After incubation for 30 min, the ratio of absorbance values 420 nm [9] (isosbestic wavelength for hemoglobin) to 341 nm (PBA) was determined (Beckman UV-DU640 spectrophotometer). In membrane fluidity experiments, 15  $\mu$ l pyrene dodecanoic acid (PDA, Molecular Probes, Eugene City, OR, USA, 1mM in dimethylformamide) was added to 1 ml of the erythrocyte suspension in 2 ml PBS. The concentration (5  $\mu$ M) was checked using a molar extinction coefficient of  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 343 nm.

*Erythrocyte deformability.* Erythrocyte deformability was assessed by determining a non-dimensional elongation index of erythrocyte under the tangential stress applied according to the principle of light diffraction by particles. Measurements are made using a viscosimeter (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser) (Academic Medical Center, Amsterdam) and the method was described in early study [3].

*Membrane fluidity.* The ratio of steady-state excimer ( $I_{\text{exc}}$ , 475 nm) to monomer ( $I_{\text{mono}}$ , 376 nm) fluorescence emission has been regarded as a measure of the resistance of membrane against lateral diffusion of the monomer and is used as an index to evaluate the membrane fluidity [7]. In this

experiment, the lower value of  $I_{exc}/I_{mono}$  observed in erythrocyte suspension can be related to a reduced mobility of unquenched PDA (by hemoglobin). Fluorescence ratio were recorded on a Spex Fluoromax-2 spectrofluorometer with excitation wavelength at 343 nm.

*Oxygen diffusion.* The fluorescence intensity of the fluorescent probe decreases as the quencher (oxygen) concentration increases. The ratio of a fluorescent probe intensities in the absence ( $F_0$ ) and in the presence ( $F$ ) of oxygen obeys, as a first approximation, to  $F_0/F = 1 + K_{sv} [O_2]$  with  $K_{sv}$  the Stern–Volmer steady quenching constant [8]. The bimolecular quenching constant  $K_q$  represents the collision frequency between PBA and oxygen. Fluorescence spectra and intensity were measured with a Spex Fluoromax-2. Excitation wavelength was 343 nm.

### 3. Results

*Absorbance spectrum.* PBA monomer fluorescence band overlaps with the Soret absorption band of Hb heme group. It appeared of some interest to investigate the related change of light absorbance in the Soret band of hemoglobin in fixed and normal erythrocytes. There is a detectable change in the absorbance spectrum of normal and fixed erythrocyte by various glutaraldehyde concentrations in the presence of given PBA concentration. The ratio of absorbance values (420 to 341 nm) decreased after incorporation of glutaraldehyde: 1.86, 1.03, 0.72 and 0.95 with, respectively, 0, 0.0125, 0.0250 and 0.05 glutaraldehyde solution (%). For higher glutaraldehyde concentration, the spectrum totally lost its original characteristics due to the domination of polymerized hemoglobin.

*Erythrocyte deformability.* The results represent the evolution in elongation index according to the shear stress applied to a suspension of normal and fixed erythrocytes. When erythrocytes are exposed to glutaraldehyde, the elongation index values decreased progressively with the concentration of glutaraldehyde, as demonstrated in Fig. 1. The deformability of erythrocytes was significantly reduced: the erythrocytes became more rigid and less deformable.

*Membrane fluidity.* Under the conditions used for labelling (PDA, 5  $\mu$ M), the results reveal a decrease of  $I_{exc}/I_{mono}$  according to the glutaraldehyde erythrocyte level. Membrane fluidity clearly distinguish normal from fixed cells with glutaraldehyde (Fig. 2).

*Effect of glutaraldehyde on PBA fluorescence spectra and intensity.* Figure 3 shows the fluorescence spectra of PBA (1  $\mu$ M) in erythrocyte suspension with various glutaraldehyde amount (%). Fluorescence intensity is markedly increased in the fixed erythrocytes as compared to the normal erythrocyte. In accord with energy transfer to heme in the normal erythrocytes, PBA fluorescence is quenched in absence of glutaraldehyde. It can be seen that hemoglobin-dependent quenching of PBA fluorescence is decreased.

*Influence of glutaraldehyde on PBA accessibility to oxygen.* Figure 4 shows the Stern–Volmer plot for the quenching of PBA by molecular oxygen. PBA accessibility to oxygen decreased significantly after incorporation of glutaraldehyde suspension (from 0 to 0.1%). Fluorescence inhibition by oxygen is a relative measurement ( $I_0/I$ ) which constantly integrates a possible influence of the membrane fluidity.

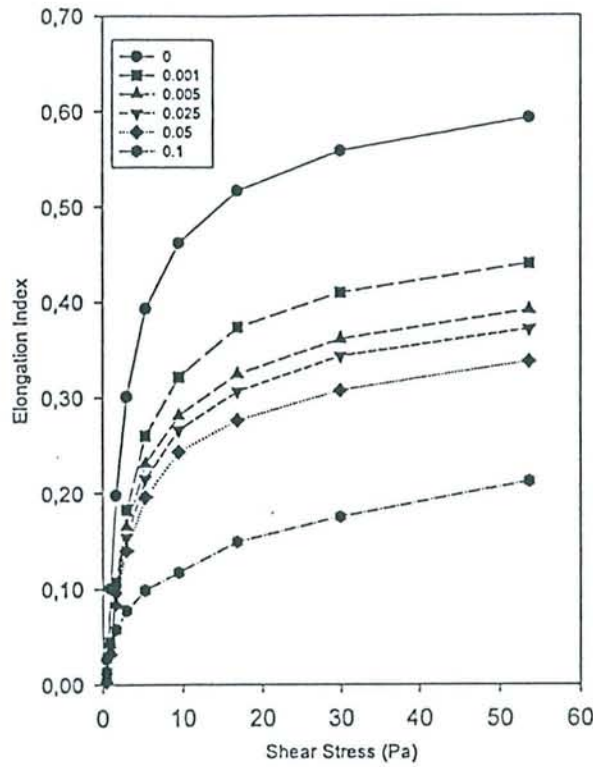


Fig. 1. Variations of elongation index according to the tangential stress applied to erythrocyte incubated at 25°C in the presence of various glutaraldehyde concentrations.

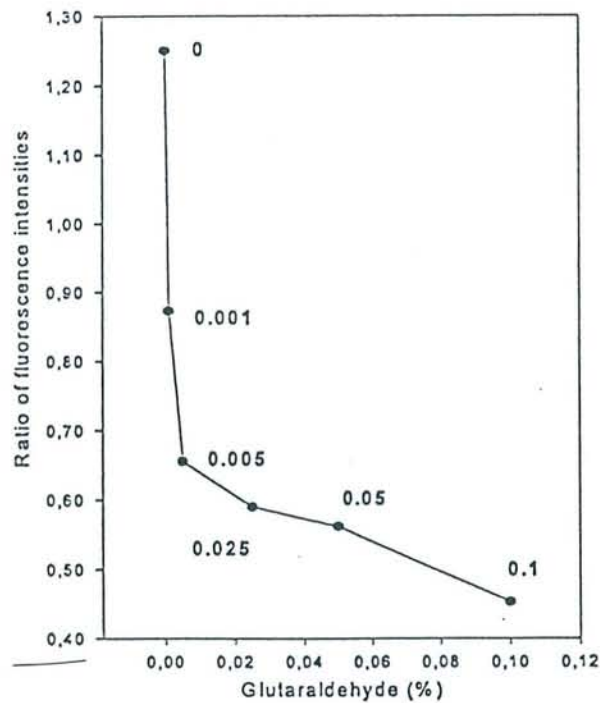


Fig. 2. Membrane fluidity: the ratios of PDA (5 μM) emission at 475 nm over emission at 376 nm ( $I_{exc}/I_{mono}$ ) as a function of glutaraldehyde amount (%) added in erythrocyte suspension.

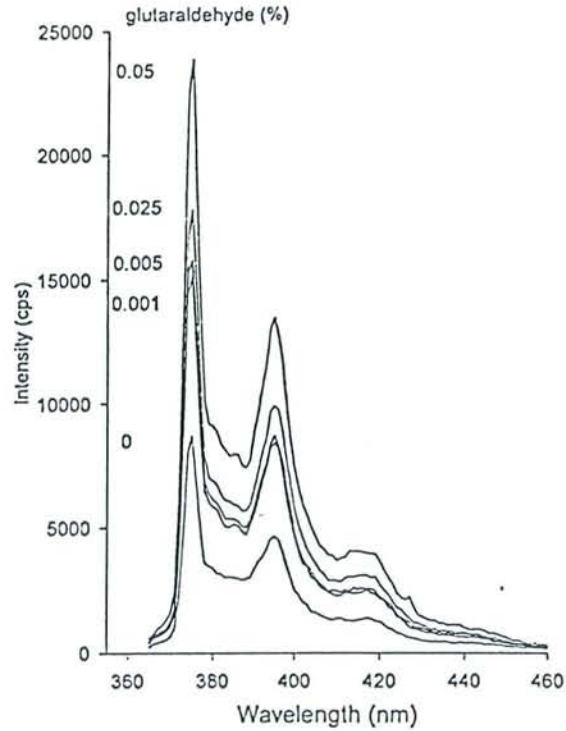


Fig. 3. Change of the fluorescence spectrum of PBA in normal and fixed erythrocyte suspension (various glutaraldehyde %) in the absence of oxygen.

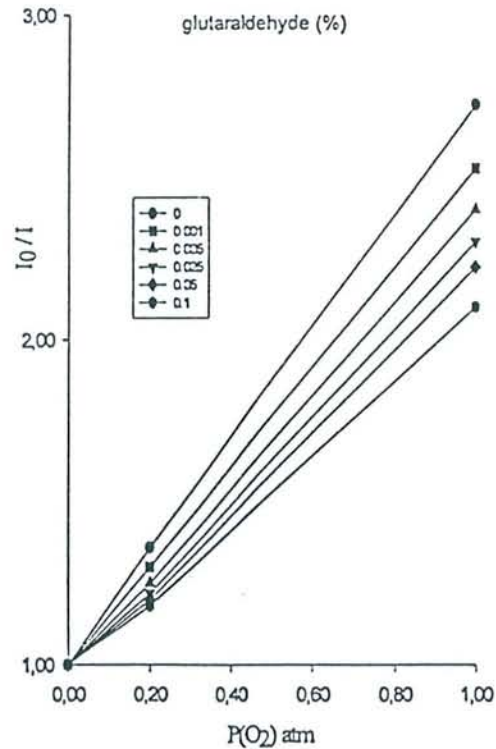


Fig. 4. Stern-Volmer plots for quenching of PBA by molecular oxygen in normal and fixed erythrocyte suspension (various glutaraldehyde %).

#### 4. Discussion and conclusion

We have demonstrated a close relation between the erythrocyte deformability, the membrane fluidity and the added glutaraldehyde concentration (%). So, we verified erythrocyte membrane rigidification induced by glutaraldehyde. Decreased absorption of Hb heme group (420 nm) would result from increased hemoglobin polymerization by glutaraldehyde. Consequently, the subsequent increase of fluorescence PBA, as the concentration of glutaraldehyde increases, can be attributed to a decrease of PBA fluorescence quenching by hemoglobin. This quenching has been widely recognized as the result of energy transfer from the PBA molecule to the hemoglobin molecule. The membrane rigidification linked to glutaraldehyde reaction would reduce oxygen diffusiveness on the lipid bilayer surface (in which PBA is incorporated). These results were not observed with the pyrene dodecanoic acid (data not shown), incorporated in the middle of the membrane bilayer. The influence of hemoglobin on quenching fluorescence by oxygen is not constant in all experiments because of varying absorption of Hb heme group with various glutaraldehyde concentrations. But fluorescence inhibition by oxygen is a relative measurement and would reflect membrane rigidification induced by glutaraldehyde. In conclusion, the extensive network of protein cross-linking which results from the glutaraldehyde reaction is effective in modifying the diffusion of oxygen molecule.

#### Acknowledgements

This work was partly supported by a grant of Région de Lorraine on Optical Engineering Programme.

#### References

- [1] A. Bellelli, P.L. Benedetti, M. Coletta, R. Ippoliti and M. Brunori, Human erythrocytes cross-linked with glutaraldehyde general properties and significance as a blood substitute, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 156(2) (1988), 970–977.
- [2] G. Celedon, C. Behn, Y. Montalar, M. Bagnara and C.P. Sotomayor, Transbilayer asymmetry of pyrene mobility in human spherocytic red cell membranes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1104 (1992), 243–249.
- [3] D. Dumas, J. Didelon, J.C. Humbert, T. Gigout, R.J. Rasia and J.F. Stoltz, Influence du cholestérol sur la déformabilité cellulaire et la fragilité osmotique des hématies, *Journal des Maladies Vasculaires* 21(3) (1996), 181–184.
- [4] D. Dumas, S. Muller, F. Baros, F. Gouin, M.L. Viriot, A. Taccoen and J.F. Stoltz, Mesure de la diffusivité de l'oxygène par inhibition de fluorescence de sondes pyréniques dans la membrane d'érythrocyte enrichie en cholestérol, *Journal of Chemical Physics* 94 (1997), 1–17.
- [5] J. Eisinger and J. Flores, Cytosol-membrane interface of human erythrocytes, *Biophysical Journal* 41 (1983), 367–379.
- [6] J. Eisinger, J. Flores and W.P. Petersen, A milling crowd model for local and long-range obstructed lateral diffusion. Mobility of excimeric probes in the membrane of intact erythrocyte, *Biophysical Journal* 49 (1986), 987–1001.
- [7] C.G. Ellis, M.L. Ellsworth and R.N. Pittman, Determination of red blood cell oxygenation *in vivo* by dual video densitometric image analysis, *American Journal of Physiology* 258 (1990), H1216–H1223.
- [8] S. Fischkoff and J.M. Vanderkooi, Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorophore pyrene, *The Journal of General Physiology* 65 (1975), 663–676.
- [9] H.J. Galla and E. Sackmann, Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes use of pyrene excimers as optical probes, *Biochimica et Biophysica Acta* 339 (1974), 103–115.
- [10] R.S. Heusinkveld, D.A. Goldstein, R.I. Weed and P.L. Lacelle, Effect of protein modification on erythrocyte membrane mechanical properties, *Blood Cells* 3 (1977), 175–182.
- [11] L. Hoofd, Z. Turek and S. Egginton, Concentric oxygen diffusion in tissue with heterogeneous permeability and consumption, in: *Oxygen Transport to Tissue*, Vol. 12, J. Piiper, ed., Plenum Press, 1990.
- [12] M. Komorowska, M. Koter, G. Bartosk and J. Gomulkiewicz, The effects of glutaraldehyde and osmium tetroxide on the erythrocyte membrane, *Biochimica et Biophysica Acta* 686 (1982), 94–98.
- [13] A.S. Popel, Theory of oxygen transport to tissue, *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 3 (1989), 257–321.



- [14] D. Schachter, U. Cogan and R.E. Abbott, Asymmetry of lipid dynamics in human erythrocyte membranes studied with permeant fluorophores, *Biochemistry* 21 (1982), 2146–2150.
- [15] T. Suda, N. Maeda and T. Shiga, Effect of cholesterol on human erythrocyte membrane, *Journal of Biochemistry* 87 (1980), 1703–1713.
- [16] J.M. Vanderkooi, J.M. Green and D.F. Wilson, Pyrene, a probe of lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes, *Biochemistry* 13(19) (1974), 4000–4006.

### III.1.2) INFLUENCE DU TAUX D'HEMOGLOBINE RESIDUELLE MEMBRANAIRE SUR LE SIGNAL DE FLUORESCENCE

Les résultats précédents ont mis en évidence l'effet inhibiteur de l'hémoglobine sur le signal d'émission de fluorescence. L'utilisation du glutaraldéhyde permet de s'affranchir de ce phénomène mais ne constitue qu'un modèle d'étude qui ne se rencontre pas dans l'organisme. De plus, il présente l'inconvénient de rigidifier les cellules même à très faibles concentrations.

Une autre approche a été mise en œuvre. Elle consiste à produire des érythrocytes débarassées de leur contenu en hémoglobine, c'est-à-dire pour obtenir des membranes refermées suite à une hémolyse. De nombreux travaux ont porté sur la membrane du globule rouge ("ghost" ou fantôme) qui constitue maintenant un modèle d'étude des membranes biologiques en général. Divers protocoles furent établis en vue de préparer des membranes plus ou moins particulières (retournées, fermées, ...). Cependant, peu d'études ont porté sur l'incidence des molécules d'hémoglobine résiduelle sur le signal d'émission de fluorescence (Yguerabide, 1994). Ces molécules seraient ancrées à la surface interne de la membrane et persistent aux divers lavages préconisés par les protocoles de préparation des membranes. Elles participeraient directement à l'inhibition du signal de fluorescence au même titre que l'oxygène.

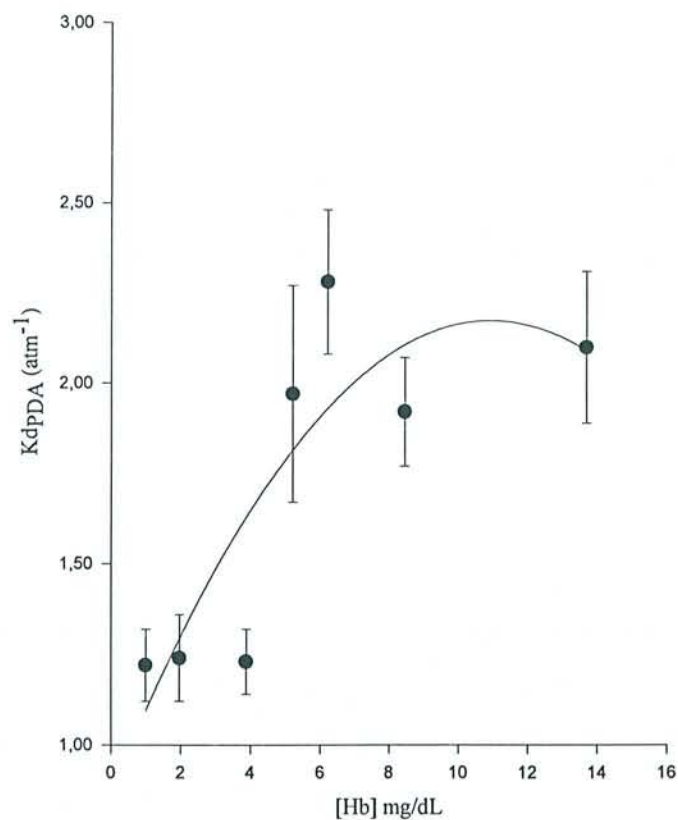
Nous nous sommes ainsi intéressés à l'influence de la concentration en hémoglobine résiduelle membranaire sur les valeurs des anisotropies de fluorescence du DPH ( $\langle r_{\text{DPH}} \rangle$ ) ainsi que sur les valeurs des durées de vie du PDA ( $\tau$ ). Celles-ci furent mesurées par fluorimétrie de phase dans des cuvettes à circulation. Les résultats de trois expériences sont rassemblés dans le Tableau 13.

Nombre de lavages	[Hb] mg/dL	$\langle r_{\text{DPH}} \rangle$	$\tau_0$ (ns) PO <sub>2</sub> = 0	$\tau_{0,2}$ (ns) PO <sub>2</sub> = 0,2	$\tau_1$ (ns) PO <sub>2</sub> = 1
3	13,71 ± 3,5	0,264 ± 0,001	174 ± 7	136 ± 4	57 ± 2
4	8,48 ± 1,48	0,260 ± 0,002	182 ± 3	129 ± 7	62 ± 5
5	6,24 ± 1,01	0,262 ± 0,003	184 ± 3	146 ± 2	57 ± 7
6	5,23 ± 0,44	0,254 ± 0,06	181 ± 1	135 ± 5	61 ± 3
7	3,89 ± 1,21	0,258 ± 0,01	200 ± 2	140 ± 5	87 ± 1
8	1,97 ± 0,51	0,256 ± 0,03	198 ± 4	139 ± 1	86 ± 4
9	-	0,260 ± 0,06	199 ± 1	140 ± 2	87 ± 7

**Tableau 13** : Influence de la concentration en hémoglobine résiduelle membranaire sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du DPH et les valeurs des durées de vie du PDA.

Les constantes d'inhibition dynamique de l'acide pyrène dodécanoïque ( $K_{d_{PDA}}$ ) sont calculées comme la pente de la représentation  $\tau_0/\tau$  en fonction de  $PO_2$ . Il apparaît clairement que la présence de molécules résiduelles d'hémoglobine n'a pas d'effet sur la fluidité membranaire ( $\langle r_{DPH} \rangle$ ) alors que son influence est importante sur les valeurs de  $\tau_{PDA}$  ( $K_{d_{PDA}}$ ). Les sondes DPH et PDA sont préférentiellement localisées dans les régions profondes de la membrane, au niveau des chaînes hydrophobes des phospholipides. La présence des molécules d'hémoglobine constitue une seconde voie d'inhibition de la fluorescence du PDA (Figure 41). Ce phénomène est maintenu reconnu comme le résultat d'un transfert d'énergie entre les molécules de pyrène (émission de fluorescence entre 376 et 420 nm pour le monomère) et les molécules d'hémoglobine (absorption entre 400 et 420 nm) (Schachter et al, 1982 ; Celedon et al, 1992). Ceci est permis par l'incorporation du PDA dans la région profonde de la membrane, ce qui augmente la probabilité de proximité avec les molécules d'hémoglobine.

Suite à ces données, le protocole de préparation des membranes comporte 8 lavages afin de s'assurer que le phénomène d'inhibition observé est uniquement dû à la présence de molécules d'oxygène moléculaire.



**Figure 41** : Evolution de la constante d'inhibition dynamique du PDA en fonction de la concentration en molécules d'hémoglobine résiduelle membranaire.

### III.2) EFFET DE LA RIGIDIFICATION MEMBRANAIRE SUR LA DIFFUSION DE L'OXYGENE DANS LA MEMBRANE D'ERYTHROCYTE

La perte de l'asymétrie de la bicouche membranaire correspond à des situations où la déformabilité est diminuée par une anomalie de constituants protéiques ou lipidiques (Mohandas et al, 1993). Le maintien de l'asymétrie de la membrane et des propriétés viscoélastiques (déformabilité...) est ainsi largement dépendant de l'intégrité du cytosquelette membranaire.

De la déformabilité érythrocytaire dépend en partie le phénomène d'agrégation, en interrelation avec le paramètre plus global qu'est la viscosité sanguine.

On rencontre par exemple des agrégats pathologiques d'hématies au cours de l'infarctus du myocarde, des artériopathies aux différents stades d'évolution et d'une façon générale au cours de pathologies cardio-vasculaires ischémiantes.

Certaines pathologies sont directement reliées à des caractéristiques constitutionnelles membranaires précises associées ou non à l'hémoglobine (drépanocytose, élyptocytose, pathologies hémolytiques) (Orntoft et Clausen, 1994).

L'accumulation de cholestérol augmente la surface membranaire et entraîne une diminution de la fluidité membranaire, de la déformabilité par rigidification membranaire (acanthocytose congénitale, syndrome de Zieve...). Certains auteurs l'ont confirmé (Poss et al, 1990) et d'autres ont tenté d'y associer une baisse du coefficient de diffusion de l'oxygène au niveau cellulaire (Uchida et al, 1992 ; Fischkoff et Vanderkooi, 1975).

De manière très nette, la relation entre la déformabilité érythrocytaire, la viscosité sanguine et le transport global de l'oxygène était admise depuis longtemps (Shiga et al, 1979). Une approche plus fine qui consiste à étudier la diffusibilité de l'oxygène à travers la membrane érythrocytaire restait à envisager.

L'hypoxie occasionnée par une baisse de la diffusivité de l'oxygène à travers la membrane de l'érythrocyte semblerait liée en grande partie aux caractéristiques rhéologiques de la membrane (Kikuchi et al, 1994).

A ce jour, cette relation n'a pas été montrée à l'échelle membranaire. Il paraissait intéressant de recueillir des informations expérimentales sur le comportement rhéologique membranaire afin de les confronter à des données provenant d'expériences de mesure de diffusion de l'oxygène sur les mêmes échantillons.

L'impact d'une telle étude pour la compréhension des phénomènes de transport globaux de l'oxygène dans certaines pathologies est à prendre en considération. En effet, associer un déficit du transport diffusif de l'oxygène à une anomalie constitutionnelle propre à la membrane érythrocytaire donne une nouvelle approche du phénomène d'hypoxie dans les pathologies ischémiantes.

Pour réaliser cet objectif, et préalablement à l'étude de la diffusion de l'oxygène, l'élaboration d'un modèle qui permet de vérifier, contrôler et maîtriser le phénomène de rigidification membranaire a dû être développé.

C'est la raison pour laquelle nous avons étudié dans un premier temps les effets du cholestérol sur les propriétés rhéologiques de la membrane, particulièrement la déformabilité et la fragilité à l'hémolyse.

### III.2.1) INFLUENCE DU CHOLESTÉROL SUR LA DÉFORMABILITÉ ET LA FRAGILITÉ OSMOTIQUE

Article 2 :

**Influence du cholestérol sur la déformabilité cellulaire et la fragilité osmotique des hématies. Journal des Maladies Vasculaires (1996), 21, 3, 181-184. D Dumas, J Didelon, JC Humbert, T Gigout, RJ Rasia, JF Stoltz.**

Ces résultats ont également fait l'objet d'une seconde publication :

Influencia del colesterol en membrana sobre la deformabilidad y la fragilidad osmotica eritrocitarias. "Acta Bioquimica Clinica Latino-america". D Dumas, J Didelon, JC Humbert, T Gigout, RJ Valverde, RF Rasia, JF Stoltz.

L'érythrocyte mature perd sa capacité à synthétiser le cholestérol. Il s'établit cependant un renouvellement permanent par un échange équilibré entre le cholestérol de la couche externe et le cholestérol libre associé aux lipoprotéines. Etant donné qu'aucun récepteur membranaire spécifique des lipoprotéines n'a été mis en évidence au niveau de l'érythrocyte, les échanges semblent s'effectuer par diffusion. Nous avons mis à profit cet échange pour incorporer différentes quantités de cholestérol au sein de la membrane érythrocytaire. Il s'agit en fait d'hémisuccinate de cholestérol qui est miscible dans les solvants aux concentrations utilisées (Bach et al, 1995). La quantité totale de cholestérol incorporé dans la membrane est déterminée par un dosage colorimétrique et la concentration en protéine à l'aide d'un kit commercial. Nous avons ainsi défini le rapport des concentrations en cholestérol et en protéines (C/Pt) comme un index, en relation avec la compressibilité de la membrane (rigidité membranaire). En effet, l'influence des protéines sur la dynamique de la membrane est similaire à celle du cholestérol. Les valeurs extrêmes du rapport C/Pt sont 0,18 et 0,83.

Nous avons cherché à caractériser les propriétés rhéologiques de ces cellules suite à l'incorporation de cholestérol, à l'aide de deux méthodes : la détermination de la déformabilité érythrocytaire et la mesure de la résistance à l'hémolyse hypotonique lente.

La déformabilité (cf. Annexe 2) est une propriété fondamentale des érythrocytes qui permet à ces derniers de circuler dans des vaisseaux de diamètre de trois inférieur au leur

(capillaires). Cette propriété rhéologique microscopique conditionne l'écoulement des hématies dans la microcirculation et affecte l'oxygénation des tissus.

La résistance à l'hémolyse reflète la capacité d'une membrane à diminuer ou résorber certaines contraintes (Serova et al, 1993) liées aux pressions osmotiques (sels) et oncotiques (protéines) exercées sur toute cellule vivante communiquant avec le milieu extérieur. Un appareil a été développé au laboratoire par J. Didelon pour effectuer ce type d'analyse (cf. Annexe 2. Development on an automated, slow dialysis device for measuring erythrocyte osmotic resistance. J Didelon, T Gigout, D Dumas, JC Humbert, G Gauchois, M Gentils, JF Stoltz. Innovation and Technology in Biology and Medicine (1996), 17, (4), 337-351.

Nous avons tenté de relier les résultats relatifs aux deux méthodes d'investigation (déformabilité érythrocytaire et fragilité osmotique). Cette étude nous a permis de développer un modèle de rigidification membranaire permettant des situations extrêmes en terme de degré de fluidité.

# INFLUENCE DU CHOLESTÉROL SUR LA DÉFORMABILITÉ CELLULAIRE ET LA FRAGILITÉ OSMOTIQUE DES HÉMATIES

D. DUMAS (1), J. DIDELOU (1), J.C. HUMBERT (1), T. GIGOUT (1), R.J. RASIA (2), J.F. STOLTZ (1)

(1) Laboratoire d'Hématologie, EA 1728, Faculté de Médecine, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy.

(2) Grupo de Optica Aplicada, IFIR (CONICET-UNR), 2000 Rasio, République d'Argentine.

## RÉSUMÉ :

Influence du cholestérol sur la déformabilité cellulaire et la fragilité osmotique des hématies.

L'influence de l'incorporation d'hémisuccinate de cholestérol sur les propriétés rhéologiques de la membrane érythrocytaire est évaluée par des mesures de déformabilité (index d'élongation) et de fragilité osmotique (« hémolyse initiale »). La concentration en cholestérol est exprimée par le rapport cholestérol/protéine (C/Pt). Les deux approches expérimentales utilisées présentent des sensibilités de réponses différentes d'une part selon les protocoles d'incubation utilisés (12 h 25 °C/12 h 25 °C puis 12 h 37 °C) et d'autre part selon la quantité de cholestérol incorporée dans la membrane (C/Pt de 0.18 à 0.83). Les variations de déformabilité et de fragilité osmotique observées sont en relation inverse avec les concentrations de cholestérol incorporées. Cependant ces deux techniques ne font pas appel aux mêmes types de déformation. Les différences expérimentales observées pour les mesures de déformabilité et de fragilité osmotique sont discutées selon le type de déformation de la membrane et les signaux recueillis par les deux systèmes. (*J Mal Vasc* 1996 ; 21 : pages 181-184).

**Mots-clés :** Hématies. Déformabilité cellulaire. Fragilité osmotique. Cholestérol.

## ABSTRACT :

Effects of cholesterol on the deformability and osmotic fragility of red blood cells.

The effect of cholesterol hemisuccinate incorporation on the rheological properties of the erythrocyte membrane was assessed by measuring deformability (elongation index) and osmotic fragility (« baseline hemolysis »). These two experimental methods have different response sensitivities according to the incubation protocols (12 h 25 °C/12 h 25 °C then 12 h 37 °C) and to the amount of cholesterol incorporated in the membrane (C/Pt from 0.18 to 0.83). The deformability and osmotic fragility variations observed are inversely related with the cholesterol concentrations incorporated. The experimental differences observed in the deformability and osmotic fragility are discussed in view of the type of membrane deformation and of the signals collected by the two systems. (*J Mal Vasc* 1996 ; 21 : pages 181-184).

**Key-words :** Erythrocyte. Cell deformability. Osmotic fragility. Cholesterol.

## INTRODUCTION

Le maintien de l'asymétrie de la membrane des hématies et de ses propriétés viscoélastiques (1) est dépendant de l'intégrité du cytosquelette membranaire (2, 3) et de la répartition des lipides. Ainsi, la « rigidification » de la membrane par accumulation de cholestérol, entraîne une modification de ses propriétés mécaniques (4, 5), de sa fluidité (6) et de sa résistance à la lyse osmotique (7). D'un point de vue physiologique les modifications des propriétés rhéologiques ont comme conséquence une baisse du transport global (8) ou moléculaire de l'oxygène (9, 10). Parmi les approches rhé-

logiques, la mesure de la déformabilité érythrocytaire [fil-trabilité (11), temps de transit dans un capillaire (12), élongation dans un champs de cisaillement (13)] est pratiquée depuis longtemps comme méthode utilisable en diagnostic clinique (14, 15). De même, l'utilisation de la technique d'hémolyse (méthode de « Dacie ») a permis d'utiliser la mesure de la résistance aux solutions hypotoniques comme examen de routine et de proposer un modèle rhéologique du comportement de la membrane (16). Cependant, cette technique manuelle comporte des manipulations longues et les résultats restent peu précis (17).

Dans ce travail, nous avons étudié l'incorporation d'hémisuccinate de cholestérol dans la membrane érythrocytaire et son incidence sur la déformabilité et la résistance à l'hémolyse. Les résultats sont brièvement discutés en terme de sensibilité des réponses obtenues avec les techniques d'approche utilisées en relation avec les formations engendrées (18).

Communication présentée à la session d'Hémorhéologie clinique. XXX<sup>e</sup> Congrès du Collège Français de Pathologie Vasculaire.

Reçu le 30 mai 1996.

Acceptation par le Comité de Rédaction le 10 juin 1996.

Tirés à part : D. DUMAS, adresse ci-dessus.



## MATÉRIELS ET MÉTHODES

## PRÉPARATION DES SUSPENSIONS ÉRYTHROCYTAIRES

Des hématies de donneurs sains prélevés sur anticoagulant ACD (E.T.S de Nancy-Brabois) sont lavées 3 fois avec un tampon phosphate isotonique PH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM et 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mOsm).

L'incorporation d'hémisuccinate de cholestérol est réalisée selon la procédure modifiée décrite par Shinitzky (19) : 2 ml d'une suspension d'érythrocytes à hématocrite 20 % sont ajoutés à un milieu d'incorporation (3,5 % de polyvinyl-pyrrolidone, 0,4 % glucose, 1 % albumine et 0,8 % HEPES) comportant différentes concentrations en hémisuccinate de cholestérol (0,250 mg/ml solubilisé au préalable dans l'éthanol). Un témoin est réalisé dans des conditions similaires, sauf que le milieu d'incorporation ne comporte pas d'hémisuccinate de cholestérol avec toutefois la même proportion en éthanol. Après 12 h d'incubation à température ambiante (25 °C), quelques ml sont prélevés et lavés 3 fois avec du tampon phosphate. La déformabilité et la fragilité osmotique sont alors déterminées sur les suspensions érythrocytaires. La suspension non utilisée est alors incubée 12 h à 37 °C (20) puis lavée 3 fois en tampon phosphate. La déformabilité et la fragilité osmotique sont alors mesurées. La quantité d'hémisuccinate de cholestérol total incorporée dans la membrane après extraction (21) est obtenue par une méthode colorimétrique (22) à partir d'une courbe étalon d'hémisuccinate de cholestérol dans l'éthanol. La concentration en protéine membranaire est déterminée à l'aide d'un kit de dosage (Bicinchoninic acid protein assay, kit Sigma) avec comme standard un mélange d'albumine (50 g/l) et de globulines humaines (30 g/l) (réf. 540-10 Sigma). La concentration en cholestérol est exprimée par le rapport cholestérol / protéine (C/Pt). Les résultats présentés dans ce travail représentent la moyenne de 4 expériences.

## MESURE DE LA DÉFORMABILITÉ ÉRYTHROCYTAIRE

La déformabilité érythrocytaire est approchée par la mesure de l'Index d'Elongation (I.E) en fonction des contraintes tangentielles appliquées selon le principe de diffraction de la lumière par des particules (23). Après régulation de la température (37 °C) 2,5 ml d'une suspension homogène contenant 50 g/l de polyvinyl-pyrrolidone et 10 µl de suspension de globule rouge hématocrite 20 % sont injectés dans l'entrefer d'un viscosimètre (LORCA, « Laser-assisted optical rotational Cell Analyser » (24) (Academic medical center 1105 AZ Amsterdam). L'application de contraintes de cisaillement (de 0,3 à 53,65 Pa.) induit un allongement des hématies et les changements de formes des images de diffraction sont visualisés par projection sur un écran. Pour chaque valeur de la contrainte de cisaillement une caméra vidéo enregistre l'image et un programme permet le calcul de l'index d'élongation (E.I) [EI = (A - B) / (A + B) où A et B correspondent respectivement aux axes verticaux et horizontaux des clichés de diffraction].

## MESURE DE LA FRAGILITÉ OSMOTIQUE PAR HÉMOLYSE LENTE

Le principe de la méthode est de soumettre de façon continue, par dialyse, les hématies à l'action d'un milieu hypotonique décroissant entraînant l'hémolyse progressive des érythrocytes. Les mesures sont effectuées avec un appareil développé au laboratoire (Fragilimètre) et commercialisé par Régulest (ZA Sainte-Agathe, Florange, 57000 France). Après étalonnage pour déterminer les valeurs hautes et basses de la résistivité du milieu de suspension par des électrodes, on injecte 160 µl d'une suspension d'hématie au 1/40 (eau physiologique) dans une enceinte composée d'une membrane à dialyse (spectraPor seuil de coupure 10 000 Daltons) plongée dans 90 ml d'eau distillée. L'hémolyse est suivie à 37 °C par une augmentation de la lumière transmise couplée à une diminution lente et progressive de la concentration saline. Un graphique représente les valeurs de transmission en fonction de la concentration saline de la solution. Un programme informatique de traitement des signaux de l'évolution de la lumière transmise en fonction du temps et de la concentration en électrolytes minéraux donne les valeurs dites « hémolyse initiale » calculée par ajustement à la technique de Dacie pour un seuil de transmission de 2 %.

TABLEAU I. - Valeurs de l'index d'élongation d'hématies incubées avec différents rapports cholestérol/protéine (C/Pt) pour une contrainte de cisaillement de 29,9 Pa.

*Elongation index of red cells incubated with different cholesterol/protein (C/Pt) ratios for a 29.9 Pa shear stress.*

Rapport C/Pt	12 h 25 °C	+ 12 h 37 °C
0,18 (témoin)	0,538 ± 0,011	0,562 ± 0,012
0,19	0,572 ± 0,010	0,579 ± 0,009
0,35	0,523 ± 0,013	0,51 ± 0,011
0,65	0,506 ± 0,014	0,458 ± 0,012
0,71	0,571 ± 0,013	0,191 ± 0,013
0,83	0,421 ± 0,015	0,111 ± 0,012

TABLEAU II. - Hémolyse initiale (g/l NaCl) avec un seuil de transmission de 2 % pour des hématies incubées avec différents rapports cholestérol/protéine (C/Pt).

*Initial hemolysis (g/l NaCl) with a 2 % transmission threshold for red cells incubated with different cholesterol/protein (C/Pt) ratios.*

Rapport C/Pt	12 h 25 °C	+ 12 h 37 °C
0,18 (témoin)	5,62 ± 0,25	6,39 ± 0,26
0,19	5,90 ± 0,27	5,69 ± 0,26
0,35	6,71 ± 0,3	6,35 ± 0,29
0,65	6,92 ± 0,28	7,84 ± 0,29
0,71	7,28 ± 0,28	8,82 ± 0,27
0,83	8,10 ± 0,29	8,85 ± 0,28

## RÉSULTATS

Les expériences ont porté sur des suspensions de globules rouges avec ou sans contact avec différentes concentrations en hémisuccinate de cholestérol. Les déterminations de la déformabilité et de la fragilité osmotique portent d'une part sur des suspensions incubées 12 h à 25 °C et d'autre part sur des suspensions incubées 12 h à température ambiante puis 12 h à 37 °C. La détermination des paramètres rhéologiques après incubation durant 12 h à 37 °C permet de sensibiliser l'examen et de mieux déceler une tendance à une baisse de la résistance osmotique ou de la déformabilité.

## DÉFORMABILITÉ

L'index d'élongation reflète la capacité de déformation des hématies pour les contraintes de cisaillement étudiées. La figure 1 représente les évolutions de cet index en fonction des contraintes tangentielles appliquées pour des globules rouges témoins ou incubés avec différentes doses de cholestérol. Après 12 h d'incubation à 25 °C, la figure 1A montre que l'augmentation du rapport C/Pt (de 0,19 à 0,83) a peu d'incidence sur l'évolution des I.E en fonction des contraintes appliquées (de 0,3 à 53,65 Pa). Ces résultats indiquent que l'incorporation en cholestérol dans la membrane est effective pour un rapport C/Pt de

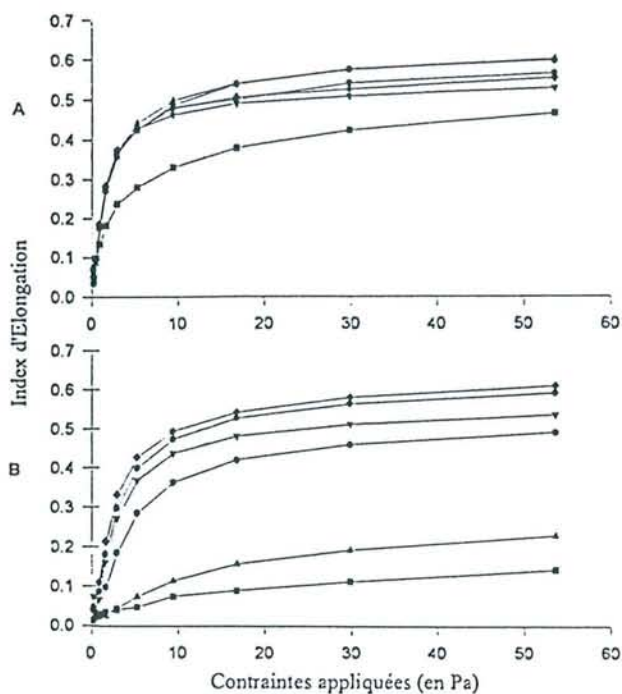


FIG. 1. - Variation de l'Index d'Elongation en fonction des contraintes tangentielles appliquées pour des hématies comportant différents rapports membranaires cholestérol/protéine, incubées 12 h à 25 °C (graphe A) ou 12 h à 25 °C puis 12 h à 37 °C (graphe B).  
 ■ 0,83 ; ▲ 0,71 ; ▼ 0,65 ; ◆ 0,35 ; ● 0,19 ; ● 0,18 (témoin).

Variation of elongation index as a function of tangential stress applied to red blood cells with different cholesterol/protein membrane ratios and incubated at 25 °C for 12 h (curve A) or at 25 °C for 12 h then at 37 ° for 12 h (curve B).

0,83 avec des E.I. significativement diminués. Pour les échantillons incubés 12 h à température ambiante puis 12 h à 37 °C, l'allure de la courbe (fig. 1B) montre, pour chaque contrainte de cisaillement, une diminution des valeurs des I.E. en fonction de la concentration en cholestérol.

Les résultats pour une contrainte de cisaillement de 29,92 Pa. sont présentés dans le *tableau I*. Il apparaît d'une part que l'addition de cholestérol affecte la déformabilité érythrocytaire de manière non proportionnelle au rapport C/Pt (de 0,538 à 0,421). D'autre part l'incubation à 37 °C amplifie le phénomène de diminution de la déformabilité (de 0,562 à 0,111) en respectant l'évolution des rapports C/Pt.

#### FRAGILITÉ OSMOTIQUE

La *figure 2* représente les évolutions des intensités de lumière transmise en fonction de la concentration saline (g/l NaCl) appliquée sur une suspension de globules rouges témoins ou incubés avec différentes concentrations de cholestérol.

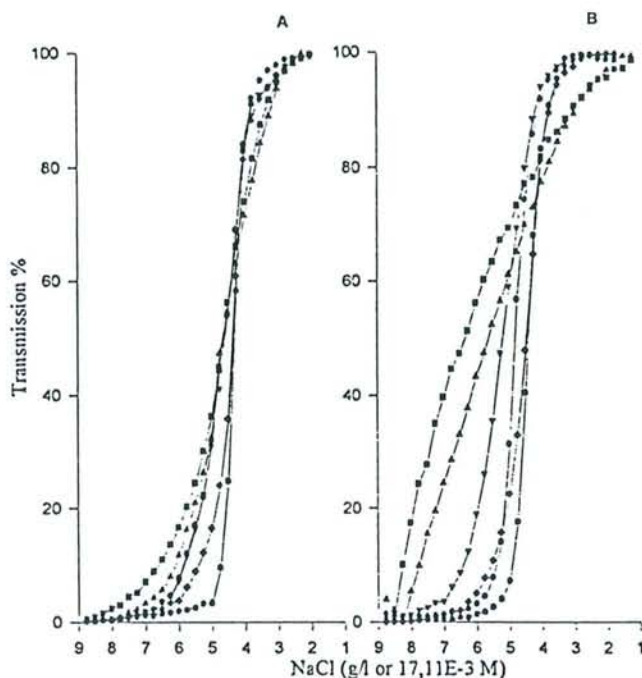


FIG. 2. - Variation de la transmission de lumière en fonction de la concentration saline des suspensions d'hématies comportant différents rapports membranaires cholestérol/protéine incubées 12 h 25 °C (graphe A) ou 12 h 25 °C et 12 h 37 °C (graphe B).  
 ■ 0,83 ; ▲ 0,71 ; ▼ 0,65 ; ◆ 0,35 ; ● 0,19 ; ● 0,18 (témoin).

Variations in light transmission as a function of saline concentration in the suspension of red blood cells with different cholesterol/protein membrane ratios and incubated at 25 °C for 12 h (curve A) or at 25 °C for 12 h then at 37 ° for 12 h (curve B).

Après 12 h d'incubation à température ambiante (fig. 2A), les courbes de fragilité osmotique (de forme sigmoïdale) se situent de part et d'autre de la courbe témoin mais reflètent les différents rapports C/Pt dans la membrane (de 0,18 à 0,83). Les valeurs de l'« hémolyse initiale » croissent régulièrement (de 5,62 à 8,1 g/l NaCl) avec le rapport C/Pt (*tableau II*). Après une nouvelle incubation de 12 h à 37 °C (fig. 2B) les courbes reflètent une plus grande sensibilité à l'hémolyse pour des concentrations salines supérieures.

#### DISCUSSION

L'altération des propriétés rhéologiques de la membrane érythrocytaire se traduit par une diminution de l'aptitude à se déformer de la cellule et se révèle *in vitro* par une augmentation de sa fragilité. Dans ce travail, nous avons vérifié que l'incorporation de cholestérol entraîne une baisse de la déformabilité et une augmentation de la fragilité osmotique mais les résultats ne sont pas exactement superposables selon l'approche utilisée. Sur des hématies incubées 12 h à 25 °C il apparaît que l'évolution de la déformabilité jusqu'à une contrainte de cisaillement de 29,92 Pa n'est que peu dose-dépendante. Dans les mêmes conditions d'incubation les expériences réalisées

avec le fragilimètre indiquent que les valeurs calculées de l'« hémolyse initiale » augmentent avec la concentration en cholestérol. Pour les suspensions de globules rouges incubées 12 h à 25 °C puis 12 h à 37 °C, les deux techniques permettent d'apprécier les variations de déformabilité et de fragilité osmotique selon la concentration en cholestérol. Nous avons cependant observé que la méthode par diffraction laser présentait une sensibilité de réponse particulière qui distingue deux classes pour chaque expérience. Ces faits donnent à penser que les déformations membranaires engendrées par le système (augmentation de la surface pour l'hémolyse ou du rayon de courbure cellulaire pour le cisaillement) seraient à l'origine de ces différences (15). Au cours de l'hémolyse, le processus de gonflement de l'hématie est lent et permet à tout instant l'équilibre osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Au moment où le rayon de l'hématie, devenant sphérique, atteint un rayon critique pour une certaine concentration saline, il y a ouverture de pores dans la membrane et hémolyse. L'incorporation de cholestérol dans la membrane peut être suivie par le gonflement du globule rouge en solution hypotonique. Le Fragilimètre permettrait de suivre cette augmentation de volume en mesurant la transmission lumineuse en fonction du degré d'hémolyse mais également la variation de la déformation membranaire par la quantification de la diffusion « avant ».

### CONCLUSION

Dans ce travail, deux méthodes d'approche différentes ont été mises en œuvre pour étudier l'influence de l'incorporation d'hémisuccinate de cholestérol sur les propriétés mécaniques de la membrane érythrocytaire. Pour des concentrations en cholestérol croissantes, les mesures de déformabilité ne permettent pas d'observer de différences significatives après 12 h d'incubation alors qu'une seconde incubation met le phénomène de rigidification en évidence par rapport au témoin. Dans les mêmes conditions expérimentales, les mesures de fragilité osmotique indiquent clairement que cette technique d'hémolyse décèle un phénomène quantifiable proportionnel à la concentration en cholestérol. D'autres travaux sont en cours pour améliorer l'approche méthodologique du calcul des paramètres de la fragilité osmotique en particulier au niveau du suivi des déformations membranaires au cours du processus.

### RÉFÉRENCES

1. STOLTZ JF. Main determinants of red blood cell deformability. Clinical and pharmacological applications. *Clin Hemorheol* 1982 ; 2 : 163-73.
2. MOHANDAS N, CHASIS JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape : regulations by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Life Science* 1993 ; 30 : 171-92.
3. CHABANEL A, REINHART W, CHIEN S. Increased resistance to membrane deformation of shape-transformed human red blood cells. *Blood* 1987 ; 69 : 739-43.
4. TISCHLER RB, CARLSON FD. A study of the dynamic properties of the human red blood cell membrane using quasi-elastic light-scattering spectroscopy. *Biophys J* 1993 ; 65 : 2586-600.
5. SHIGA T, MAEDA N, SUDA T, KON K, SEKIYA M. Influences of cholesterol on red cell deformability. *Clin Hemorheol* 1982 ; 2 : 77-83.
6. KANAKARAJ P, SINGH M. Influence of cholesterol-enrichment under *in vivo* and *in vitro* conditions on the erythrocyte membrane lipids and its deformability. *Ind J Biochem Biophys* 1989 ; 26 : 381-5.
7. COOPER RA, LESLIE MH, FISCHKOFF S, SHINITZY M, SHATTIL SJ. Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes *in vivo* : production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid. *J Am Chem Soc* 1978 ; 100 : 327-31.
8. WANG X, STOLTZ JF. Importance of non-Newtonian rheologic properties of blood in erythrocyte transport. *J Mal Vasc* 1994 ; 19 : 137-41.
9. POSS MJ, LONGMUIR IS, MOSER ET. Hyperchylomicronemia, oxygen affinity and passage across the red cell membrane. In : *Oxygen transport to tissue XII*. J. Piiper (Eds), New York, 1990.
10. KIRUCHI Y, DA QW, FUJINO T. Variation in red blood cell deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue. *Microvasc Res* 1994 ; 47 : 222-31.
11. STOLTZ JF, LARCAN A, GUILLOT M, VERER JC. Déformabilité des hématies et filtrabilité. Etude critique et comparaison entre différentes méthodes. *J Mal Vasc*, 1978 ; 3 : 245-9.
12. LIPOWKY HH, CRAM LE, JUSTICE W, EPPHIMER MJ. Effect of erythrocyte deformability on *in vivo* red cell transit time and hematocrit and their correlation with *in vitro* filterability. *Microvasc Res* 1993 ; 46 : 43-64.
13. STOLTZ JF, RAVEY JC, LARCAN A, MAZERON P, LUCIUS M, GUILLOT M. Deformation and orientation of red blood cells in a simple shear flow. *Scand J Clin Lab Invest* 1981 ; 41 : 67-75.
14. STOLTZ JF, DONNER M, MULLER S, LARCAN A. L'hémorhéologie en pratique clinique. Introduction à la notion de profil hémorhéologique. *J Mal Vasc*, 1991 ; 16 : 261-70.
15. MOKKEN FC, KEDARIA M, HENNY CP. The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorheological parameter. *Ann Hematol* 1993 ; 64 : 113-22.
16. STOLTZ JF, VIGNERON C, STREIFF F, LARCAN A. Données actuelles sur la rhéologie de l'hématie. *Biorheology* 1971 ; 8 : 11-22.
17. VIGNERON C, STOLTZ JF, STREIFF F. La résistance globale osmotique : données actuelles. *Le Pharmacien Biologiste* 1970 ; 6 : 565-9.
18. CHIEN S, SUNG LA, LEE MM, SKALAK R. Red cell membrane elasticity as determined by flow channel technique. *Biorheology* 1992 ; 29 : 467-78.
19. SHINITZKY M, SKORNICK Y, HARAN-GHERA N. Effective tumor immunization by cells of elevated membrane-lipid microviscosity. *Proc Natl Acad Sci* 1979 ; 76 : 5313-6.
20. BENBASSAT J. Effect of packing and resuspension on the osmotic fragility and rate of autohaemolysis of incubated red blood cells. *Clin Sci* 1969 ; 37 : 99-197.
21. ROSE HG, OKLANDER M. Improved procedure for extraction of lipids from human erythrocyte. *J Lipid Res* 1965 ; 6 : 428-31.
22. ZLATKIS A, ZAK B. Study of new cholesterol reagent. *Ann Biochem* 1969 ; 29 : 143-8.
23. BESSIS M, MOHANDAS N. A diffractometric method for the measurement of cellular deformability. *Blood Cells* 1975 ; 1 : 307-15.
24. HARDEMAN MP, GOEDHART P, BREEDERVELD D. Laser diffraction ellipsometry of erythrocytes under controlled shear-stress using a rotational viscosimeter. *Clin Chim Acta* 1987 ; 165 : 227-34.

### III.2.2) INFLUENCE DU CHOLESTEROL SUR LA DIFFUSION DE L'OXYGENE DANS LA MEMBRANE D'ERYTHROCYTE

#### III.2.2.1) Détermination du type d'inhibition de fluorescence en présence de cholestérol

##### Article 3

**Mesure de la diffusivité de l'oxygène par inhibition de fluorescence de sondes pyréniques dans la membrane d'érythrocyte enrichie en cholestérol. Journal de Chimie Physique (1997), 94, 1-17. D Dumas, S Muller, F Baros, F Gouin, ML Viriot, A Taccon, JF Stoltz.**

La rigidification des membranes d'érythrocytes suite à l'incorporation de cholestérol a été vérifiée par la mesure des paramètres rhéologiques microscopiques (déformabilité et fragilité osmotique). Or, l'effet du cholestérol sur les propriétés rhéologiques moléculaire, la fluidité membranaire, est à prendre en considération car relève du niveau d'investigation le plus fin. En effet, le phénomène d'inhibition de fluorescence par l'oxygène moléculaire, utilisé pour déterminer l'accessibilité des sondes PBA et PDA à l'oxygène, dépend d'un phénomène diffusionnel à l'échelle moléculaire. Celui-ci pourrait être affecté par la présence des molécules de cholestérol au sein de la membrane. Il devenait nécessaire de définir au préalable le type d'inhibition qui régit le déclin des intensités et durées de vie de fluorescence.

Dans cet article, nous avons considéré à la fois le processus d'inhibition statique (constante  $K_s$ , formation de complexes non fluorescents, et le processus d'inhibition dynamique (constante  $K_d$ , collisionnel). La formation de complexes non fluorescents n'a aucun effet sur les valeurs des durées de vie de fluorescence (c'est-à-dire sur  $K_d$ ) alors qu'elle affecte de manière non négligeable les valeurs des intensités de fluorescence (c'est-à-dire  $K_{sv}$ ). La constante  $K_s$  est définie par différence des constantes  $K_{sv}$  et de la constante  $K_d$ .

L'incorporation de cholestérol modifie les propriétés rhéologiques cellulaires. Pour des suspensions de membranes d'érythrocyte présentant des rapports C/Pt différents (0,18 à 0,83), des mesures de polarisation de fluorescence (fluidité membranaire) ont été menées à l'aide des acides 6-(9-anthroyloxy)stéarique (6-AS) et 12-(9-anthroyloxy)stéarique (12-AS). Pour chaque rapport C/Pt, nous avons comparé les évolutions des valeurs des anisotropies  $\langle r \rangle$  de ces deux sondes, moins sensibles à l'effet inhibiteur de l'hémoglobine (émission à 450 nm). En parallèle, et

dans les mêmes conditions expérimentales, les mesures des anisotropies des sondes 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et triméthyl ammonium 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH) ont permis de s'assurer d'une part que l'excitation lumineuse (Bisby et al, 1981) et la génération éventuelle de radicaux libres dans notre expérience ne modifient pas les intensités de fluorescence du DPH (Mazière et al, 1997). Nous n'avons pas utilisé le 1-palmitoyl-2-diphényl-1,3,5-hexatriénylpropionyl-sn-glycéro-3-phosphocholine(DPH-PC) malgré une localisation plus précise du fait d'une diffusion membranaire importante et d'une hydrolyse de ce phospholipide fluorescent par des phospholipases endogènes (cf. Annexe 1: Interaction of a Phosphatidylcholine Derivative of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) with Intact Living Cells : Steady-State Fluorescence Polarization and Phase Fluorometry Studies. L Miccoli, C Szczepaniak, D Dumas, S Savonnière, S Muller, MC Carré and M Donner. Journal of Fluorescence (1993), 3(4) 251-255.)

La formation d'excimères intermoléculaires du pyrène a été suivie par le rapport des intensités de fluorescence à 470 nm et à 376 nm ( $I_e/I_m$ ). Cette proportion en excimère reflète des modifications des concentrations locales en sondes fluorescentes, qui pourrait survenir suite à une ségrégation particulière des constituants lipidiques et protéiques de la membrane.

Nous avons étudié les variations des valeurs des durées de vie du PBA et du PDA (par fluorimétrie de phase) en fonction du rapport C/Pt. Les molécules de cholestérol insérées dans les régions internes de la membrane présentent un caractère hydrophobe qui pourrait éventuellement affecter les valeurs des signaux de fluorescence.

Ce travail a principalement permis de montrer l'absence d'inhibition de type statique des dérivés pyréniques au sein de la membrane érythrocytaire en présence de molécules de cholestérol. Lorsqu'il se rencontre, ce phénomène affecte de manière importante les valeurs des intensités de fluorescence. Dans notre cas, il en résulte que les expériences réalisées dans les conditions décrites précédemment (absence d'excimères...) peuvent être suivies aussi bien par l'inhibition des intensités que par l'inhibition des durées de vie de fluorescence.

## Mesure de la diffusivité de l'oxygène par inhibition de fluorescence de sondes pyréniques dans la membrane d'érythrocyte enrichie en cholestérol

D Dumas<sup>1\*</sup>, S Muller<sup>2</sup>, F Baros<sup>3</sup>, F Gouin<sup>1</sup>, ML Viriot<sup>3</sup>,  
A Taccoen<sup>4</sup>, JF Stoltz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'hématologie, EA 1728, faculté de médecine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France ;  
<sup>2</sup>INSERM U 272, 24, rue Lionnois, 54000 Nancy, France ; <sup>3</sup>DCPR (GRAPP), URA 328 CNRS,  
ENSIC-INPL, 1, rue Grandville, 54000 Nancy, France ; <sup>4</sup>Laboratoires Negma, av de l'Europe,  
78117 Toussus-le-Noble, France

(Reçu le 20 juin 1996 ; accepté le 16 juillet 1996)

\* Correspondance et tirés à part.

### Résumé

L'influence du cholestérol sur la diffusibilité de l'oxygène dans les membranes biologiques a été étudiée par inhibition de la fluorescence des acides pyrènebutyrique (PBA) et dodécanoïque (PDA). La « fluidité membranaire », mesurée par polarisation de fluorescence avec des sondes spécifiques de différentes régions membranaires (6, 12-AS, DPH, TMA-DPH), évolue inversement au rapport cholestérol/protéine (C/Pt) et varie en fonction de la région étudiée. La durée de vie du monomère du PDA, mesurée par fluorescence résolue dans le temps, croît avec le rapport C/Pt en absence d'O<sub>2</sub>. En présence d'O<sub>2</sub>, les valeurs des constantes d'inhibition dynamique du PDA augmentent avec le rapport C/Pt (diffusivité apparente d'O<sub>2</sub> accrue). La diffusion d'O<sub>2</sub> augmenterait uniquement dans la région centrale de la membrane, caractérisée par le PDA. La variation de la solubilité d'O<sub>2</sub> dans des domaines restreints de polarité différente pourrait expliquer l'inhibition de fluorescence du PDA.

Mots-clés : membrane, oxygène, diffusion, cholestérol, fluorescence

### Abstract

The effect of membrane cholesterol incorporation on the process of oxygen diffusion was studied by fluorescence quenching of pyrenebutyric (PBA) or pyrenedodecanoic (PDA) acid. The « membrane fluidity », studied by fluorescence polarization method with 4 probes with known specificity for membrane areas (6, 12-AS, DPH, TMA-DPH), decreased under increasing cholesterol/protein (C/Pt) ratio. Cholesterol induces a membrane rigidification at different depths in the membrane bilayer. In the absence of O<sub>2</sub>, the natural lifetime of PDA, measured by time-resolved fluorescence, increased under increasing C/Pt ratio. In the presence of O<sub>2</sub>, the dynamic constants quenching of PDA increased with C/Pt ratio. Oxygen diffusion would increase only in the middle of the bilayer in which PDA is embedded. Variations in oxygen solubility in different polarity micro-domains could explain PDA fluorescence inhibition.

Key-words : membrane, oxygen, diffusion, cholesterol, fluorescence

## INTRODUCTION

L'accumulation de cholestérol dans la membrane d'érythrocyte se traduit par une rigidification du milieu qui provoque des diminutions de la déformabilité [1], de la fluidité membranaire [2] et de la résistance à la lyse osmotique [3]. Pour suivre de telles modifications, des sondes fluorescentes, spécifiques de certains compartiments membranaires ont été utilisées comme capteurs sensibles à l'environnement moléculaire [4]. La localisation des sondes étant liée à leur structure (longueur de la molécule, amphiphilie, encombrement stérique, etc.) les sondes 12-AS (12-(9-anthroyl)stéarique) et DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) seraient incorporées dans des régions plus profondes de la membrane [5] que les sondes 6-AS (6-(9-anthroyl)stéarique) et TMA-DPH (triméthyl 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) [6]. La diminution généralement constatée de la fluidité membranaire par incorporation de cholestérol devrait se traduire par une baisse de la diffusivité de l'oxygène [7]. Ainsi aux modifications rhéologiques de la membrane d'érythrocyte [8, 9], ont été associées une baisse du transport global en oxygène [10], une diminution de la perméabilité à l'oxygène [11-12].

Depuis longtemps, la bicouche membranaire est décrite comme l'une des composantes de la résistance au transfert diffusif de l'oxygène [13]. Il a été montré, grâce à l'utilisation de la fluorescence, que la présence de cholestérol diminuait le coefficient de diffusion de l'oxygène dans des vésicules de dimyristoyllécithine [14]. Dans des vésicules de dimyristoylphosphatidylcholine, il y aurait formation de microdomaines dans lesquels la concentration en cholestérol est plus importante [15, 16]. De même, dans la membrane des globules rouges, une proportion croissante en cholestérol peut entraîner une ségrégation des phospholipides (principalement la sphingomyéline et la phosphatidylcholine) dans des microdomaines particuliers [17]. Cette ségrégation, par le jeu des modifications des concentrations locales en sondes fluorescentes, peut augmenter la probabilité de rencontre, et dans le cas particulier de dérivés du pyrène se traduirait par une formation accrue d'excimères intermoléculaires

[18]. Si quelques rares études en fluorimétrie ont porté sur la diffusion de l'oxygène dans la membrane d'érythrocyte rigidifiée par le cholestérol, leurs conclusions restent ambiguës et ne permettent pas de conclure sur la résistance éventuelle de la membrane à la diffusion de l'oxygène [19, 20]. En effet, selon la structure chimique des sondes fluorescentes utilisées, des interactions avec des inhibiteurs intrinsèques (plus ou moins spécifiques), représentent une voie secondaire d'inhibition de fluorescence qui peut s'ajouter à l'inhibition par l'oxygène. Par exemple, l'hémoglobine résiduelle de la membrane interne de l'hématie est décrite comme inhibiteur de la fluorescence du DPH et du 12-AS [5]. Pour s'affranchir de l'influence des effecteurs allostériques ainsi que du transfert d'oxygène facilité par la présence de l'hémoglobine [21], une technique directe d'inhibition de fluorescence de dérivés du pyrène par l'oxygène a été utilisée dans des membranes d'hématies [22]. Le processus d'inhibition du monomère du pyrène par l'oxygène est efficace et de type purement collisionnel [23] (donc dynamique) et son efficacité ( $\gamma$ ) reflète la diffusivité de l'oxygène dans un système homogène idéal. Dans le cas d'un système membranaire hétérogène, la diffusivité diminue avec la présence d'obstacles [24] et l'accessibilité de la sonde à l'oxygène ( $kq$ ) pourra être évaluée à partir des valeurs des durées de vie des états excités. Le calcul du coefficient de diffusion globale de l'oxygène (latéral et transversal) à partir de la valeur de  $kq$  nécessite de connaître la concentration précise en oxygène dans chaque compartiment membranaire. Cependant, la détermination du coefficient de diffusion de l'oxygène se révèle délicate car la variation de la solubilité de l'oxygène (et donc sa concentration) dans ces différentes phases n'est pas quantifiable. L'évolution des valeurs caractéristiques de l'accessibilité ( $kq$ ) de la sonde pour l'oxygène permet toutefois d'interpréter le phénomène de diffusion [25].

Les dérivés acides butyrique (PBA) et dodécanoïque (PDA) du pyrène s'incorporent par leur extrémité carboxyle terminale au niveau des têtes polaires des phospholipides. Selon la longueur de leur chaîne alkyle, respectivement  $C_4$  pour le PBA et  $C_{12}$  pour le PDA, ces deux sondes se localisent à l'interface eau/membrane et dans la partie



centrale de la membrane [26]. Il a été montré que les durées de vie de dérivés du pyrène augmentent considérablement dans un environnement hydrophobe [27, 28]. Or, la présence de cholestérol dans la membrane d'érythrocyte modifie l'hydrophobicité de l'environnement de la sonde [29]. Aucune relation possible entre la polarité ou l'hydrophobicité d'une solution (solvant ou lipides) et la solubilité de l'oxygène dans ce milieu n'a été reportée. Le coefficient de solubilité de l'oxygène dans un système membranaire varierait avec la « fluidité » de celui-ci en relation étroite avec la température [7, 30]. En effet, la « viscosité » des chaînes acyles augmente avec la teneur en cholestérol pour des températures au dessus de la température de transition des lipides mais diminue en dessous de cette température [31]. Cet effet est particulièrement net avec des vésicules lipidiques ne comportant qu'un type de phospholipides [22]. Dans le cas d'une membrane biologique complexe, pour laquelle aucune température de transition globale n'a été définie, la diffusion de l'oxygène serait alors directement dépendante de la « fluidité » membranaire.

La diffusion de l'oxygène dans la membrane d'érythrocyte rigidifiée par le cholestérol a fait l'objet de peu d'investigations. Il apparaissait intéressant de vérifier si la détermination de la diffusion de l'oxygène par son rôle d'inhibition de fluorescence confirmait les prédictions émises à partir de la fluidité membranaire.

Ce travail a donc porté sur l'étude de l'incidence de l'incorporation de cholestérol sur la diffusion de l'oxygène par inhibition de fluorescence du PBA et du PDA dans la membrane d'érythrocyte. La « rigidification » membranaire à différentes profondeurs a été vérifiée par polarisation de fluorescence de sondes spécifiques de certains compartiments membranaires (6-AS, 12-AS, DPH, TMA-DPH).

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### *Préparation des membranes d'érythrocytes et incorporation de cholestérol*

Des hématies de donneurs sains prélevées sur anticoagulant Acide Citrique Dextrose (Etablissement de Transfusion Sanguine de Nancy-Brabois) sont lavées 3

fois avec un tampon phosphate isotonique pH 7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mOsm). L'incorporation d'hémisuccinate de cholestérol est réalisée selon la procédure modifiée décrite par Shinitzky [32] : 2 ml d'une suspension d'érythrocytes à hématocrite 20% sont ajoutés à 20 ml de milieu d'incorporation (3,5% de polyvinyl-pyrrolidone, 0,4% glucose, 1% albumine et 0,8% HEPES) comportant différentes concentrations en hémisuccinate de cholestérol (0,25 mg/ml solubilisé au préalable dans l'éthanol). Un témoin est réalisé dans des conditions similaires, sauf que le milieu d'incorporation est sans hémisuccinate de cholestérol avec toutefois la même proportion en éthanol. Un blanc dans du tampon phosphate permet d'évaluer l'influence de l'incubation. Après 12h d'incubation à température ambiante (25°C), les hématies sont lavées 3 fois avec du tampon phosphate (10 ml). Les membranes d'érythrocytes sont préparées par choc osmotique selon la méthode de Dodge [33] et le protocole est répété 8 fois pour éliminer totalement l'influence de l'hémoglobine résiduelle sur la durée de vie de fluorescence (données non montrées). La concentration en membrane est déterminée par le dosage des protéines membranaires (« Bicinchoninic acid protein assay », kit Sigma) avec comme standard un mélange d'albumine (50 g/l) et de globulines humaines (30 g/l) (réf. 540-10 Sigma). La quantité totale d'hémisuccinate de cholestérol total incorporé dans la membrane après extraction [34] est obtenue par une méthode colorimétrique [35] à partir d'une courbe étalon d'hémisuccinate de cholestérol dans l'éthanol. La concentration en cholestérol dans la membrane est exprimée par le rapport cholestérol/protéine (C/Pt).

#### *Sondes fluorescentes et marquage des membranes*

Des solutions « mères » sont conservées à + 4°C : DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) 2 mM dans le THF (tétrahydrofurane), TMA-DPH (triméthyl ammonium 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) 2 mM dans le DMF (diméthylformamide), 6-AS (acide 6-(9-anthroyl)stéarique) et 12-AS (12-(9-anthroyl)stéarique) 1 mM dans le DMF; PBA

(acide pyrènebutyrique) et PDA (acide pyrènedodécanoïque) 1 mM dans le DMF. Toutes les sondes proviennent du même fournisseur (Molecular Probes, Eugene City, Oregon, USA). Pour l'introduction dans les membranes, 3  $\mu$ l des solutions mères sont ajoutés à 1 ml de la suspension de membranes d'érythrocytes (300  $\mu$ g/ml) dans 2 ml de tampon phosphate isotonique de lavage (pH 7,4). Après 30 min d'incubation (cinétique d'incorporation non montrée), la suspension est centrifugée à 10000 rpm et le culot membranaire resuspendu dans 3 ml de tampon phosphate. La concentration en PBA et PDA dans les membranes d'érythrocytes est vérifiée par absorbance en utilisant un coefficient d'extinction molaire de  $4.10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 343 nm.

#### *Fluidité membranaire*

L'étude de la fluidité membranaire est réalisée par polarisation de fluorescence en mesurant l'anisotropie de fluorescence ( $\langle r \rangle$ ) du 6-AS, 12-AS, TMA-DPH et DPH. La prise en compte de l'influence de la diffusion de lumière est faite au moyen d'une suspension membranaire de contrôle. La mesure est effectuée sur un spectrofluidimètre mis au point au laboratoire (Regulest, 57000 Florange, France) dont le montage a été précédemment décrit [36]. Il utilise une excitation continue et un montage en T pour l'analyse mesurant simultanément  $I_{//}$  et  $I_{\perp}$  avec :  $\langle r \rangle = I_{//} - I_{\perp} / 2(I_{//} + I_{\perp})$ . L'excitation est fixée à 365 nm et les émissions sont mesurées soit à 425 nm (DPH, TMA-DPH) soit à 465 nm (6-AS et 12-AS). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la valeur d'anisotropie mesurée pour le témoin (sans hémisuccinate de cholestérol).

#### *Fluorescence statique*

L'intensité de fluorescence est mesurée sur un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS5B (fentes 2,5/10 nm). Les spectres d'émission (365-500 nm) du PBA et du PDA sont recueillis pour une excitation à 343 nm. La proportion en excimère du pyrène à la concentration de 1  $\mu$ M est vérifiée par le rapport des intensités de fluorescence à 376 et 470 nm. Toutes les expériences ont été reproduites trois fois. Un mélange gazeux

est obtenu à partir de différents débits en oxygène et azote (CFPO, Paris, France) et d'un mélangeur de gaz (Schaefer Techniques, Nozay, France). Le gaz bulle à l'obscurité durant 10 min (pression atmosphérique) dans une cuve à circulation 199 QS (Hellma, Paris, France) contenant la suspension membranaire.

#### *Fluorescence résolue dans le temps*

Les durées de vie de fluorescence ont été déterminées avec un fluorimètre de phase, SLM 48000 (SLM AMINCO Instruments, Bioritech, Chamarande, France). Les mesures sont menées par rapport à une solution de référence de DPA (9,24 ns dans l'éthanol) pour 35 fréquences (de 1 à 150 MHz) avec une longueur d'onde d'excitation à 343 nm. Un filtre passe bande permet de sélectionner la partie intégrale du spectre d'émission des monomères (365-420 nm). L'intensité de la source d'excitation pendant la durée d'une mesure (quelques minutes) n'entraîne pas de photoblanchiment. L'analyse des données par lissage des courbes est effectuée selon un déclin exponentiel à deux composantes discrètes pour lequel le Chi2 est optimisé. Nous avons constaté que la détermination des durées de vie par la méthode de démodulation est perturbée par l'introduction de l'oxygène dans le système. Pour valider la détermination des durées de vie en excitation modulée, nous avons confronté les valeurs des durées de vie avec celles obtenues dans des milieux d'expériences identiques avec la méthode de comptage de photons (excitation par laser pulsé) (DCPR (GRAPP) - ENSIC, Nancy, France) [37].

#### *Inhibition par l'oxygène accessibilité*

L'accessibilité aux sondes (PDA, PBA) est appréciée avec une technique d'inhibition de fluorescence par l'oxygène (intensité et durée de vie). Le traitement complet tient compte du processus d'inhibition statique (complexe) et du processus d'inhibition dynamique (collisionnel). Le rapport des intensités de fluorescence d'un fluorophore en absence et en présence d'oxygène obéit en première approximation à l'équation de Stern-Volmer :

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [O_2]$$

où  $F_0$  et  $F$  sont les intensités de fluorescence en absence et présence d'oxygène et  $K_{sv}$  la constante d'inhibition de Stern-Volmer. Etant donné que l'inhibition statique n'a aucun effet sur la durée de vie de fluorescence, la constante d'inhibition dynamique ( $K_d$ ) est déterminée par la représentation de  $\tau_0/\tau$  en fonction de la concentration en oxygène selon l'équation :

$$\tau_0/\tau = 1 + K_d [O_2]$$

$\tau_0$  et  $\tau$  sont les durées de vie en absence et présence d'oxygène. La constante d'inhibition statique ( $K_s$ ) est définie par différence des constantes  $K_{sv}$  et  $K_d$ . Dans un système hétérogène, la constante bimoléculaire  $k_q$  reflète l'accessibilité du fluorophore à l'oxygène pour un processus purement collisionnel avec :

$$K_d = \tau_0 \times k_q \times \gamma_0$$

pour lequel  $k_q$  et  $\gamma_0$  représentent respectivement la fréquence de collision (accessibilité) et l'efficacité du processus considéré ici comme égal à 100%.

## RESULTATS

### *Fluidité membranaire*

Les anisotropies ( $\langle r \rangle$ ) sont mesurées dans la membrane d'érythrocyte témoin (C/Pt de 0,18), dans le blanc (C/Pt de 0,17) et dans des membranes comportant différents rapports C/Pt (de 0,19 à 0,83). L'incubation et la proportion en EtOH n'ont pas effet sur les valeurs des anisotropies. Les évolutions relatives des anisotropies de fluorescence par rapport à la valeur d'anisotropie mesurée pour le témoin avec les sondes 6-AS, 12-AS (figure 1) et DPH, TMA-DPH (figure 2) sont représentées. Pour les 4 sondes, les résultats montrent une augmentation de  $\langle r \rangle$  en fonction du rapport C/Pt. Les variations de  $\langle r_{12-AS} \rangle$  et de  $\langle r_{DPH} \rangle$  sont respectivement plus importantes que celles de  $\langle r_{6-AS} \rangle$  et  $\langle r_{TMA-DPH} \rangle$ . Ainsi pour les acides stéariques, la sonde 12-AS se montrerait plus sensible que la sonde 6-AS aux variations d'environnements liées à

l'incorporation de cholestérol. De manière similaire, les capacités rotationelles de la sonde DPH sont plus restreintes que celles de la sonde TMA-DPH.

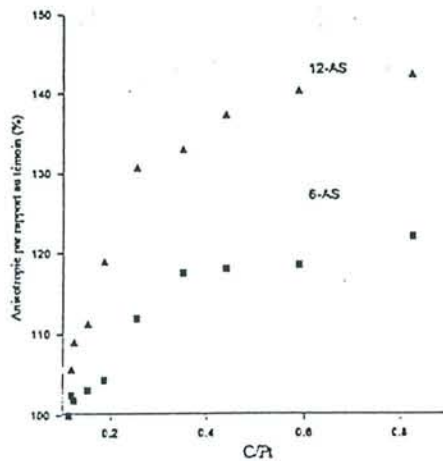


Figure 1 : Anisotropie de fluorescence du 6-AS et 12-AS pour différents rapports C/Pt à 25°C.

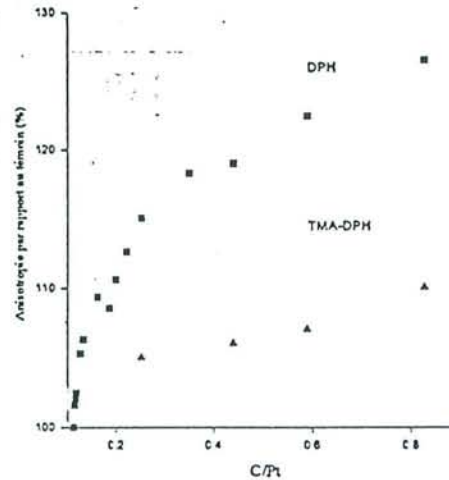


Figure 2 : Anisotropie de fluorescence du TMA-DPH et DPH pour différents rapports C/Pt à 25°C.

### *Effet de la température*

Le déclin des durées de vie de fluorescence du PDA a été déterminé à différentes températures pour différents rapports C/Pt (de 0,17 à 0,83) (figure 3). Aucune rupture franche dans l'évolution du déclin pour une température précise n'a été observée en fonction du rapport membranaire C/Pt. Ces résultats confortent le fait que la membrane d'érythrocyte ne peut être caractérisée par une température de transition de phase.

### *Action du cholestérol*

En absence d'oxygène, les résultats montrent une augmentation de la durée de vie naturelle du PDA ( $\tau_0$  : 180 à 219 ns) pour des rapports membranaires C/Pt croissants (tableau 1). Un changement de la polarité de l'environnement du PDA ou la proximité du noyau tétracyclique du cholestérol et du noyau pyrénique du PDA dans la membrane pourraient être à l'origine de cette augmentation de la durée de vie de l'état

excité. Ce phénomène n'est pas rencontré avec le PBA plutôt incorporé à l'interface eau/membrane (figure 4).

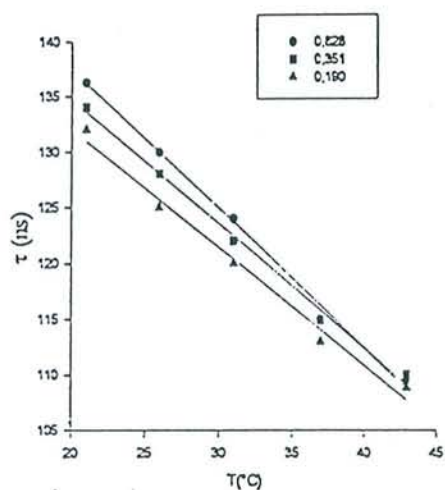


Figure 3 : Durée de vie du PDA en fonction de la température pour différents rapports C/Pt.

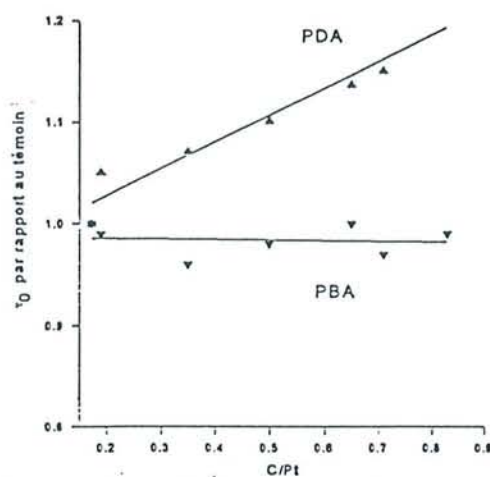


Figure 4 : Durée de vie en absence d'O<sub>2</sub> (par rapport au témoin) en fonction du rapport C/Pt.

Tableau 1. Valeurs des durées de vie des monomères du PDA et du PBA en absence d'oxygène ( $\tau_0$ ), de la constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), des constantes d'inhibition dynamique ( $K_d$ ) et statique ( $K_s$ ), de la constante d'inhibition bimoléculaire ( $k_q$ ) et de la proportion en excimère en fonction des rapports cholestérol/protéine (C/Pt).

		Rapports cholestérol/protéines						
		0.17	0.18	0.19	0.35	0.65	0.71	0.83
		blanc	témoin					
PBA	$K_{sv}$ (atm <sup>-1</sup> )	1,22	1,17	1,36	1,28	1,35	1,29	1,29
	$K_d$ (atm <sup>-1</sup> )	1,38	1,39	1,24	1,24	1,31	1,30	1,28
	$K_s$ (atm <sup>-1</sup> )	-	-	0,12	0,04	0,04	-	0,01
	$k_q$ (10 <sup>6</sup> )	11,21	11,34	10,29	10,54	10,77	10,72	10,62
	$I_e/I_m$ (10 <sup>-2</sup> )	1,12 ± 0,08	1,16 ± 0,05	0,91 ± 0,11	1,02 ± 0,09	1,10 ± 0,04	1,06 ± 0,05	1,05 ± 0,02
PDA	$K_{sv}$ (atm <sup>-1</sup> )	1,66	1,58	1,67	1,99	2,15	2,27	2,27
	$K_d$ (atm <sup>-1</sup> )	1,56	1,59	1,69	1,70	1,91	2,08	2,31
	$K_s$ (atm <sup>-1</sup> )	0,1	-	-	0,29	0,24	0,19	-

	kq (10 <sup>6</sup> )	8,64	8,83	8,90	8,72	9,33	10,04	10,52
	Ie/Im (10 <sup>-2</sup> )	1,75 ± 0,09	1,81 ± 0,11	1,82 ± 0,07	1,76 ± 0,13	1,79 ± 0,08	1,82 ± 0,10	1,71 ± 0,12

#### *Accessibilité de la sonde*

Dans le cas du PDA, les valeurs de kq (tableau 1) augmentent avec le rapport C/Pt. Cette augmentation de diffusivité apparente de l'oxygène avec C/Pt n'est pas retrouvée avec le PBA. Au contraire, il est à noter que l'accessibilité du PBA baisse légèrement après incorporation du cholestérol (de 11,34.10<sup>6</sup> atm<sup>-1</sup> pour le témoin à 10,62.10<sup>6</sup> atm<sup>-1</sup> pour C/Pt de 0,83). De plus, il apparaît que les valeurs de kq du PDA et du PBA se rejoignent pour une proportion en cholestérol membranaire équivalente au rapport C/Pt de 0,83 (kq de 10,52.10<sup>6</sup> atm<sup>-1</sup> pour le PDA et 10,62.10<sup>6</sup> atm<sup>-1</sup> pour le PBA).

#### *Constante d'inhibition de Stern-Volmer (Ksv)*

Pour les sondes PDA (figure 5) et PBA (figure 6), les constantes d'inhibition Ksv ont été calculées pour chaque rapport C/Pt et sont reportées dans le tableau 1. Pour le PDA les valeurs de Ksv augmentent (de 1,58 à 2,27 atm<sup>-1</sup>) avec C/Pt (de 0,18 à 0,83). Cette évolution n'est pas observée dans le cas du PBA (de 1,17 à 1,29 atm<sup>-1</sup>).

#### *Constantes d'inhibition dynamique (Kd) et statique (Ks)*

La pente de la représentation de  $\tau_0/\tau$  du PDA (figure 7) et du PBA (figure 8) en fonction de P(O<sub>2</sub>) correspond à Kd. Il apparaît pour le PDA que les valeurs de Kd augmentent (de 1,59 à 2,31 atm<sup>-1</sup>) avec le rapport C/Pt (de 0,18 à 0,83). Pour le PBA, après addition de cholestérol, les valeurs de Kd baissent avec une évolution indépendante du rapport C/Pt (de 1,39 atm<sup>-1</sup> à une valeur minimale de 1,24 atm<sup>-1</sup>). Les valeurs de Ks sont obtenues par différence des valeurs de Kd avec les valeurs de Ksv (tableau 1). Les constantes d'inhibition statique ne varient pas de manière significative avec le rapport C/Pt.



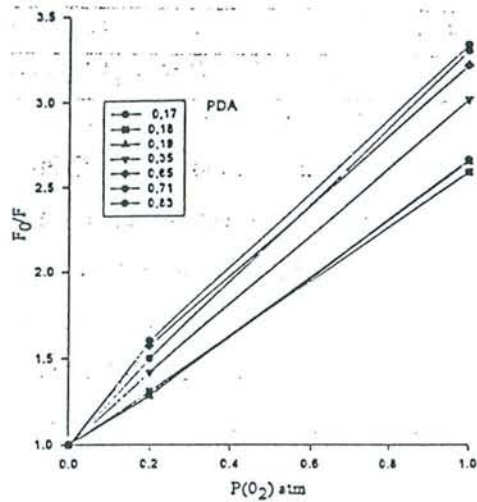


Figure 5 : Inhibition de la fluorescence du PDA ( $F_0/F$ ) à 25°C en fonction de la  $P(O_2)$  pour différents rapports C/Pt dans la membrane d'érythrocyte.

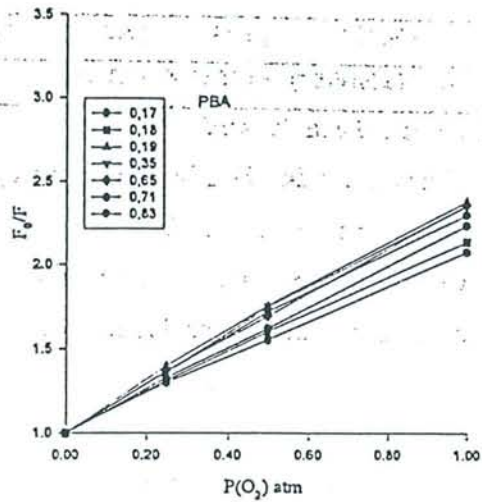


Figure 6 : Inhibition de la fluorescence du PBA ( $F_0/F$ ) à 25°C en fonction de la  $P(O_2)$  pour différents rapports C/Pt dans la membrane d'érythrocyte.

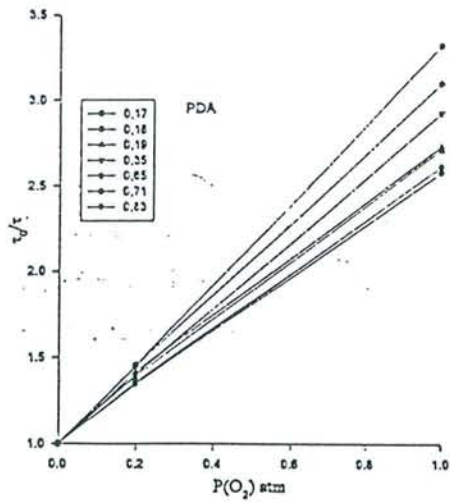


Figure 7 : Inhibition des durées de vie de fluorescence du PDA ( $\tau_0/\tau$ ) à 25°C en fonction de la  $P(O_2)$  pour différents rapports C/Pt dans la membrane d'érythrocyte.

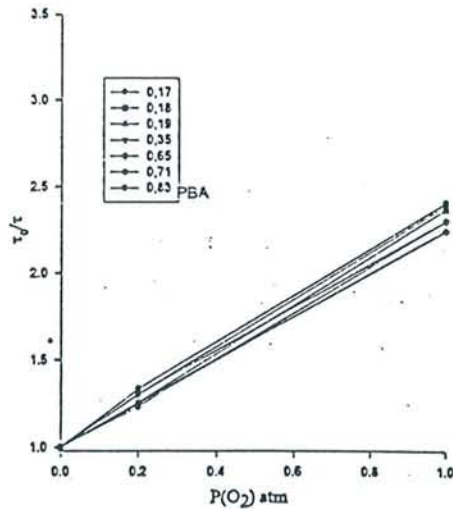


Figure 8 : Inhibition des durées de vie de fluorescence du PBA ( $\tau_0/\tau$ ) à 25°C en fonction de la  $P(O_2)$  pour différents rapports C/Pt dans la membrane d'érythrocyte.

## DISCUSSION

### *Fluidité membranaire*

Les mesures de « microviscosité » membranaire, qui indiquent que les libertés de mouvements rotationnels du 6-AS, du 12-AS, du DPH et du TMA-DPH diminuent avec des rapports C/Pt croissants, sont en accord avec les résultats observés par ailleurs. Ces données suggèrent que l'effet rigidifiant du cholestérol sur la fluidité membranaire semble s'exercer sur chacune des sondes utilisées quel que soit son site d'incorporation. Ces résultats confirment que la dynamique conformationnelle des chaînes acyles à différentes profondeurs est modifiée par la présence de cholestérol [38]. Cependant il est à noter que les variations d'anisotropies sont plus grandes lorsque le noyau tétracyclique du cholestérol se trouve à proximité du noyau anthroyle du 12-AS ou du noyau benzénique du DPH. Ces deux sondes incorporées dans des régions plus profondes que le 6-AS ou le TMA-DPH se révéleraient plus sensibles à la proximité du cholestérol. La fluidité membranaire, qui varie avec la température, est fonction du degré d'ordre en terme d'arrangements géométriques des chaînes acyles.

### *Température*

Pour trois valeurs du rapport C/Pt, l'évolution de  $\tau$  en fonction de la température ne permet pas de préciser une température pour laquelle l'environnement immédiat de la sonde a radicalement changé, ce qui semble indiquer l'absence de température de transition globale pour la membrane de globules rouges. Ce comportement est à relier au fait que la membrane érythrocytaire est un système hétérogène dans lequel des interactions moléculaires plus ou moins fortes entre les différentes composantes (glycoprotéines, phospholipides) assurent la cohésion de l'ensemble.

### *Influence du cholestérol en absence d'oxygène*

En absence d'oxygène, les résultats montrent que la durée de vie du PDA augmente (de 180 à 219 ns) pour des rapports C/Pt croissants. Cependant, ce phénomène n'est

pas observé avec le PBA. Ces résultats soulignent l'importance de la proximité du noyau tétracyclique du cholestérol et du noyau pyrénique. Le PBA (chaîne en C<sub>4</sub>) s'incorpore plutôt à l'interface eau/membrane alors que le PDA (chaîne en C<sub>12</sub>) se localise plutôt à proximité du noyau cholestane. L'augmentation de l'hydrophobicité liée à l'incorporation du cholestérol pourrait être à l'origine de son influence sur le PDA.

#### *Influence du cholestérol en présence d'oxygène*

L'incorporation de cholestérol dans la membrane d'érythrocyte (rapports C/Pt croissants de 0,18 à 0,83) ne diminue pas significativement l'accessibilité du PBA à l'oxygène par rapport au témoin (pas de variation de  $k_q$ ). Ceci pourrait signifier que l'intensité du signal de fluorescence du PBA n'est pas sensible aux variations d'hydrophobicité liées à la présence de cholestérol. Bien que les marqueurs de surface (TMA-DPH et 6-AS) reflètent l'augmentation de la cohésion du milieu en fonction du rapport C/Pt, aucune variation significative de l'accessibilité du PBA à l'oxygène n'est observée. Ainsi, la rigidification membranaire liée à l'incorporation de cholestérol, n'entraînerait pas de manière systématique une diminution de la diffusivité de l'oxygène à la surface de la bicouche lipidique.

Les constantes d'inhibition statique ne varient pas de manière significative avec le rapport C/Pt. Il en ressort que la contribution du cholestérol à l'inhibition de fluorescence du PDA et du PBA par l'oxygène est purement dynamique et ne s'accompagne pas de la formation d'un complexe stable.

Dans le cas du PDA, les valeurs des constantes  $K_{sv}$  et  $K_d$  augmentent avec le rapport C/Pt. Il est à noter que les valeurs de  $k_q$  ( $K_d/\tau_0$  pour  $\gamma = 1$ ) suivent en grande partie l'évolution des  $\tau_0$  (de 180 à 219 ns). Ainsi, l'incorporation de cholestérol augmenterait l'accessibilité du PDA à l'oxygène. Cette relation étant dose-dépendante, ces faits permettent d'avancer l'hypothèse suivante relative à la solubilité de l'oxygène : la détermination de l'accessibilité en terme de constantes d'inhibition bimoléculaire

(kq) n'est valide que si la solubilité de l'oxygène est constante dans les différents compartiments membranaires traversés. Des zones plus ou moins riches en phospholipides ou en cholestérol peuvent se distinguer par des solubilités différentes pour l'oxygène. L'exclusion de phospholipides serait à l'origine de zones restreintes et homogènes dans lesquelles la solubilité de l'oxygène serait supérieure à la valeur moyenne. Dans ces microdomaines riches en phospholipides, l'accessibilité du PBA à l'oxygène serait équivalente alors qu'elle augmenterait pour le PDA qui se situe dans la région hydrocarbonée de la membrane. Cette hétérogénéité structurale de la membrane en deux phases expliquerait l'augmentation de l'accessibilité de la sonde incorporée au même niveau de profondeur que le cholestérol. A ce stade, rien ne permet encore de préciser la répartition éventuelle des molécules de PDA dans ces microdomaines. En effet, la faible concentration en dérivés du pyrène (1  $\mu\text{M}$ ) n'entraîne pas de variation significative de la proportion en excimères intermoléculaires en fonction du rapport C/Pt. Ce résultat n'exclut pas une ségrégation éventuelle qui ne peut être décelée tant que la concentration (probabilité de rencontre) reste inférieure à la concentration critique de formation d'excimères.

Nous avons montré que la diffusion de l'oxygène augmentait dans la partie centrale de la membrane d'érythrocyte enrichie en cholestérol alors qu'elle stagnait au niveau de la surface interne de la membrane. D'autres résultats portant sur une membrane artificielle de phosphatidylcholine enrichie en cholestérol vont dans le même sens [39]. Seules les évolutions des accessibilités du PBA et du PDA à l'oxygène peuvent être comparées. Cependant, rien ne permet d'affirmer que la diffusion de l'oxygène soit plus importante dans la partie centrale de la membrane que dans la région superficielle. Ces résultats sur la diffusion de l'oxygène à différents niveaux de la membrane ne sont pas attendus, au regard de l'évolution de la « fluidité » membranaire indiquant une rigidification de tous les compartiments membranaires.

## CONCLUSION

L'objectif de ce travail était l'étude de la diffusivité de l'oxygène à l'aide d'une méthode d'inhibition de sondes fluorescentes (PBA et PDA) incorporées à différents niveaux dans la membrane d'érythrocyte enrichie en cholestérol. Par la mesure des anisotropies de fluorescence émises des marqueurs spécifiques de certains compartiments membranaires (6-AS, 12-AS, DPH et TMA-DPH), nous avons vérifié que l'incorporation de cholestérol s'accompagnait d'une rigidification membranaire. La partie centrale serait plus rigide que la surface interne de la membrane. Pour des proportions en cholestérol croissantes, la diffusion de l'oxygène augmenterait dans le milieu de la membrane (site d'incorporation du PDA) alors qu'elle stagnerait au niveau de la surface interne de la membrane (site d'incorporation du PBA). A ce niveau, les résultats relatifs à la fluidité membranaire et à la diffusion de l'oxygène semblent contradictoires. Il était effectivement attendu que l'augmentation de la « microviscosité » membranaire aurait comme conséquence une diminution de la diffusion de l'oxygène. La « fluidité » membranaire n'apporte pas d'information directe en liaison avec la diffusivité de l'oxygène dans la membrane, en particulier lors d'une rigidification liée à l'incorporation de cholestérol.

## REFERENCES

1. T Suda, N Maeda, T Shiga, *J Biochem*, 87, 1703-1713 (1980).
2. RA Cooper, MH Leslie, S Fishkoff, M Shinitzky, S Shattil, *J Am Chem Soc*, 17, 327-331 (1978).
3. C Vigneron, JF Stoltz, F Streiff, *Le Pharmacien Biologiste*, 6, 565-569 (1970).
4. M Shinitzky, Y Barenholtz, *Biochim Biophys Acta*, 515, 367-394 (1974).
5. D Schachter, U Cogan, RE Abbott, *Biochem*, 21, 2146-2150 (1982).
6. V Borenstein, Y Barenholtz, *Chem Phys Lipid*, 64, 117-127 (1993).
7. MW Geiger, NJ Turro, *Photochem Photobiol*, 26, 221-224 (1977).
8. T Shiga, N Maeda, T Suda, K Kon, S Oka, *Biorheology*, 16, 363-369 (1979).
9. F Mokken, M Kedaria, CH Henry, *Ann Hematology*, 64, 113-122 (1992).
10. JF Stoltz. Aspects physico-chimiques et rhéologiques du transport d'oxygène. Hémostase et agrégation érythrocytaire. Ed J.F. Stoltz -E.M.Int. (Paris), 4, 137-142 (1994).
11. WK Subczynski, JS Hyde, A Kusumi, *Proc Natl Acad Sci*, 86, 4474-4478 (1989).

12. K Kon, N Maeda, S Misuzu, T Shiga, T Suda, *J Physiol*, 309, 569-590 (1980).
13. C Hook, K Kamaguchi, P Scheid, J Piiper, *Respir physiol*, 72, 65-73 (1988).
14. JM Vanderkooi, J Green, DF Wilson, *Biochem*, 13, 1589-1595, (1974).
15. JF Tocanne, L Cezanne, A Lopez, B Piknova, V Schram, JF Tournier, M Welby, *Chem Phys Lipids*, 73, 139-158 (1994).
16. JA Virtanen, M Ruonala, M Vauhkonen, P Somerharju, *Biochem*, 34 (36), 11568-11581 (1995).
17. EM Manevitch, ML Kapiton, LD Bergelson, *Biochim Biophys Acta*, 815, 455-460 (1985).
18. EH Pap, A Hanicak, A Van Hoek, KW Wirtz, AJ Visser, *Biochem*, 34 (28), 9118-9125 (1995).
19. AS Popel, *Crit Rev Biomed Eng*, 3, 257-321 (1989).
20. L Hoofd, C Bos, Z Turek, *Adv Exp Med Biol*, 345, 893-900 (1994).
21. F Kreuzer, L Hoofd, *Adv Exp Med Biol*, 159, 3-11 (1983).
22. S Fischkoff, JM Vanderkooi. *The Journal of General Physiology*, 65, 663-676 (1975).
23. J Birks Wiley-Interscience. New York, 48 (1970).
24. F Baros, A Naoumi, ML Viriot, JC André, *J Chem Soc Faraday Trans*, 87, 2039-2046 (1991).
25. J Carrero, DM Jameson, E Gratton, *Biophys J*, 54, 143-145 (1995).
26. M Deumié, M El Baraka, E Quinones, *Photochem Photobiol*, 87, 105-113 (1995).
27. S Gatt, E Fibach, *Biochim Biophys Acta*, 5, 447-453 (1988).
28. Y Matsushita, I Moriguchi, *J Pharmacobio Dyn*, 12, 762-770 (1989).
29. R Fiorini, M Glaser, E Gratton, G Curatola, *Biochim Biophys Acta*, 939, 485-490 (1988).
30. NL Vekshin, *J Biochem Biophys Methods*, 15, 97-105 (1987).
31. MA Carbonneau, D Montaudon, M Clerc, *Spectra Biologie*, 87, 31-37 (1987).
32. M Shinitzky, Y Skornick, N Haran-Ghera, *Proc Natl Acad Sci*, 76, (10), 5313-5316 (1979).
33. JT Dodge, C Mitchell, DJ Hanahan, *Arch Biochem Biophys*, 10, 100-119 (1963).
34. HG Rose, M Oklander, *J Lipid Res*, 6, 428-431, (1965).
35. A Zlatkis, B Zak, *Anal Biochem*, 29, 143-148 (1969).
36. S Muller, M Donner, JC Andre, P Haan, Fluofluidimètre. Dans «Techniques en Biorhéologie» Edts JF Stoltz, M Donner, E Puchelle, Séminaire INSERM, 143, 349-351 (1986).
37. JC André, F Baros, A Bouchy, M Bouchy, W Dong, J Duhamel, AT Reis E Sousa, ML Viriot, *Laser Chem*, 10, 431-454 (1990).
38. KH Cheng, L Ruymgaart, L Liu, P Somerharju, *Biophys J*, 67, 902-913 (1994).

### III.2.2.2) Fluidité membranaire et diffusion de l'oxygène dans la membrane érythrocytaire.

Article 4 :

**Membrane fluidity and Oxygen Diffusion in Cholesterol-Enriched Erythrocyte Membrane. Archives of Biochemistry and Biophysics (1997), 341, 1, 34-39. D Dumas, S Muller, F Gouin, F Baros, ML Viriot, JF Stoltz.**

Les études précédentes ont permis de préciser de nombreux points importants dans la détermination des durées de vie de fluorescence :

- l'influence des molécules d'hémoglobine résiduelle membranaire,
- le type d'inhibition de fluorescence des dérivés pyréniques en présence de cholestérol dans la membrane,
- l'effet du cholestérol sur les valeurs des durées de vie,
- la ségrégation des molécules sondes au sein de la membrane selon les rapports C/Pt.

Sur des membranes d'érythrocytes dépourvues d'hémoglobine, nous nous sommes intéressés à l'inhibition des sondes PBA et PDA par l'oxygène moléculaire. La perméabilité de la membrane à l'oxygène a été suivie en fonction des rapports C/Pt. Des mesures de polarisation de fluorescence à l'aide des sondes DPH et TMA-DPH ont permis de vérifier la rigidification membranaire. Le TMA-DPH caractérise des régions membranaires plus ordonnées que celles du DPH. Le TMA-DPH se localise au niveau des têtes polaires des phospholipides, alors que le DPH se trouve dans les régions profondes de la membrane.

Les résultats de cette étude montrent que l'incorporation de cholestérol augmente l'accessibilité du PDA à l'oxygène alors que la partie centrale est plus rigide que la surface interne de la membrane. Cet effet du cholestérol sur la perméabilité membranaire a été décrit par ailleurs dans la littérature (Subczynski et al, 1991 ; Denicola et al, 1996), mais aucune explication à ce phénomène n'a été avancée. Il était attendu que l'augmentation de la microviscosité membranaire aurait comme conséquence une diminution de la diffusion de l'oxygène.

Nous avons tenté d'expliquer ces résultats par la formation de zones restreintes et homogènes de phospholipides dans lesquelles la solubilité de l'oxygène serait supérieure à la valeur moyenne.

## Membrane Fluidity and Oxygen Diffusion in Cholesterol-Enriched Erythrocyte Membrane

Dominique Dumas,<sup>\*1</sup> Sylvaine Muller,<sup>\*</sup> Frédérique Gouin,<sup>\*</sup> Francis Baros,<sup>†</sup> Marie-Laure Viriot,<sup>†</sup> and Jean-François Stoltz<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Laboratoire d'Hématologie, EA 1728, Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France; and <sup>†</sup>DCPR (GRAPP) - URA, 328 CNRS, ENSIC-INPL, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France

Received October 29, 1996, and in revised form February 3, 1997

This work studied the effect of cholesteryl hemisuccinate incorporation on membrane fluidity and on the kinetics of oxygen diffusion at different depths in the erythrocyte membrane. Cholesterol concentration in the membrane was expressed as the cholesterol-protein ratio (C/Pt). The membrane fluidity, as assessed by a fluorescence polarization method with diphenylhexatriene and 1-(4-trimethylamino)-6-phenylhexa-1,3,5-triene, decreased as the C/Pt ratio increased. Time-resolved fluorescence spectroscopy of pyrene dodecanoic acid (PDA) under an increasing C/Pt ratio in the erythrocyte membrane revealed enhanced oxygen diffusion in the middle of the membrane bilayer (in which PDA was incorporated), which was not the case with pyrene butyric acid (PBA) incorporated in the internal part of the membrane surface. It has generally been accepted that increased membrane fluidity reduces the physical barrier to oxygen permeation. Such conflicting observations on oxygen permeation in the rigidified erythrocyte membrane could be due to variations in oxygen solubility (preferential partitioning) in different polarity microdomains (cholesterol and phospholipid partitions). © 1997 Academic Press

**Key Words:** oxygen diffusion; erythrocyte membrane; cholesterol; membrane fluidity; fluorescence quenching.

It has been known for some time that the membrane bilayer is a resistance factor to oxygen diffusive passage (1) or to the diffusion of small soluble lipid molecules (2). Oxygen molecules pass through the lipid bilayer where rapid rotation and acyl chain motion (transbilayer movement) would facilitate oxygen diffu-

sion. A variety of techniques have shown that the rigid steroid ring structure of cholesterol reduces the mobility of the phospholipid acyl chains observed in the liquid state. If the frequency and amplitude of lipid motion were significantly decreased or suppressed in the presence of cholesterol (3), the rate of oxygen diffusion should decrease. So, cholesterol should reduce the oxygen diffusion coefficient in dimyristoyllecithin cholesterol (3:1) (4).

Some techniques have been developed to quantify the diffusiveness of oxygen in cholesterol-enriched erythrocyte membrane but they all suffer major flaws (5, 6). To escape the influence of allosteric effectors and oxygen transfer facilitation by hemoglobin (7), a technique of pyrene derivative fluorescence quenching by oxygen in the erythrocyte membrane was applied (8). Butyric (PBA)<sup>2</sup> and dodecanoic (PDA) pyrene derivatives are anchored by their carboxyl end near the phospholipid group regions, at the partitioning interface between the extracellular aqueous and lipid membrane areas. Depending on the alkyl chain, C<sub>4</sub> for PBA and C<sub>12</sub> for PDA, respectively, the pyrenyl moiety is introduced at variable depths in the hydrocarbon core (9) (Fig. 1). Fluorescence quenching techniques using pyrene derivatives as probes, which have a long lifetime in excited state (ca.  $\tau = 200$  ns) (time window), are used to study molecular transport processes on a larger scale (ca. 100–150 Å), the root mean square distance over which a quencher can diffuse during the lifetime of the probe in an excited state. The bimolecular quenching constant,  $K_q$ , represents the collision fre-

<sup>2</sup> Abbreviations used: C/Pt, cholesterol/protein ratio; DMF, dimethylformamide; DPA, diphenyl anthracene; DPH, diphenylhexatriene; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid;  $K_d$ , dynamic constant quenching; PBA, pyrene butyric acid; PDA, pyrene dodecanoic acid; THF, tetrahydrofuran; TMA-DPH, 1-(4-trimethylamino)phenyl-6-phenylhexa-1,3,5-triene.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: +33 83 59 26 43. E-mail: Dumas@hemato.u-nancy.fr.



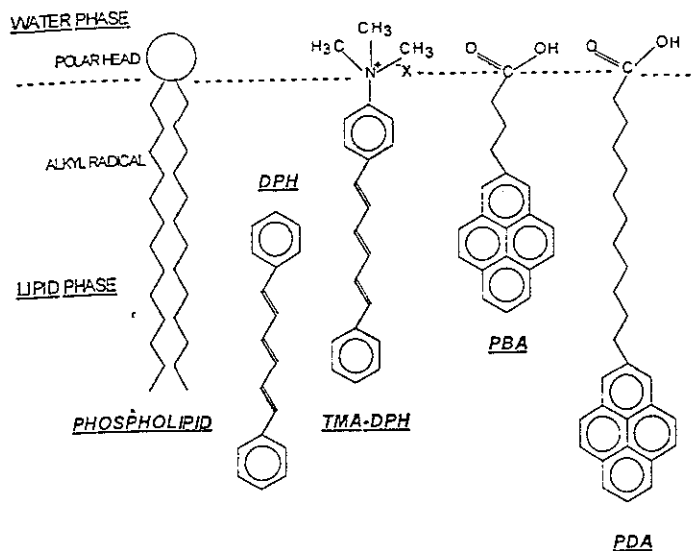


FIG. 1. Schematic representation and abbreviation symbols of the probe within the bilayer.

quency between the fluorophore (PBA or PDA) and the quencher (oxygen) (10). If a given solvent is very viscous, then diffusion is slow and quenching is inhibited. Hence, quenching constants can reveal the diffusion rates of quenchers, which can be affected by the presence of phospholipids, proteins, or cholesterol (11). Because this quenching is proportional to the local quencher concentration, oxygen diffusion data can be obtained. The diffusiveness of oxygen in the membrane system is thought to vary with fluidity (12, 13) in close relationship with temperature. Many studies on biological membrane domains are interpreted with regard to the existence of gel-phase domains. Acyl chain mobility would be reduced with cholesterol amounts above the lipid-phase transition and would increase below that temperature (14). This result was clearly demonstrated, with pure lipid vesicles in particular (7, 15). The effect of temperature on erythrocyte membrane global phase transition, as studied from the fluorescence lifetime (16), is controversial (17–19). In the case of a biologically complex membrane for which no global transition temperature has been defined, oxygen diffusion would be directly dependent on membrane fluidity. To monitor such modifications at the microscopic level, membrane fluidity, as assessed by fluorescence polarization, a method sensitive to the packing density induced by cholesterol, was used to provide information on heterogeneous microenvironments (20). DPH (diphenylhexatriene) was found to incorporate hydrocarbon inside the membrane and TMA-DPH (1-(4-(trimethylamino)phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene) was found to anchor by its cationic part (head) at the membrane/water interface (Fig. 1) (21–23). Increasing the amount of cholesterol in the membrane was seen to

increase the apparent microviscosity (4, 24, 25). Reduced motion, interpreted as reflecting increased viscosity, should result in slower molecular diffusion (26).

Oxygen diffusion in the erythrocyte membrane rigidified by cholesterol has been little investigated. It appeared to be of some interest to verify whether determining oxygen diffusion through its fluorescence quenching potential would confirm the predictions based on membrane fluidity. In the present study, we investigated the correlation between microscopic parameters (fluidity) and the oxygen diffusion process in the cholesterol-enriched erythrocyte membrane. Membrane rigidification at various depths was assessed by fluorescence polarization of probes (TMA-DPH, DPH) specific for each membrane compartment.

## MATERIALS AND METHODS

**Incorporation of cholesteryl hemisuccinate and membrane preparation.** Human erythrocyte suspensions were prepared from human fresh venous blood (Blood Transfusion Center, Vandoeuvre-les-Nancy, France) collected on EDTA anticoagulant and were washed three times with an isotonic pH 7.4 phosphate buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mOsm). We used cholesteryl hemisuccinate instead of cholesterol because of its miscibility without phase separation at the required concentrations (27). Cholesteryl hemisuccinate incorporation was performed according to Shinitzky's modified procedure (28): 2 mL of an erythrocyte suspension at 20% hematocrit was added to the incorporation medium (20 mL; 3.5% polyvinylpyrrolidone, 0.4% glucose, 1% albumin, and 0.8% HEPES) with various concentrations of cholesteryl hemisuccinate (0.250 mg/mL previously solubilized in ethanol). A control solution was prepared under similar conditions but in an incorporation medium which contained the same proportion of ethanol (0.1%) without cholesteryl hemisuccinate. The erythrocyte ghosts were prepared by osmotic shock according to Dodge's method (29) and the protocol was repeated at least eight times to totally eliminate the influence of residual hemoglobin on membrane fluidity and fluorescence lifetime. The membrane concentration was determined by membrane protein assay (bicinchoninic acid protein assay, Sigma) with a mixture of human albumin and globulins. The amount of total cholesteryl hemisuccinate incorporated in the membrane after extraction (30) was obtained using a colorimetric method (31) based on a standard curve of cholesteryl hemisuccinate in ethanol. In contrast to the lipid bilayer, membrane proteins are barely compressible and can be seen as bulky rigid domains in the lipid fluid matrix. The effect of proteins on lipid dynamics is similar to that of cholesterol. Therefore, the cholesterol-protein (C/Pt) index can serve as a quantitative parameter of correlation with membrane rigidity. A blank phosphate buffer permitted assessment of the influence of incubation and ethanol. Similar results (membrane fluidity and oxygen diffusiveness) were found with both control buffers.

**Fluorescent probes and staining.** Stock solutions of probes were stored at +4°C: 2 mM DPH in THF (tetrahydrofuran), 2 mM TMA-DPH in DMF (dimethylformamide), 1 mM PBA and PDA in DMF. All probes were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). For labeling, 3-mL stock solutions were added to 1 mL of the erythrocyte membrane suspension (300 mg/ml) in 2 mL phosphate buffer (PBS, pH 7.4). After incubation for 30 min, the suspension was centrifuged at 10,000 rpm (Beckman J21 centrifuge, Beckman Instruments, Gagny, France) and the membrane-packed cells were resuspended in 3 mL phosphate buffer. The PBA and PDA concentrations in the erythrocyte membrane were checked using a molar extinction coefficient of  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 343 nm (Beckman UV-DU640 spectropho-

tometer). The absence of excimers was confirmed by the absence of fluorescence emission at 470 nm. The concentrations used (1 mM for the probes, 1/100 dilution for solvents) were too low to alter membrane fluidity.

**Membrane fluidity.** Membrane fluidity was studied by a fluorescence polarization method which measures the fluorescence anisotropy ( $r$ ) of two probes incorporated in the membrane (DPH, TMA-DPH). The fluorescence anisotropy at 25°C was measured with a home-built T-format continuous excitation spectrofluorometer (32) (Regulest, 57000 Florange, France) and according to the formula ( $r = I_{\parallel} - I_{\perp} / 2(I_{\parallel} + I_{\perp})$ ), where  $I_{\parallel}$  and  $I_{\perp}$  were the parallel and perpendicular emission intensities, respectively. The excitation wavelength was set to 365 nm and the emission wavelength to 425 nm. The background noise of light diffusion was corrected by a control membrane suspension. Results are expressed as percentages of the anisotropy value measured on the blank control (without cholesterol hemisuccinate). All measurements were carried out in duplicate, with the standard deviation never exceeding 1.4%.

**Time-resolved fluorescence.** The fluorescence lifetime tests were performed with a multifrequency cross-correlation fluorometer (SLM AMINCO 48000, SLM Instruments Inc., Urbana, IL). The tests were carried out by reference to a DPA solution (9.24 ns in ethanol) and 343-nm excitation wavelength. A band filter selects the integral part of the monomer emission spectrum (365–420 nm). In oxygen-quenching experiments, a gaseous mixture was obtained by using the various oxygen and nitrogen outflows and a gas mixer. The gas was bubbled in the dark (atmospheric pressure) in a quartz 199QS circulation well that contained the membrane suspension (25°C). Data analysis by curve smoothing was carried out according to a two-discrete-component exponential decline for which the  $\chi^2$  test was optimized. The results are presented as the means  $\pm$  standard deviations of five independent assays.

**Pyrene derivative quenching by oxygen accessibility.** In the absence of static quenching, collisional fluorescence quenching is described by the Stern-Volmer equation (33):  $\tau_0/\tau = 1 + K_d[O_2]$ . In that equation,  $\tau_0$  and  $\tau$  are the excited state lifetimes in the absence and in the presence of oxygen, respectively,  $K_d$  is the quenching dynamic constant, and  $[O_2]$  is the oxygen concentration. In the case of membrane-embedded probes, the bimolecular quenching constant  $k_q$  represents the accessibility (collision frequency) of the fluorophore to the quencher with  $K_d = \tau_0 k_q$  (as obtained from the slope of the regression line between  $P(O_2)$  and  $\tau_0/\tau$ ). To compute the global oxygen diffusion coefficient (lateral and transverse) from the  $k_q$  value, it is necessary to know the exact concentration of oxygen in each membrane compartment. However, it was difficult to determine the oxygen diffusion coefficient (Einstein-Smoluchowski equation) because the variation of oxygen solubility (hence the oxygen concentration) in those various phases could not be quantified. Nevertheless, the changes in the characteristic values of probe accessibility ( $k_q$ ) to oxygen made it possible to assess the diffusion-solubility phenomenon.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Influence of Cholesterol on Fluidity in Ghost Erythrocytes*

The steady-state anisotropy ( $\langle r \rangle$ ) of environment-sensitive probes was measured in control (C/Pt ratio of 0.18) and cholesterol-rich erythrocyte membranes. The relative changes in fluorescence anisotropy, compared with the anisotropy value obtained in the control with probes DPH and TMA-DPH under the conditions used for erythrocyte membrane labeling, are shown (Fig. 2). With both probes, the results revealed an increase in  $\langle r \rangle$

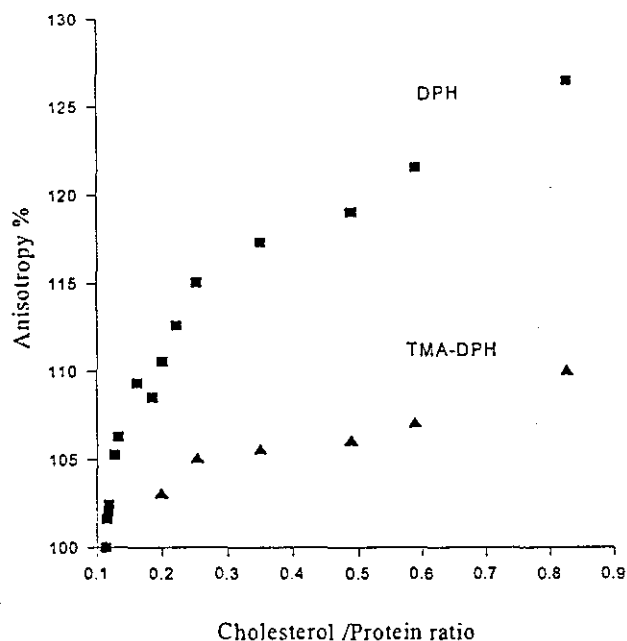


FIG. 2. Effects of cholesterol (at the given ratio of cholesterol to protein) on the relative evolution of fluorescence anisotropies in relation to the anisotropy value measured in control with TMA-DPH and DPH.

according to the C/Pt ratio. Membrane fluidity values, which indicate that the DPH and TMA-DPH freedom of rotary motion decreased as the cholesterol amount increased, were consistent with results from other studies. These results confirmed that the conformation dynamics of acyl chains at various depths is altered by the presence of cholesterol (34). However, it is worth noting that anisotropy variations are wider, when the tetracyclic nucleus of cholesterol is in the proximity of the benzenic nucleus of DPH. This probe, incorporated deeper than TMA-DPH, would prove more sensitive to the environmental variations linked to cholesterol proximity. So, cholesterol-induced membrane rigidification was verified.

### *Influence of Cholesterol and Temperature on PDA Fluorescent Lifetime*

The PDA fluorescence lifetime was determined at various temperatures and with different C/Pt ratios (from 0.18 to 0.83) (Fig. 3). With three C/Pt ratio values, the evolution of PDA lifetime with temperature did not identify any given temperature at which the immediate environment of the probe would be radically altered. No clear-cut break in the decline evolution at any given temperature was observed in relation to the membrane C/Pt ratio. This behavior is to be related to the fact that the membrane is a heterogeneous system where molecular interactions, variably strong according to components (glycoproteins, phospholipids), warrant

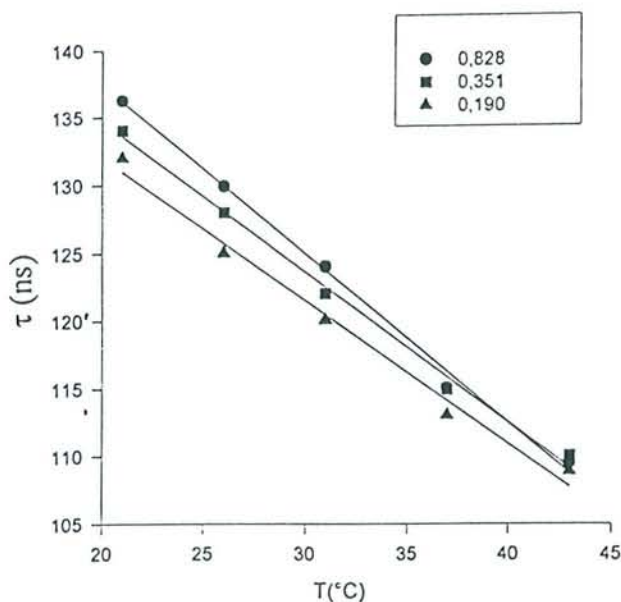


FIG. 3. Effect of temperature on the PDA lifetime in erythrocyte membrane according to the C/Pt ratio: 0.190 ( $\blacktriangle$ ), 0.35 ( $\blacksquare$ ), 0.83 ( $\bullet$ ).

the overall cohesion. These results are consistent with the fact that the erythrocyte membrane cannot be characterized by a phase transition temperature.

#### Influence of Cholesterol on PBA Accessibility to Oxygen

Figure 4 shows the effect of cholesterol on PBA fluorescence quenching by oxygen. PBA accessibility to oxygen ( $k_q = K_d/\tau_0$ ) decreased significantly after incorporation of cholesterol:  $11.34 \times 10^6 \text{ atm}^{-1}$  in the absence of cholesterol addition (C/Pt ratio = 0.18) and  $10.29 \times 10^6 \text{ atm}^{-1}$  after cholesterol addition (C/Pt ratio = 0.19) (Table I), reflecting the relative resistance to oxygen diffusive passage. With the C/Pt ratio increasing from 0.19 to 0.83, there was no correlation between PBA accessibility and C/Pt ratio values. With a C/Pt ratio of 0.19, minimum accessibility was reached ( $-9.7\%$ ) and remained constant ( $-6.6 \pm 2.6\%$ ) as the C/Pt ratio increased (Table I). This may mean that the intensity of the PBA fluorescence signal was insensitive to the hydrophobicity linked to the presence of cholesterol. Although the surface marker (TMA-DPH) reflected increased medium cohesion in relation to the C/Pt ratio, no significant variation of PDA accessibility to oxygen was observed (with a C/Pt ratio  $>0.19$ ). So, the membrane rigidification linked to cholesterol incorporation would reduce oxygen diffusiveness on the lipid bilayer surface. Moreover, the responsiveness evoked by changes in PBA accessibility was unrelated to the C/Pt ratio value.

#### Influence of Cholesterol on PDA Accessibility to Oxygen

The PDA results are shown in Fig. 5. The  $k_q$  values increased with the C/Pt ratio (from  $8.83 \times 10^6$  to  $10.52 \times 10^6 \text{ atm}^{-1}$ , Table I). Because that reaction is concentration-dependent, these results support the following hypothesis on oxygen solubility: determination of accessibility in terms of bimolecular inhibition constants ( $k_q$ ) is only valid if oxygen solubility is constant in the various membrane compartments it passes through. Variably phospholipid- or cholesterol-rich areas may be distinguished from the different oxygen solubility values. Phospholipid exclusion would be at the origin of restricted and homogeneous areas where oxygen solubility would be higher than average. In those phospholipid-rich microdomains, PBA accessibility to oxygen would be the same, whereas it would be higher for the PDA localized in the hydrocarbon region of the membrane. This structural heterogeneity of the membrane in two phases would account for the increased accessibility of the probe incorporated at the same depth than cholesterol.

We demonstrated a close relationship between membrane microviscosity and the C/Pt ratio. Cholesterol is known to modify the membrane properties by reducing fatty acyl chain motion (condensing effect) in the phospholipid membrane and consequently the membrane becomes rigid and less deformable. The constraint of the hydro-

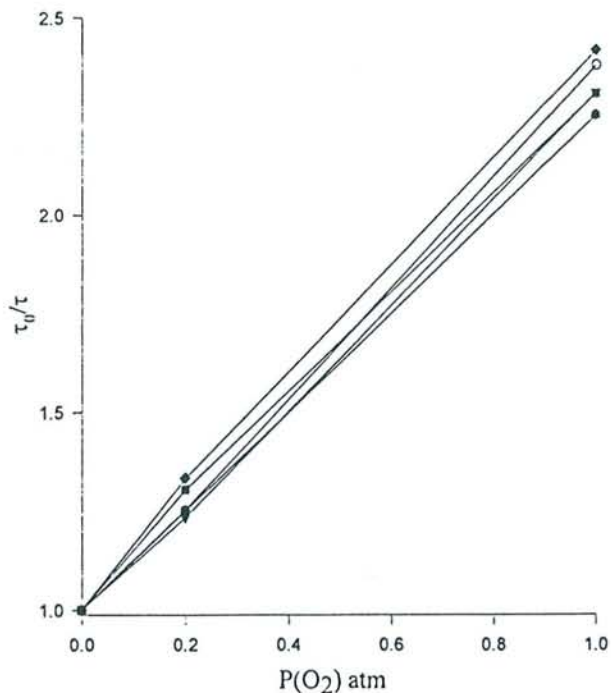


FIG. 4. Effect of erythrocyte membrane cholesterol/protein ratio (C/Pt ratio:  $\circ$ , control (no added cholesterol);  $\bullet$ , 0.19;  $\blacksquare$ , 0.35;  $\blacktriangle$ , 0.65;  $\blacktriangledown$ , 0.71;  $\blacklozenge$ , 0.83) on PBA lifetime fluorescence quenching by oxygen.

TABLE I  
Quenching Constant Values (Accessibility PBA and PDA to Oxygen)  
in the Erythrocyte Ghost for Each Cholesterol/Protein Ratio

	Cholesterol/protein ratio					
	0.18 (control)	0.19	0.35	0.65	0.71	0.83
PDA inhibition, $k_q$ ( $10^6$ )	$8.83 \pm 0.12$	$8.90 \pm 0.09$	$8.72 \pm 0.16$	$9.33 \pm 0.10$	$10.04 \pm 0.18$	$10.52 \pm 0.21$
PBA inhibition, $k_q$ ( $10^6$ )	$11.34 \pm 0.07$	$10.29 \pm 0.12$	$10.54 \pm 0.17$	$10.77 \pm 0.08$	$10.72 \pm 0.13$	$10.62 \pm 0.09$

philic moiety on the cholesterol molecule would place the conjugated ring structure toward the surface of the membrane, which would explain why the membrane core would be rigidified more than the surface. This conclusion is supported by many studies. We showed that oxygen diffusion was increased in the central part of the cholesterol-enriched erythrocyte membrane, whereas it remained unchanged at the water/membrane interface (for C/Pt ratio values  $>0.19$ ). Other results involving a cholesterol-enriched phosphatidylcholine artificial membrane are consistent (4) but in this work, assuming that oxygen concentration was the same in the membrane and in the aqueous medium, the diffusion-solubility coefficient had not been precisely determined. A study showed that oxy-

gen would diffuse more rapidly in the middle of unsaturated phosphatidylcholine-cholesterol membranes (35) than on the surface. It has been suggested in a recent paper (36) that the presence of cholesterol and membrane proteins would facilitate oxygen diffusion toward the middle of the membrane. The results described here lead to similar conclusions in enriched membrane erythrocytes. Only the changes in PBA and PDA accessibility to oxygen were compared. However, nothing proves that oxygen diffusion is greater in the middle part of the membrane than at the water/membrane interface (extracellular aqueous and lipid membrane areas). The increase in oxygen diffusion cannot be explained by an increase in membrane fluidity leading to a reduction of the physical barrier to oxygen permeation (1). In the erythrocyte membrane, phospholipids are in a state of dynamic equilibrium between the two monolayers. Phospholipids would be segregated in restricted areas (37). In particular, it appears that sphingomyelin and phosphatidylcholine are localized in the outer monolayer of the erythrocyte membrane and phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the inner monolayer. In the acyl chain matrix of cholesterol/dimyristoylphosphatidylcholine, cholesterol molecules would be regularly distributed among the micro- and macrodomains where cholesterol concentration would be higher than the macroscopic average value (38-41). There is no direct evidence that the responsiveness evoked by the changes in oxygen permeation is determined by the micro- and macrodomains where cholesterol concentration would be higher than the macroscopic average. The oxygen partition coefficient would vary in relation with area hydrophobicity at different depths in the membrane. No correlation between hydrophobicity and oxygen solubility in a membrane has been reported. The present study provides evidence that oxygen diffusiveness is increased by cholesterol incorporation in the hydrocarbon core of the erythrocyte membrane.

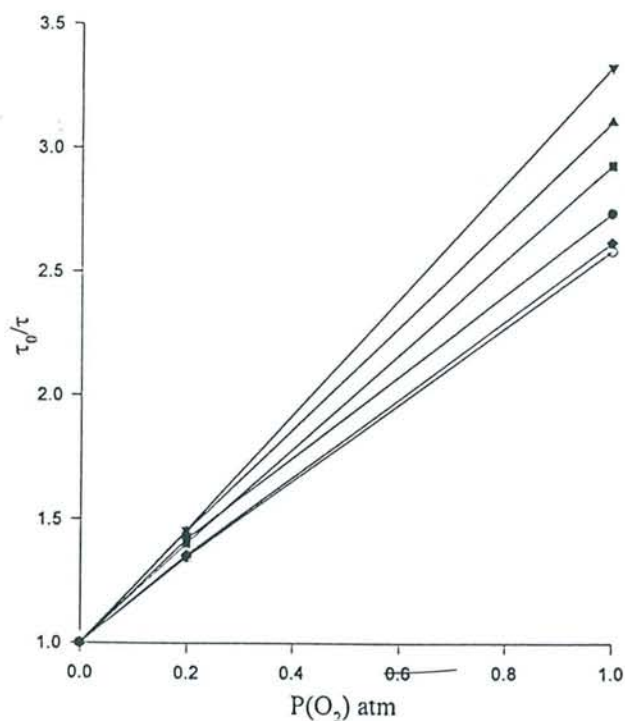


FIG. 5. Effect of erythrocyte membrane cholesterol/protein ratio (C/Pt ratio:  $\circ$ , control (no added cholesterol);  $\bullet$ , 0.19;  $\blacksquare$ , 0.35;  $\blacktriangle$ , 0.65;  $\blacktriangledown$ , 0.71;  $\blacklozenge$ , 0.83) on PDA lifetime fluorescence quenching by oxygen.

#### CONCLUSION

This study was aimed at studying oxygen diffusiveness by a method which consisted of quenching fluorescent probes (PBA and PDA) incorporated at various

depths in the cholesterol-enriched erythrocyte membrane. By measuring the anisotropic values of the fluorescence emitted by specific markers of certain membrane components (TMA-DPH, DPH), we verified that cholesterol incorporation was accompanied by increased membrane rigidity. The middle part of the membrane (hydrocarbon core) would be more rigid than the area at the water/membrane interface. Erythrocyte membrane rigidification induced by cholesterol disrupted the hydrophilic regions of the membrane, as reflected by the TMA-DPH anisotropy values. With increasing cholesterol concentrations, oxygen diffusion would increase in the middle of the membrane (PDA incorporation site) more than predicted from the microviscosity value obtained with DPH, whereas it would remain unchanged at the interface between the extracellular aqueous and membrane lipid areas (PBA incorporation site). The changes were not associated with depth-dependent alterations in transition temperature in restricted areas. At that stage, the membrane fluidity and oxygen diffusion results appear to be contradictory. It was indeed expected that the increased degree of membrane rearrangement would reduce oxygen diffusion. To conclude, membrane fluidity provides no direct information on oxygen diffusiveness inside the membrane, especially during rigidification induced by cholesterol incorporation.

## REFERENCES

- Hook, C., Kamaguchi, K., Scheid, P., and Piiper, J. (1988) *Respir. Physiol.* **72**, 65-73.
- Garrick, R. A., Ryan, U. S., Bower, V., Cua, W. O., and Chinard, F. P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1148**, 108-116.
- Le Guerneve, C., and Auger, M. (1995) *Biophys. J.* **68**(5), 1952-1959.
- Vanderkooi, J. M., Green, J., and Wilson, D. F. (1974) *Biochemistry* **13**, 1589-1595.
- Popel, A. S. (1989) *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **3**, 257-321.
- Hoofd, L., Bos, C., and Turek, Z. (1994) *Adv. Exp. Med. Biol.* **345**, 893-900.
- Kreuzer, F., and Hoofd, L. (1983) *Adv. Exp. Med. Biol.* **159**, 3-11.
- Fischkoff, S., and Vanderkooi, J. M. (1975) *J. Gen. Physiol.* **65**, 663-676.
- Deumié, M., El Baraka, M., and Quinones, E. (1995) *Photochem. Photobiol.* **87**, 105-113.
- Carrero, J., Jameson, D. M., and Gratton, E. (1995) *Biophys. J.* **54**, 143-145.
- Baros, F., Naoumi, A., Viriot, M. L., and Andre, J. C. (1991) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **87**, 2039-2046.
- Geiger, M. W., and Turro, N. J. (1977) *Photochem. Photobiol.* **26**, 221-224.
- Vekshin, N. L. J. (1987) *Biochem. Biophys. Methods* **15**, 97-105.
- Carbonneau, M. A., Montaudon, D., and Clerc, M. (1987) *Spectra Biol.* **87**, 31-37.
- Wahnon, R., Mokady, S., and Cogan, U. (1989) *Mech. Ageing. Dev.* **50**, 249-255.
- Fiorini, R., and Curatola, G. (1991) *Appl. Fluorescence Tech.* **3**, 33-38.
- Galla, H. J., and Luisetti, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **596**, 108-117.
- Grimaldi, P., Minetti, M., Pugliese, P., and Isacchi, G. (1989) *J. Cell. Biochem.* **41**, 25-35.
- Kunitsyn, V. G., Kurilovich, S. A., and Volchenko, M. V. (1993) *Byull. Eksp. Biol. Med.* **116**, 595-598.
- Donner, M., and Stoltz, J. F. (1985) *Biorheology* **22**, 385-397.
- Huang, Z., and Haugland, R. P. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 166-171.
- Illinger, D., Duportail, G., Poirel-Morales, N., Gerard, D., and Kuhl, J. G. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1239**, 58-66.
- Pebay-Peyroula, E., Dufourc, E. J., and Szabo, A. G. (1994) *Biophys. Chem.* **53**, 45-56.
- Cooper, R. A., Leslie, M. H., Fishkoff, S., Shinitzky, M., and Shattil, S. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 327-331.
- Vélez, M., Lillo, M. P., Acuna, A. U., and Gonzalez-Rodriguez, J. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 343-350.
- Lieb, W. R., and Stein, W. D. (1986) in *Transport and Diffusion across Cell Membranes* (Stein, W. D., Ed.), pp. 69-112, Academic Press, San Diego.
- Bach, D., Borochof, N., Wachtel, E. J., and Shinitzky, M. (1995) *Chem. Phys. Lipids* **76**(1), 123-127.
- Shinitzky, M., Skornick, Y., and Haran-Ghera, N. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**(10), 5313-5316.
- Dodge, J. Y., Mitchell, C., and Hanahan, D. J. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* **10**, 100-119.
- Rose, H. G., and Oklander, M. (1965) *J. Lipid Res.* **6**, 428-431.
- Zlatkis, A., and Zak, B. (1969) *Anal. Biochem.* **29**, 143-148.
- Muller, S., Donner, M., Andre, J. C., and Haan, P. (1986) in *Techniques en Biorhéologie* (Stoltz, J. F., Donner, M., and Puchelle, E., Eds.), Vol. 143, pp. 349-351, Séminaire INSERM.
- Stern, O., and Volmer, M. (1919) *Phys. Z.* **20**, 183-188.
- Cheng, K. H., Ruymgaart, L., Liu, L., and Somerharju, P. (1994) *Biophys. J.* **67**, 902-913.
- Subczynski, W. K., Hyde, J. S., and Kusumi, A. (1991) *Biochemistry* **30**, 8578-8590.
- Denicola, A., Souza, J. M., Radi, R., and Lissi, E. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **328**, 208-212.
- Manevitch, E. M., Kapiton, M. L., and Bergelson, L. D. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **815**, 455-460.
- Tocanne, J. F., Cezanne, L., Lopez, A., Piknova, B., Schram, V., Tournier, J. F., and Welby, M. (1994) *Chem. Phys. Lipids* **73**, 139-158.
- Virtanen, J. A., Ruonala, M., Vauhkonen, M., and Somerharju, P. (1995) *Biochemistry* **34**(36), 11568-11581.
- Tang, D., Wieb van der Meer, B., and Chen, S. Y. (1995) *Biophys. J.* **68**(5), 1944-1951.
- Reyes Mateo, C., Ulises Acuna, A., and Brochon, J. C. (1995) *Biophys. J.* **68**(3), 978-987.

### III.3) EFFET DE LA VISCOSITE PLASMATIQUE SUR LA DIFFUSION DE L'OXYGENE

Des études épidémiologiques ont montré que tous les facteurs de risque dans les maladies cardio-vasculaires étaient associés à la viscosité apparente du sang (notée  $\eta_a$ ) et/ou du plasma (notée  $\eta_p$ ) (Lowe, 1992). La viscosité du plasma a été associée à certaines maladies ischémiantes (Yarnell et al, 1988 et 1991) principalement dues à la concentration en protéines plasmatiques, en particulier le fibrinogène et les gammaglobulines.

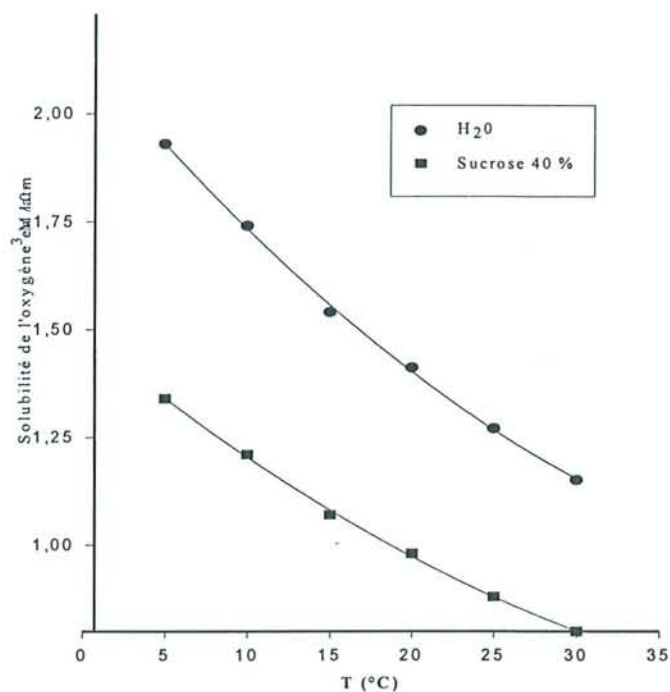
Le transport global de l'oxygène, c'est-à-dire l'acheminement en globules rouges véhiculant l'oxygène dépend du rapport  $H/\eta$  avec  $H$  l'hématocrite du sang et  $\eta$  la viscosité sanguine dont une composante est représentée par la viscosité plasmatique ( $\eta_p$ ) (Stoltz et al, 1996).

Lorsque l'oxygène est libéré par les globules rouges, la capacité de transport (solubilité-diffusion) du sang est un paramètre important, particulièrement dans la microcirculation qui représente essentiellement le champ d'action de l'hyperviscosité. Dans les capillaires, l'écoulement du sang (non uniforme) est caractérisé par l'existence de deux couches : une couche laminaire périphérique presque immobile (globules blancs en majorité) et une zone centrale qui se déplace rapidement (érythrocytes en majorité). Au niveau de l'artériole et de la veinule, la circulation du sang tend à être laminaire, avec au centre, les éléments figurés (globules rouges et leucocytes) circulant à vitesse rapide et le plasma le long de la paroi circulant à vitesse plus lente. La viscosité du plasma de la couche laminaire périphérique représente donc un facteur macroscopique d'importance dans le phénomène de diffusion de l'oxygène des érythrocytes vers les tissus adjacents.

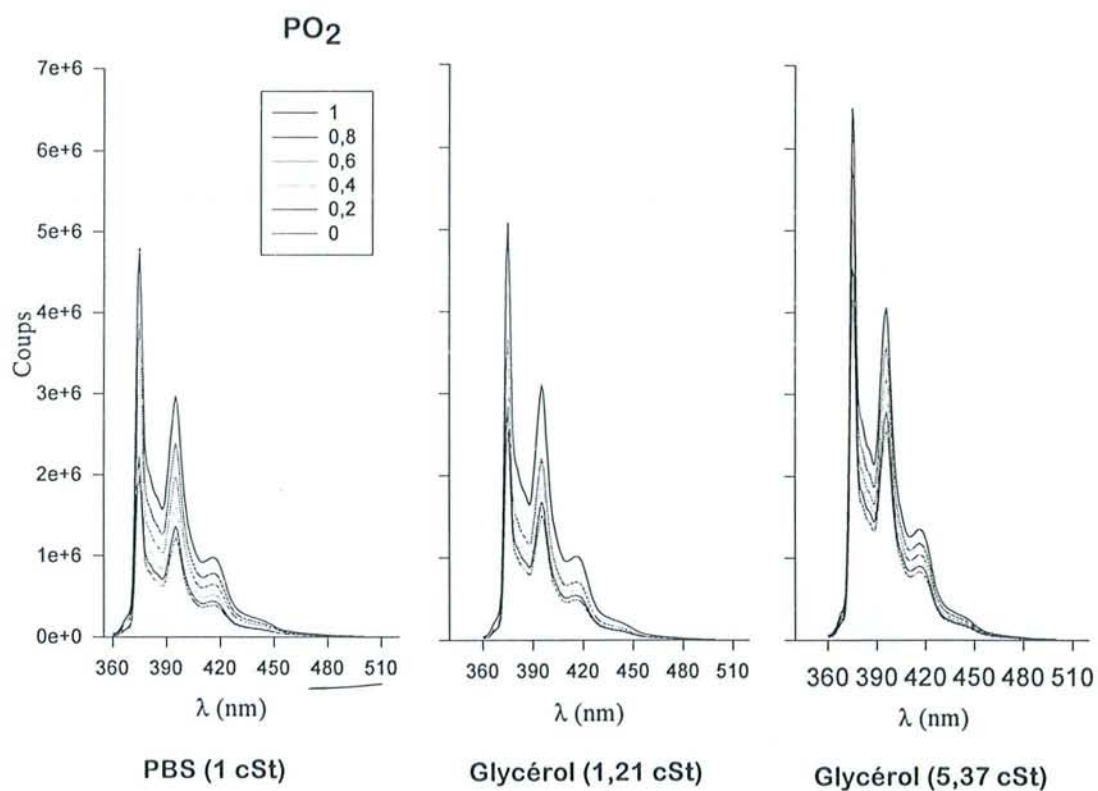
#### III.3.1) Influence de la viscosité de diverses solutions sur la diffusion de l'oxygène

Cette relation entre la viscosité d'une solution et la solubilité-diffusion de l'oxygène est illustrée par la Figure 42 qui montre la variation de la solubilité de l'oxygène dans des solutions de sucrose en étroite relation avec la température.

Pour apprécier l'effet de la viscosité sur le phénomène de diffusion de l'oxygène, nous avons étudié l'inhibition de fluorescence de l'acide pyrène butyrique (PBA,  $1\mu\text{M}$ ) en fonction de la  $\text{PO}_2$  appliquée. Le protocole est décrit dans la partie II.2.10.2.b3. La Figure 43 montre les spectres d'émission de fluorescence du PBA pour des solutions de glycérol de différentes viscosités dans de l'eau distillée et pour le PBS.

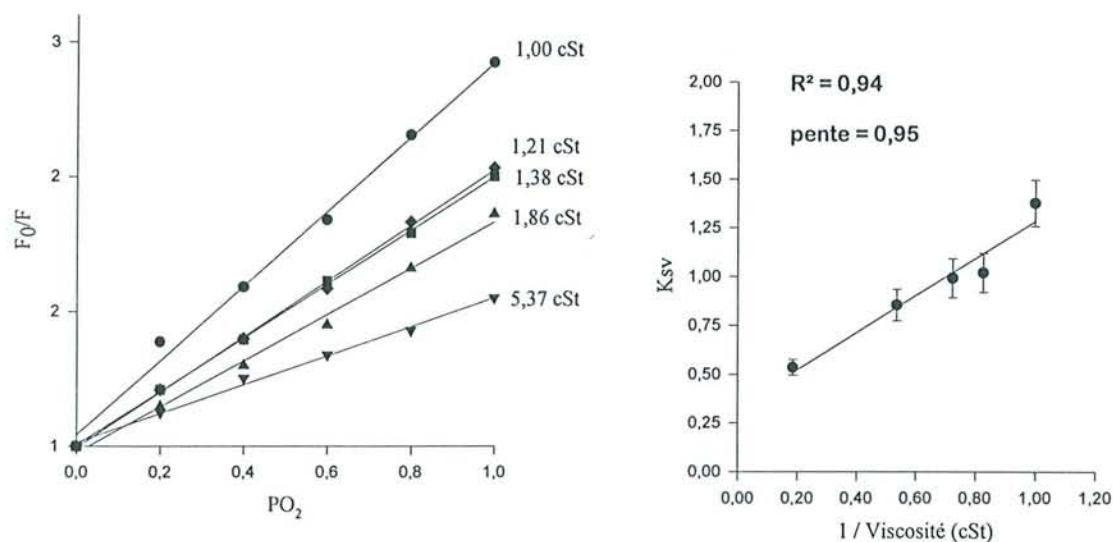


**Figure 42** : Evolution de la solubilité de l'oxygène en fonction de la viscosité et de la température. D'après Carrero, 1995.



**Figure 43** . Evolution à 25 °C des spectres d'émission de fluorescence du PBA (1  $\mu$ M) dans des solutions de PBS et de glycérol présentant des viscosités différentes en fonction de la  $PO_2$ .

L'évolution de la constante d'inhibition  $K_{sv}$  du PBA par l'oxygène est fonction de l'inverse de la viscosité (Figure 44). Ces résultats font apparaître que la viscosité d'une solution constitue un paramètre macroscopique d'importance dans le phénomène de diffusion de l'oxygène.



**Figure 44** : Effet de la viscosité des solutions de glycérol. sur les intensités de fluorescence et sur les constantes d'inhibition  $K_{sv}$  du PBA par l'oxygène.

### III.3.2) Influence de la viscosité d'une suspension de plasma sur la diffusion de l'oxygène

Comme le montrent les résultats précédents, la diffusibilité des molécules d'oxygène est réduite par l'augmentation de la viscosité du milieu environnant (glycérol).

Nous avons reproduit ce type d'expérience dans les mêmes conditions expérimentales avec des suspensions de plasmas sanguins. Il s'agit de plasmas prélevés chez des donneurs sains et des patients atteints respectivement de macroglobulinémie de Waldeström et de Kahler. Le Tableau 14 rassemble les résultats des dosages biochimiques de ces plasmas. Les dosages font apparaître un taux anormal d'IgM pour le plasma dont la viscosité mesurée est de 4,35 cSt et un taux anormal d'IgG pour le plasma ayant une viscosité de 1,41 cSt.



Composition g/L	1,2 cSt	1,41 cSt	4,35 cSt
[Fibrinogène] g/L		3,8	4,2
[IgG] g/L	7,10	44,4	10,2,1
[IgA] g/L	1,02	< 0,07	1,34
[IgM] g/L	1,21	0,13	63,1
[Albumine] g/L	29,3	24,7	-
$\alpha 1$ g/L	2,1	1,6	-
$\alpha 2$ g/L	4,1	9	-
$\beta$ g/L	5,8	4,9	-
$\gamma$ g/L	9,7	36,7	-
Total protéine	51	77	-
Albumine/globuline	1,35	0,47	-

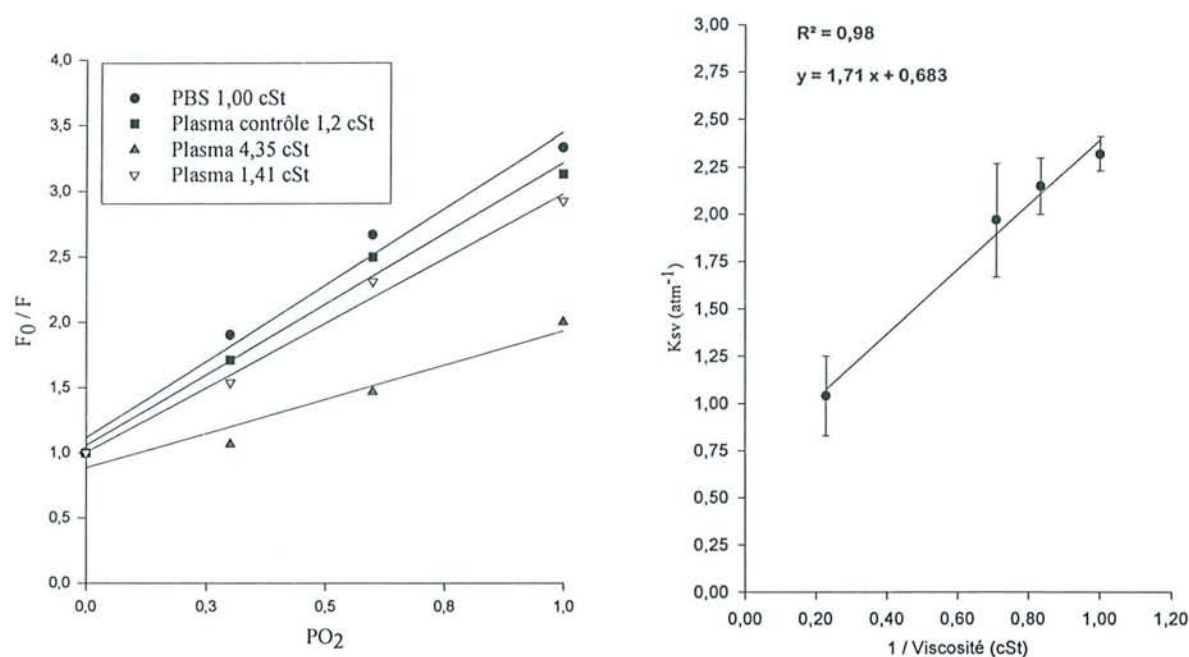
**Tableau 14** : Composition biochimique des plasmas utilisés.

Le protocole d'incorporation du PBA est décrit dans la partie II.2.10.2.b32 et le principe de la détermination de la constante d'inhibition  $K_{sv}$  figure dans la partie I.3.4.6.

La linéarité de la représentation de Stern-Volmer pour le PBA (Figure 45) est respectée dans les solutions de PBS (1 cSt) et de plasma peu visqueux (1,2 et 1,41 cSt) alors que ce n'est plus absolument le cas pour le plasma présentant une hyperviscosité (4,35 cSt). Ces résultats montrent que l'accessibilité de la sonde à l'oxygène diminue avec la viscosité du plasma, c'est-à-dire en présence d'obstacles (Baros et al, 1991). Une explication de la déviation à la linéarité, c'est-à-dire le non-respect de l'équation de Stern-Volmer a été apporté en partie par Li et Wong (1992) qui ont proposé un modèle qui tient compte de la non-linéarité de la dissolution des gaz. Ceci revient à introduire un écart à la loi de Henry (cf. Annexe5). Dans ce modèle, les déclins multi-exponentiels ne sont pas prévus comme dans le cas du modèle multi-sites de Demas et al, 1995.

### III.3.3) Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que l'accessibilité de la sonde fluorescente à l'oxygène diminuait avec la viscosité du milieu environnant. Il en découle que des pathologies pour lesquelles la viscosité plasmatique est augmentée peuvent contribuer au phénomène d'hypoxie tissulaire. L'équation déterminée (Figure 45) permettrait d'obtenir une information préliminaire sur la capacité diffusionnelle d'un plasma à partir de la viscosité mesurée. Cependant, cette étude a mis en évidence les limites de notre méthode dans le cas des plasmas hypervisqueux pour lesquels la linéarité de la représentation de Stern-Volmer n'est pas retrouvée. Il est envisageable de reproduire cette étude sur des suspensions de plasmas présentant des différences de viscosité moins marquées, par exemple entre 1,2 et 2,5 cSt, ce qui permettrait d'aborder des cas cliniques plus nombreux (selon la macroglobulinémie) et d'ajuster ce modèle empirique simple à la réalité.



**Figure 45** : Effet de la viscosité plasmatique sur les intensités de fluorescence et sur les constantes d'inhibition  $K_{sv}$  du PBA par l'oxygène.

### III.4) DIFFUSION DE L'OXYGENE DANS L'ENDOTHELIUM

L'endothélium joue le rôle d'une barrière sélective qui régule les transferts de substances de poids moléculaire très varié (gaz, macromolécules...) et la membrane basale contrôle l'accès de ces substances dans les couches sous-jacentes (tissus). Ces échanges prennent place d'un bout à l'autre de l'arbre vasculaire et plus particulièrement dans les zones où le flux est ralenti, les capillaires. La paroi des capillaires est organisée de façon tout à fait différente de celle des vaisseaux et comporte l'endothélium, la membrane basale et les tissus conjonctifs. Chacun de ces compartiments est susceptible de présenter une résistance à la diffusion de l'oxygène. La monocouche de cellules endothéliales représente la majeure partie de l'épaisseur de la paroi du capillaire et conditionne la perméabilité capillaire. Elle constitue par conséquent un matériel d'étude de choix dans l'étude du phénomène de diffusion de l'oxygène. Dans ce travail, nous avons abordé le phénomène de diffusion de l'oxygène d'une part au niveau d'une suspension de cellules endothéliales (sans membrane basale) et d'autre part au niveau d'une monocouche de cellules endothéliales (avec membrane basale).

### **III.4.1) Effet du détachement des cellules endothéliales sur le phénomène d'inhibition de fluorescence des dérivés pyréniques**

Pour réaliser des expériences en cuvette sur une suspension de cellules endothéliales (CE), il est nécessaire d'effectuer au préalable une opération de détachement des cellules adhérentes du support de culture (boîte, lamelle...). Or, cette opération ne respecte pas l'intégrité morphologique de la cellule endothéliale, car les interconnexions cellulaires, le cytosquelette et la membrane basale sont en partie dégradés (action digestive de la trypsine). Nous avons étudié l'incidence de ce détachement cellulaire sur le phénomène d'inhibition de fluorescence pour une sonde fluorescente par l'oxygène. Seuls les dérivés pyréniques furent utilisés dans ces expériences car la puissance du laser ne permettait pas d'exciter les molécules de Ru(phen) faiblement concentrées dans les cellules endothéliales.

#### **III.4.1.1) Spectres d'émission de fluorescence des dérivés pyréniques sur une suspension de cellules endothéliales**

Les conditions expérimentales figurent dans les parties II.2.10.1a et III.5. A l'aide d'un spectrofluorimètre à comptage de photons (intensité exprimée en coups, +20 °C), nous avons recueilli les spectres des émissions de la fluorescence des acides pyrène butyrique (PBA), décanoïque (PDA<sub>10</sub>), décanoïque-cholestérol (PDA<sub>10</sub>-Chol), et dodécanoïque (PDA) à différentes PO<sub>2</sub>. Ceux-ci sont reportés sur la Figure 46 (A) ainsi que déclin des intensités de fluorescence mesurées à 376 nm (B) et la représentation de Stern-Volmer (C). Le Tableau 15 rassemble les valeurs des constantes K<sub>sv</sub> calculées à partir de la Figure 46 et le rapport des intensités des excimères (470 nm) et des monomères (376 nm) en absence d'oxygène.

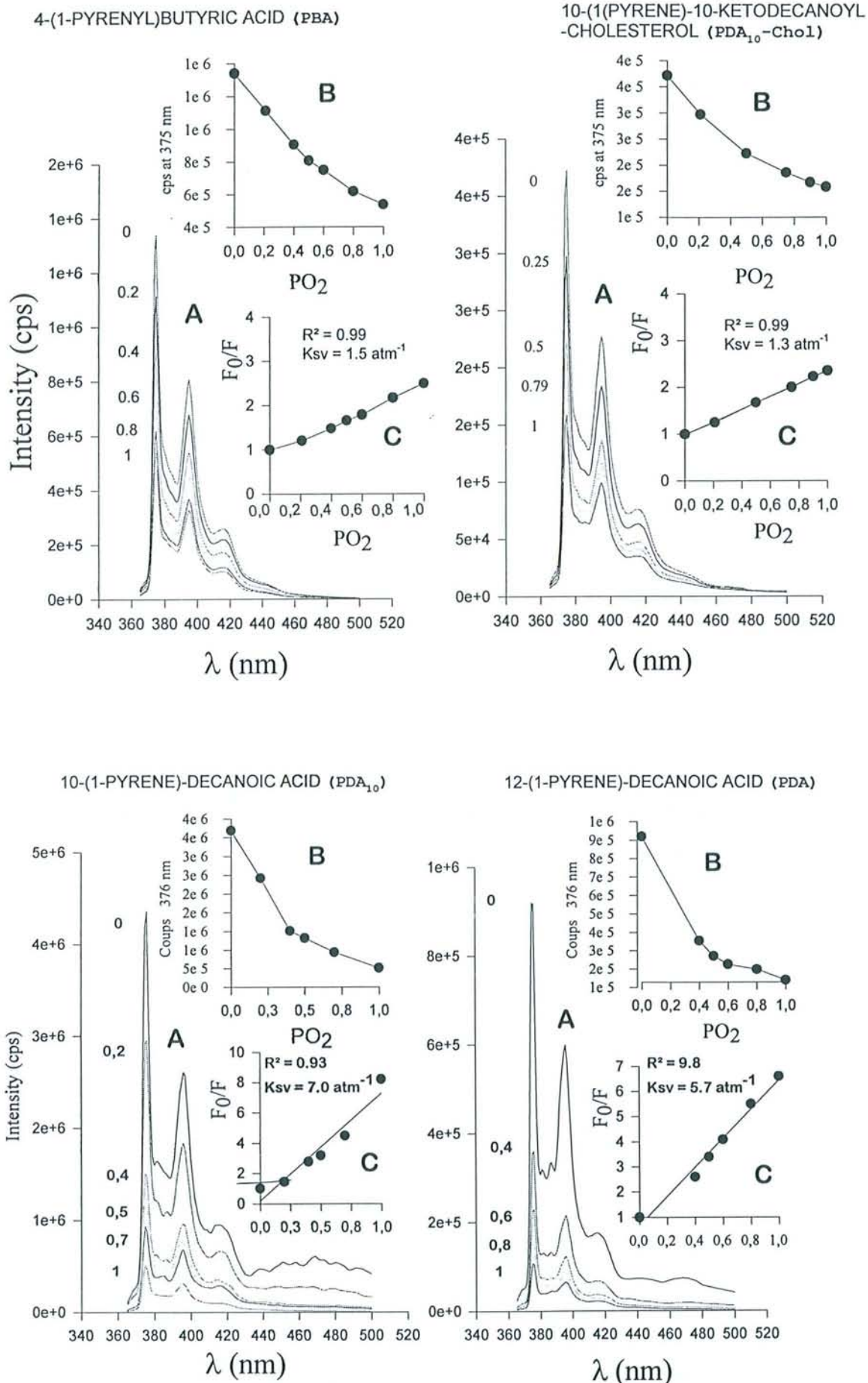


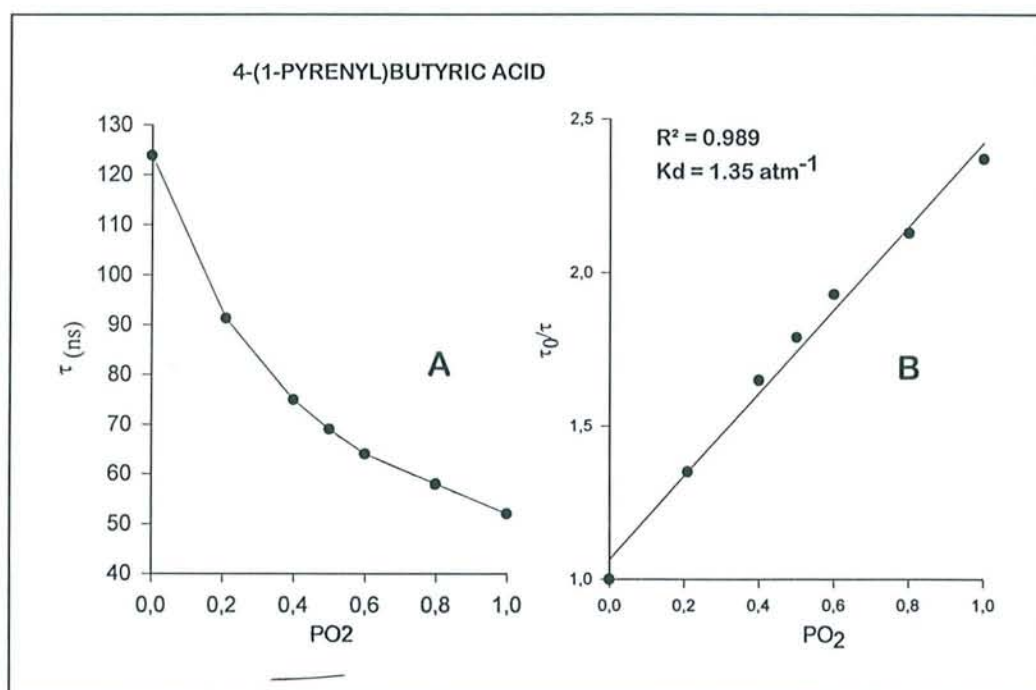
Figure 46 : Influence de la PO<sub>2</sub> ; A : sur les spectres ; B : sur les intensités à 376 nm ; C : sur le rapport F<sub>0</sub>/F

	PBA	PDA	PDA <sub>10</sub>	PDA <sub>10</sub> -Chol
K <sub>sv</sub> (atm <sup>-1</sup> )	1,5	5,7	7,0	1,3
I <sub>exc</sub> /I <sub>mono</sub>	0,0114	0,0791	0,1353	0,0259

**Tableau 15** : Valeurs des constantes d'inhibition K<sub>sv</sub> du PBA, PDA, PDA<sub>10</sub> et PDA<sub>10</sub>-Chol et des rapports des intensités des excimères et des monomères dans des suspensions de cellules endothéliales, + 20 °C.

### III.4.1.2) Détermination des durées de vie des dérivés pyréniques sur une suspension de cellules endothéliales par fluorimétrie de phase

Les durées de vie du PBA pour une suspension de cellules endothéliales (Figure 47) ont été mesurées à l'aide d'un fluorimètre à modulation de phase (SLM 48000 S) selon les indications décrites dans les parties II.2.10.1a et II.2.10.2b35 et II.10.3b1, K<sub>d</sub> est estimée à 1,35 atm<sup>-1</sup>.



**Figure 47** : A. Effet de la PO<sub>2</sub> sur le déclin des valeurs de durées de vie du PBA dans une suspension de cellules endothéliales en cuvette. B. Représentation de Stern-Volmer.

### III.4.1.3) Détermination des durées de vie des dérivés pyréniques sur une monocouche de cellules endothéliales par microscopie à fluorescence résolue dans le temps

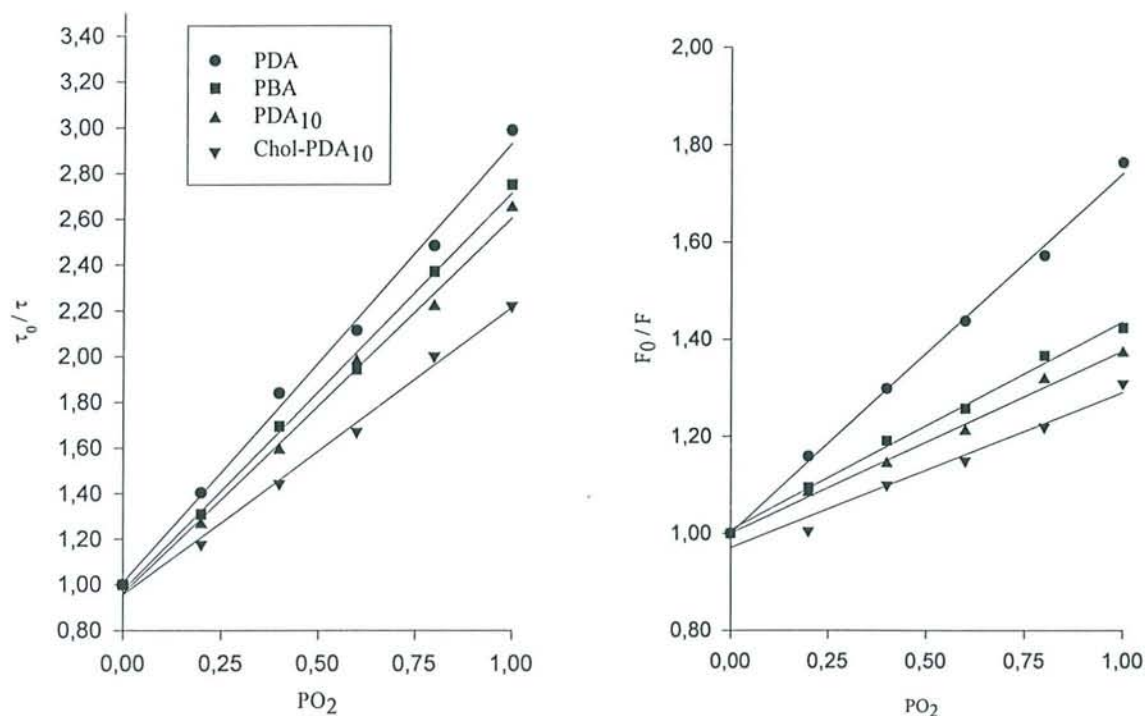
Le montage expérimental et le protocole de marquage sont décrits respectivement dans la partie II.2.10.1b. Les déclin des logarithmes des intensités de fluorescence de 4 dérivés pyréniques (PBA, PDA, PDA<sub>10</sub> et Chol-PDA<sub>10</sub>) en fonction du temps sont montrés sur la Figure 48 qui illustre le déclin des valeurs des intensités de fluorescence mesurées 150 ns après l'excitation en fonction de la PO<sub>2</sub> et ceci pour chaque sonde. Dans chaque cas, les équations des pentes des régressions des courbes expérimentales ainsi que le facteur de corrélation sont indiqués. Les Tableaux 16 et 17 regroupent respectivement les valeurs des durées de vie et les constantes Ksv et Kd calculées à partir des Figures 49 et 50.

PO <sub>2</sub> (atm <sup>-1</sup> )	$\tau_{\text{PBA}}$	$\tau_{\text{PDA}}$	$\tau_{\text{PDA}_{10}}$	$\tau_{\text{PDA}_{10}\text{-Chol}}$
0	154 ± 5	161 ± 3	204 ± 11	175 ± 8
0,2	117 ± 7	115 ± 8	161 ± 9	149 ± 5
0,4	90 ± 2	87 ± 7	128 ± 15	121 ± 11
0,6	79 ± 6	76 ± 6	103 ± 7	105 ± 8
0,8	65 ± 8	65 ± 2	92 ± 4	85 ± 5
1	56 ± 4	54 ± 4	74 ± 9	79 ± 9

**Tableau 16** : Valeurs des durées de vie du PBA, PDA, PDA<sub>10</sub> et PDA<sub>10</sub>-Chol déterminées en microscopie à fluorescence pour une monocouche de cellules endothéliales.

Dérivé pyrénique	Ksv (atm <sup>-1</sup> )	Kd (atm <sup>-1</sup> )
PBA	0,43	1,73
PDA	0,74	1,92
PDA <sub>10</sub>	0,34	1,71
Chol-PDA <sub>10</sub>	0,32	1,28

**Tableau 17** : Valeurs des constantes Kd et Ksv du PBA, PDA, PDA<sub>10</sub> et PDA<sub>10</sub>-Chol déterminées en microscopie à fluorescence pour une monocouche de cellules endothéliales.



**Figure 48** : Inhibition par l'oxygène des durées de vie du PBA, PDA, PDA<sub>10</sub> et PDA<sub>10</sub>-Chol déterminées en microscopie à fluorescence pour une monocouche de cellules endothéliales.

#### III.4.1.4) Discussion

Nos résultats montrent que les valeurs des constantes d'inhibition dynamique ( $K_d$ ) sont du même ordre de grandeur, qu'elles soient déterminées par fluorimétrie de phase (constante  $K_{d_{PBA}}$  de  $1,3 \text{ atm}^{-1}$  sur des suspensions cellulaires) ou par microscopie à fluorescence résolue dans le temps (constante  $K_{d_{PBA}}$  de  $1,7 \text{ atm}^{-1}$  sur une monocouche cellulaire). Les déterminations des durées de vie à l'aide du système de type Boxcar MM dans les conditions énoncées ci-dessus ne posent aucun problème particulier à l'exception des positions des bornes entre lesquelles est faite la régression. En effet, le comportement mono-exponentiel du déclin de la fluorescence est retrouvé si l'on considère respectivement les bornes suivantes : PBA de 85 à 370 ns ; PDA de 150 à 350 ns, PDA<sub>10</sub> et PDA<sub>10</sub>-Chol de 100 à 3350 ns. Dans ces conditions, la linéarité de la représentation de Stern-Volmer ( $\tau_0/\tau$  vs  $PO_2$ ) n'est pas prise à défaut dans ce modèle.

En ce qui concerne les valeurs des constantes d'inhibition ( $K_{sv}$ ), elles sont très dépendantes de l'instrumentation mise en œuvre et des conditions expérimentales (fluorophore et concentration principalement). Les valeurs des constantes  $K_{sv}$  sont du même ordre de grandeur



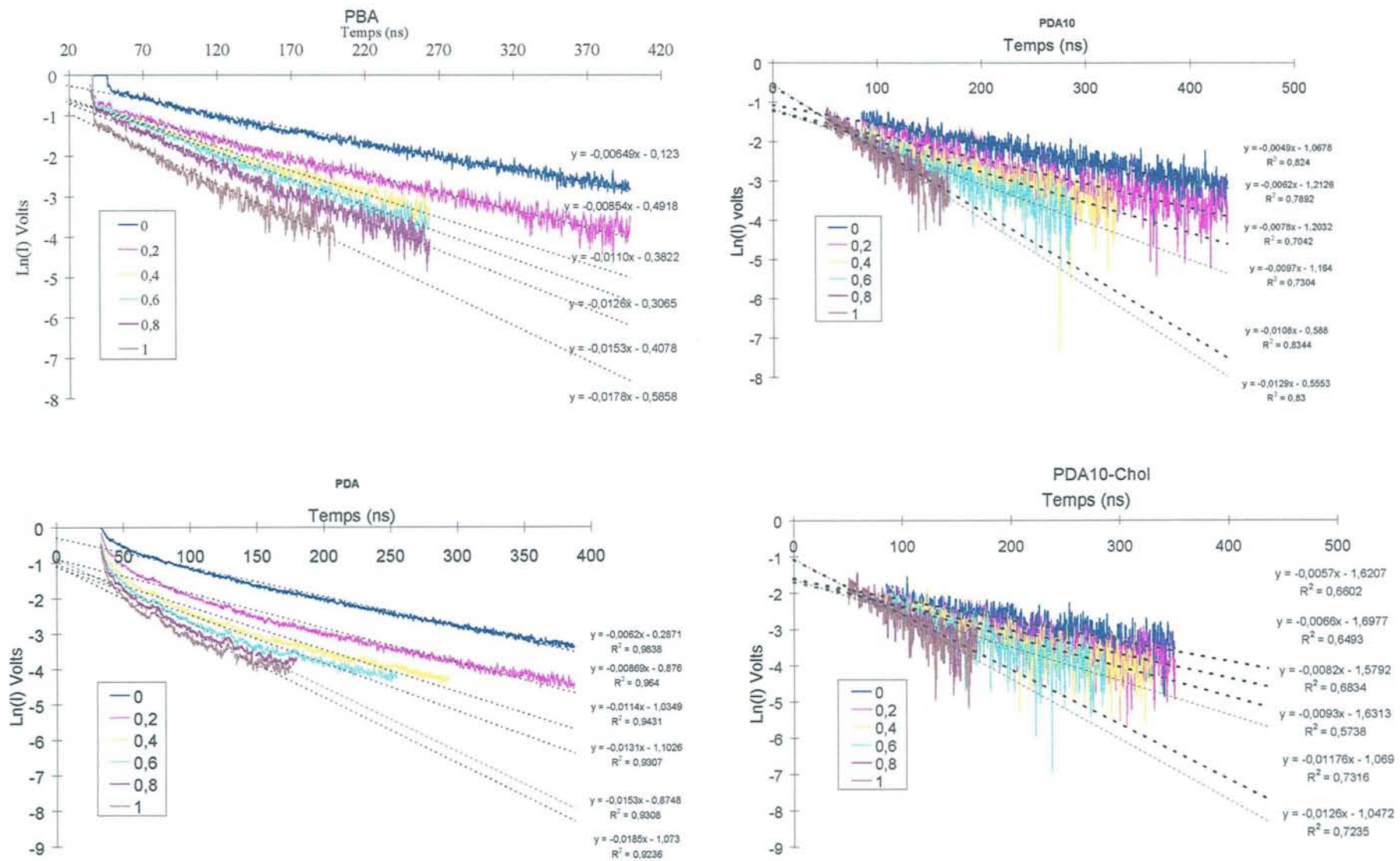
et sans différence significative pour les expériences réalisées en intégrant le signal à l'aide d'une caméra CCD ( $K_{sv_{PBA}} = 1,3 \text{ atm}^{-1}$ ) ou à l'aide du photomultiplicateur d'un spectrofluorimètre ( $K_{sv_{PBA}} = 1,5 \text{ atm}^{-1}$ ). En revanche, les valeurs des constantes  $K_{sv}$  mesurées 150 ns après l'excitation pulsée à l'aide du système Boxcar présentent une grande différence ( $K_{sv_{PBA}} = 0,4 \text{ atm}^{-1}$ ). Celle-ci a été attribuée au temps d'intégration très court du signal par le détecteur (entre  $t$  et  $t + 3\text{ns}$ ). Ce mode d'utilisation du Boxcar n'est donc pas employé pour l'analyse des déclinés des intensités de fluorescence.

En ce qui concerne les sondes PDA et PDA<sub>10</sub>, les résultats montrent une différence très marquée entre les valeurs de  $K_{sv}$  (suspension cellulaire) et de  $K_d$  (monocouche de cellules endothéliales).

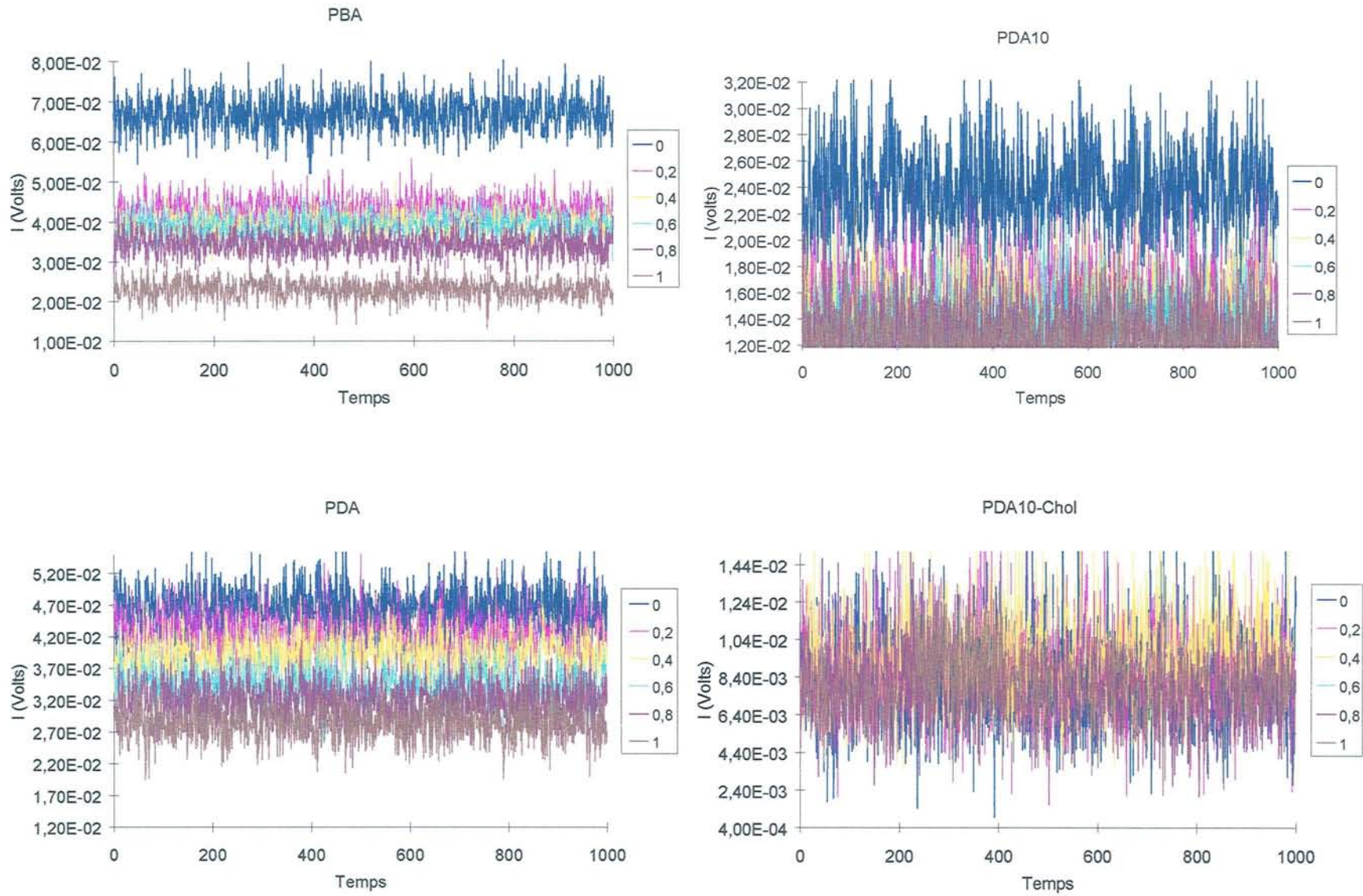
Celle-ci peut être attribuée :

a) à une inhibition de type statique car les valeurs de  $K_{sv}$  ( $5,7 \text{ atm}^{-1}$  pour le PDA et  $7 \text{ atm}^{-1}$  pour le PDA<sub>10</sub>) sont supérieures à celles de  $K_d$  ( $1,92 \text{ atm}^{-1}$  pour le PDA et  $1,71 \text{ atm}^{-1}$  pour le PDA<sub>10</sub>)

b) à l'incidence du détachement des cellules. En effet, le détachement cellulaire suite à la digestion enzymatique (trypsine) pourrait conduire à des perturbations et dégradations extracellulaires (matrice, membrane basale, glycocalyx) et avoir des conséquences sur la membrane elle-même. Les cellules endothéliales planes, allongées et adhérentes deviennent alors sphériques dans une suspension de cellules individualisées. Ces modifications semblent désigner des remaniements membranaires internes et profonds car les sondes PDA et PDA<sub>10</sub> sont localisées dans la partie hydrophobe centrale de la membrane. Il apparaît également que la liaison chimique de la molécule de cholestérol et du PDA<sub>10</sub> affecte considérablement l'accessibilité de la sonde à l'oxygène car aucune différence significative n'a été observée avant et après détachement. Il est à noter que la formation d'excimères intermoléculaires dans le cas des dérivés dodécanoïques (PDA) et décanoïques (PDA<sub>10</sub>) conduit à des résultats inexploitable du fait de la non-linéarité de la droite de Stern-Volmer et du mauvais coefficient de corrélation qui en découle.



**Figure 49** : Logarithme des déclin de fluorescence du PBA, PDA, PDA<sub>10</sub> et Chol-PDA<sub>10</sub> incorporé dans une monocouche de cellules endothéliales.

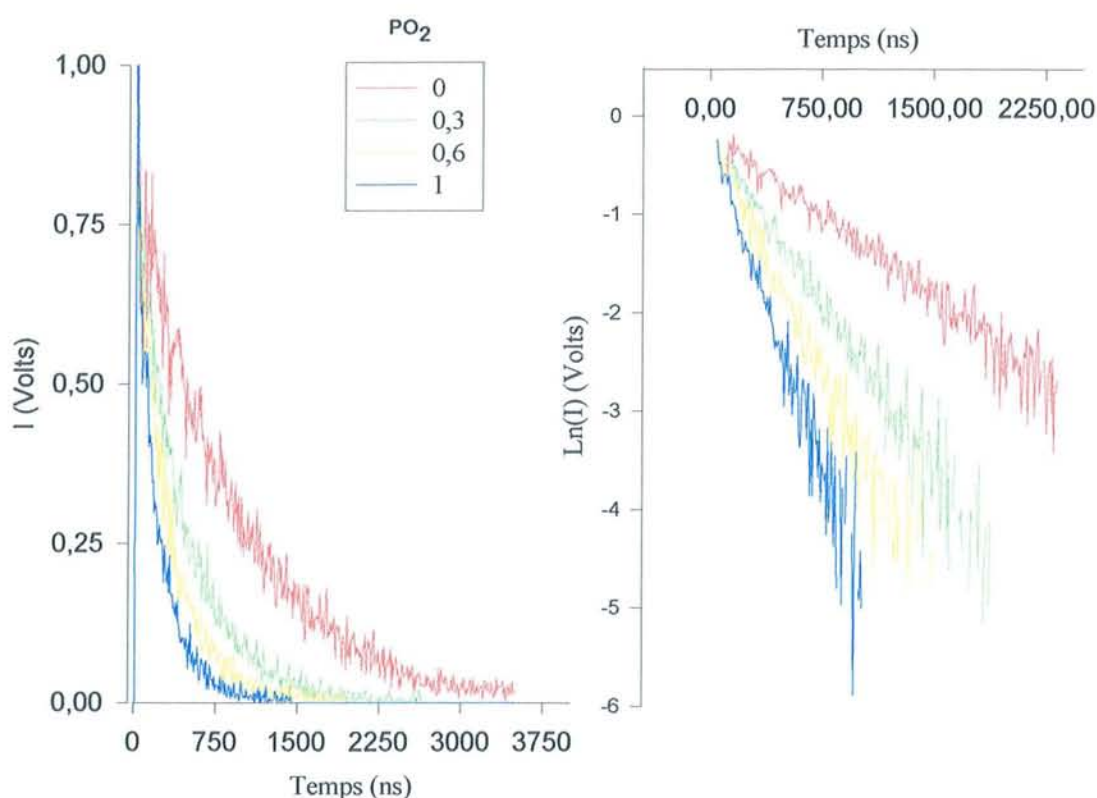


**Figure 50** : Déclins de la fluorescence du PBA, PDA, PDA<sub>10</sub> et Chol-PDA<sub>10</sub> incorporé dans une monocouche de cellules endothéliales.



### III.4.2.1) Influence du gel,

A partir du système Boxcar couplé à un microscope (MM), dispositif décrit dans la partie II.2.10.3.b2, nous avons déterminé les durées de vie du Ru(phen) incorporé dans un gel de gélatine. La Figure 51 montre le déclin de la fluorescence du Ru(phen) dans un gel de gélatine (6 g/L) en fonction du temps et pour différentes pressions partielles en oxygène. Les valeurs moyennes des durées de vie calculées à partir de 3 expériences sont respectivement de  $909 \pm 10$  ns ;  $434 \pm 7$  ns ;  $334 \pm 8$  ns et  $227 \pm 4$  ns pour des  $PO_2$  de 0 ; 0,23 ; 0,6 et 1  $atm^{-1}$ . La valeur de la constante d'inhibition dynamique  $K_d$  est de  $2,9 atm^{-1}$



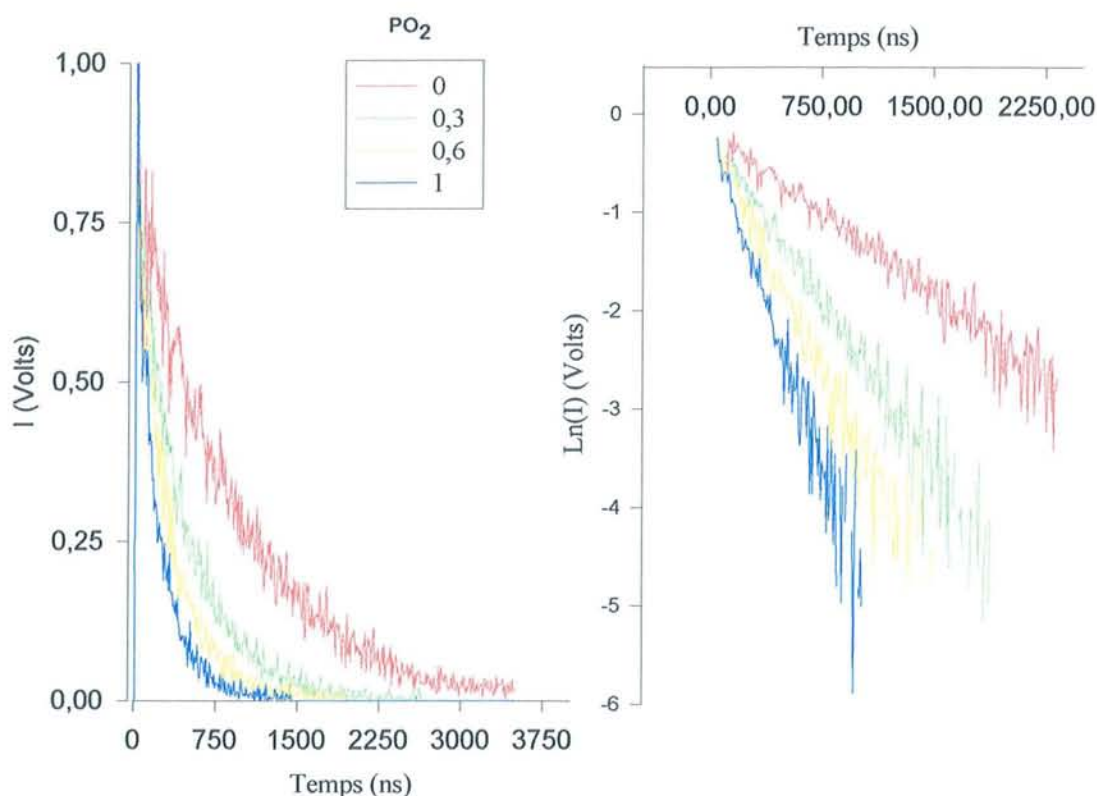
**Figure 51** : Déclin des intensités de fluorescence du Ru(phen) dans un film de gélatine recouverte de 4 couches de PLGA.

### III.4.2.2) Influence de la concentration en Ru(phen) dans le gel

Pour différentes concentrations en Ru(phen) incorporées dans un gel de gélatine (6 g/L), les intensités de fluorescence ont été recueillies successivement à l'aide d'une caméra CCD (intégration 0,1 s) et d'un photomultiplicateur connecté au système Boxcar MM. (Ksv) et

### III.4.2.1) Influence du gel,

A partir du système Boxcar couplé à un microscope (MM), dispositif décrit dans la partie II.2.10.3.b2, nous avons déterminé les durées de vie du Ru(phen) incorporé dans un gel de gélatine. La Figure 51 montre le déclin de la fluorescence du Ru(phen) dans un gel de gélatine (6 g/L) en fonction du temps et pour différentes pressions partielles en oxygène. Les valeurs moyennes des durées de vie calculées à partir de 3 expériences sont respectivement de  $909 \pm 10$  ns ;  $434 \pm 7$  ns ;  $334 \pm 8$  ns et  $227 \pm 4$  ns pour des  $PO_2$  de 0 ; 0,23 ; 0,6 et 1  $atm^{-1}$ . La valeur de la constante d'inhibition dynamique  $K_d$  est de  $2,9 atm^{-1}$

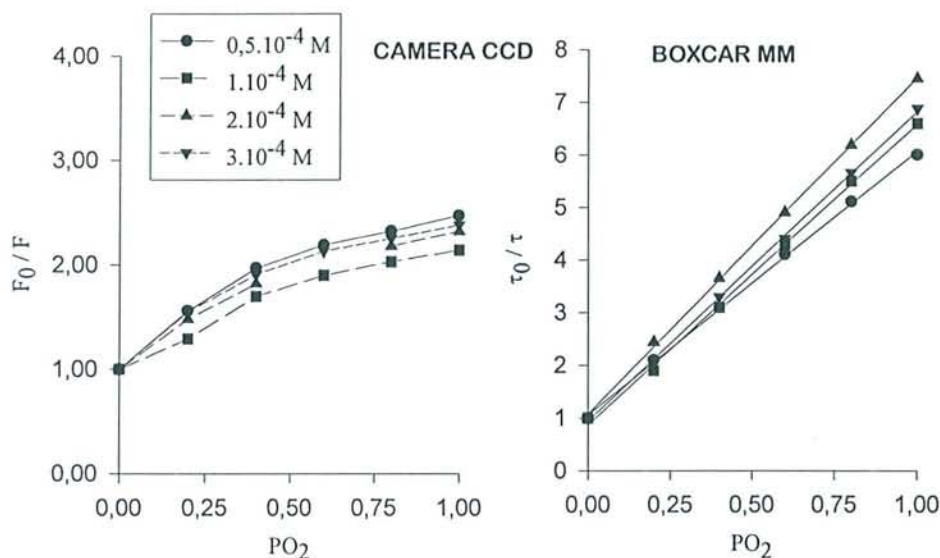


**Figure 51** : Déclin des intensités de fluorescence du Ru(phen) dans un film de gélatine recouverte de 4 couches de PLGA.

### III.4.2.2) Influence de la concentration en Ru(phen) dans le gel

Pour différentes concentrations en Ru(phen) incorporées dans un gel de gélatine (6 g/L), les intensités de fluorescence ont été recueillies successivement à l'aide d'une caméra CCD (intégration 0,1 s) et d'un photomultiplicateur connecté au système Boxcar MM. (Ksv) et

dynamiques ( $K_d$ ) respectivement pour les déclin des intensités et des durées de vie (Figure 52) en fonction de la  $PO_2$ . La non linéarité de la représentation de Stern-Volmer rend le calcul des constantes  $K_{sv}$  ( $F_0 / F$  vs  $PO_2$ ) très difficile. Celle-ci a été attribuée à une sensibilité moindre de la caméra CCD pour les grandes  $PO_2$  par rapport au photomultiplicateur du système Boxcar MM. Ce problème peut être résolu (linéarité de la représentation) en augmentant le gain et/ou le temps d'intégration de la caméra (pour les grandes  $PO_2$ ) sous réserve a) de ne pas saturer le capteur aux faibles  $PO_2$  b) de vérifier la linéarité de la réponse de la caméra pour des gains et/ou des temps d'intégration différents. Les valeurs de  $K_d$  sont : 5 ; 5,7 ; 6,3 et 5,8  $atm^{-1}$  respectivement pour des valeurs de  $PO_2$  de 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1. La concentration optimale retenue est de  $2.10^{-4}$  M de Ru(phen) pour un gel contenant 6 g/L de gélatine.

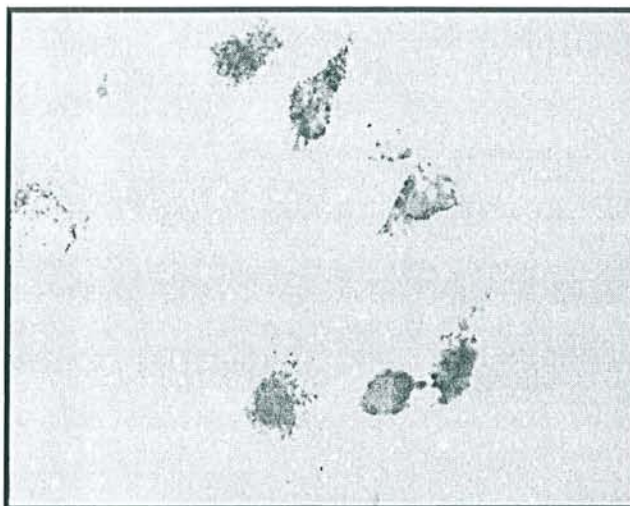


**Figure 52** : Représentation de Stern-Volmer ( $F_0/F$  et  $\tau_0/\tau$  vs  $PO_2$ ) pour différentes concentrations en Ru(phen) incorporées dans un gel de gélatine (6 g/L) suivant le type de capteur.

#### III.4.2.3 Influence d'un film de polymère (PLGA) déposé sur le gel

Nous avons constaté plusieurs phénomènes lorsque le gel de gélatine sert de support de culture à des cellules endothéliales (en suspension dans du milieu de culture). La boîte de Pétri qui contient la lamelle sur laquelle est coulé le gel, est placée dans un incubateur à 37 °C. Sous l'effet de la chaleur, et après 20 min, la gélatine a tendance à fondre et les molécules de Ru(phen) diffusent vers le milieu de culture, avec coloration. Ce phénomène est responsable d'une incorporation du fluorophore dans les cellules endothéliales en suspension dans le milieu de culture. La Figure 53 montre la fluorescence des cellules endothéliales en suspension marquées

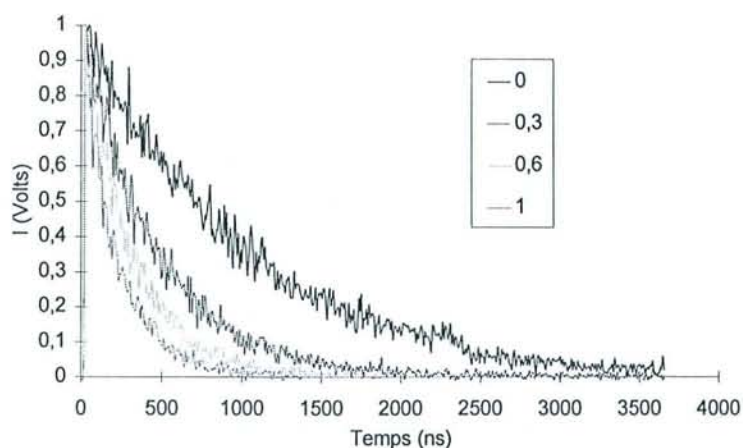
par les molécules de Ru(phen). L'observation en négatif permet de mieux distinguer de faibles signaux de fluorescence.



**Figure 53** : Incorporation des molécules de Ru(phen) dans des cellules endothéliales en suspension dans du milieu de culture x20, intégration 1 sec. Cliché en négatif.

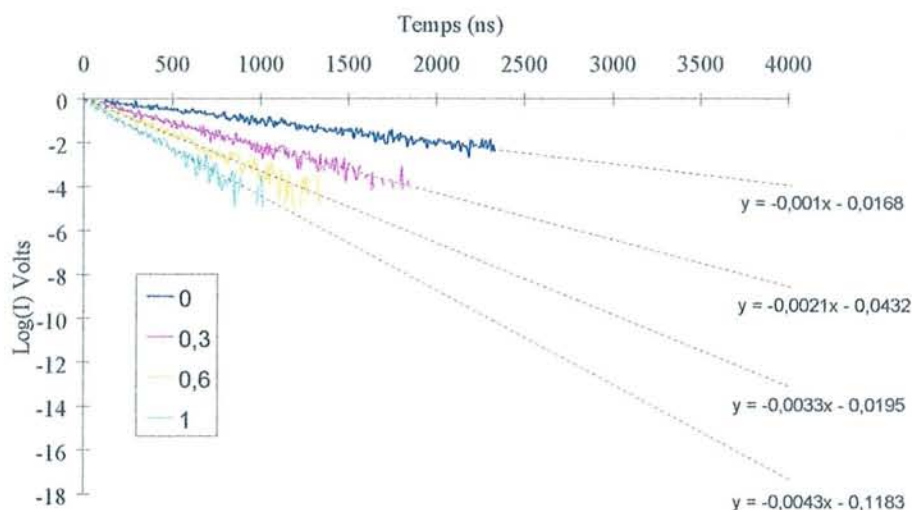
Ce phénomène est à l'origine d'une part d'une diminution des signaux de fluorescence dans le gel et d'autre part d'une fluorescence émise par les cellules endothéliales ayant incorporé le fluorophore.

Pour s'affranchir de ces problèmes, nous avons imaginé de déposer un film qui isolerait le gel du milieu de culture, ceci afin d'éviter la diffusion du fluorophore. Un polymère hydrophobe d'acide glutamique (PLGA) fourni par le LCPM de l'ENSIC a été testé en ce sens. Le gel est recouvert de 4 couches de ce polymère selon le protocole décrit dans la partie II.2.10.1b3. Les déclin de la fluorescence du Ru(phen) dans le gel sont montrés sur les figures 54 (linéaire) et 55 (logarithme).



**Figure 54** : Déclin de la fluorescence du Ru(phen)  $2.10^{-4}$  M incorporé dans un gel de gélatine (6 g/L) recouvert d'un film de 4 couches de PLGA pour une variation de la  $PO_2$ .





**Figure 55** : Déclin du logarithme de la fluorescence du Ru(phen)  $2.10^{-4}$  M incorporé dans un gel de gélatine (6 g/L) recouvert d'un film de 4 couches de PLGA, en fonction de la PO<sub>2</sub>.

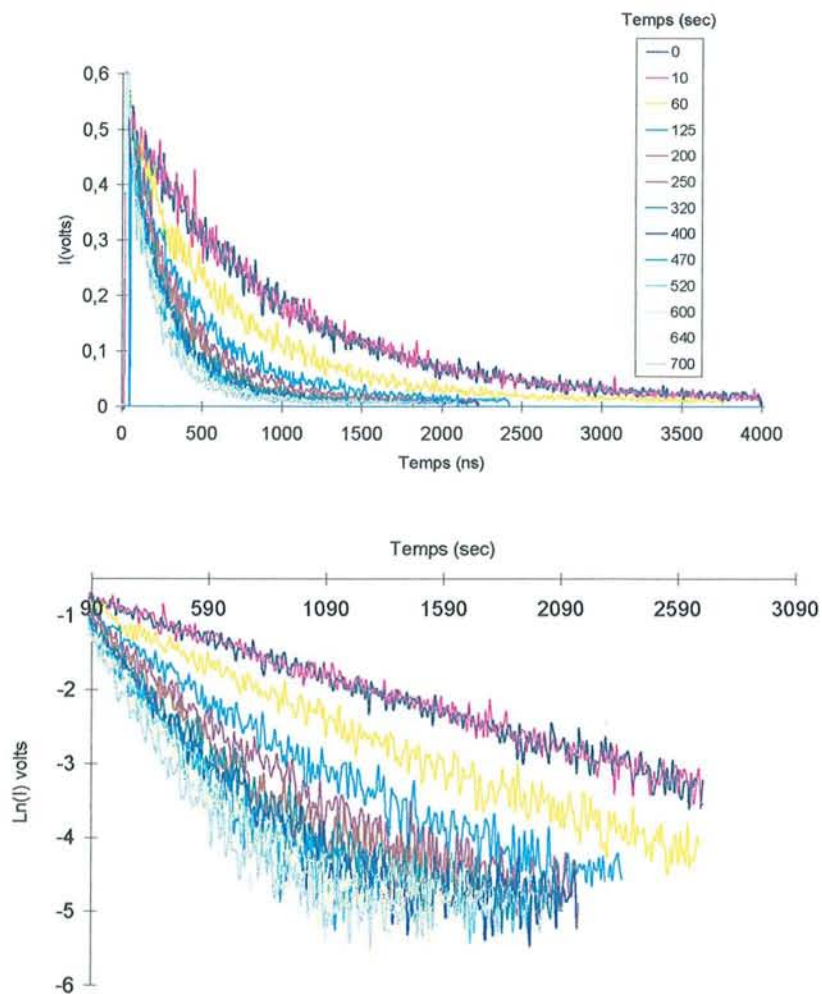
Les valeurs des durées de vie sont respectivement de 1000 ns, 476 ns, 303 ns et 232 ns pour des proportions en oxygène de 0 %, 30 %, 60 % et 100 %. La constante Kd est de  $2,3 \text{ atm}^{-1}$ , c'est-à-dire inférieure à celle correspondant au gel seul ( $2,9 \text{ atm}^{-1}$ ). La forme du déclin permet un traitement mono-exponentiel.

#### III.4.2.4) Temps de réponse du système

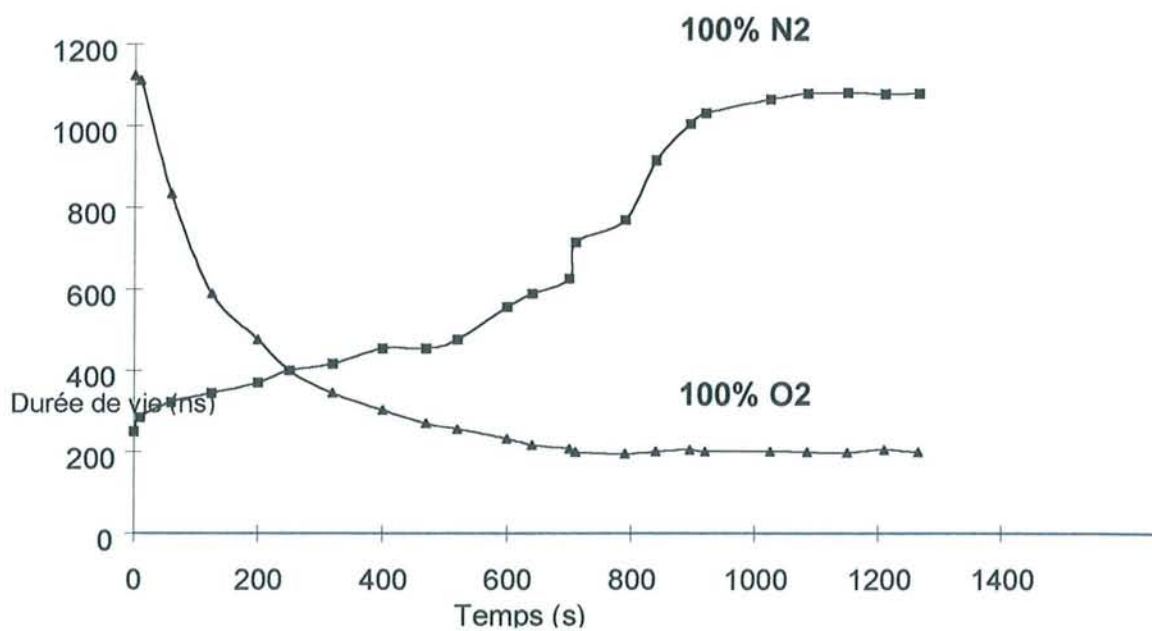
Nous avons cherché à connaître le temps de réponse de ce système de mesure à l'aide d'un gel recouvert d'un film de PLGA. Dans ce but, les valeurs des durées de vie du Ru(phen) sont déterminées fréquemment (toutes les minutes environ) pour une atmosphère saturée en N<sub>2</sub> puis immédiatement saturée en O<sub>2</sub>, sans pas intermédiaire. Le temps de réponse dépend de l'épaisseur du gel (surface en contact avec l'O<sub>2</sub>), du volume interne de la chambre d'analyse et du débit du gaz injecté dans celle-ci. L'épaisseur du gel est rigoureusement constant.

Les déclins des intensités de fluorescence pour chaque détermination sont montrés sur la Figure 56. Le temps de réponse d'un gel de gélatine par saturation à l'oxygène (100 %) est de l'ordre de 15 min (900 s), correspondant au signal de fluorescence le plus faible à l'état d'équilibre. Le temps de régénération du système par saturation à l'azote (100 %) est du même ordre de grandeur (Figure 57). Ces résultats indiquent que le gel de gélatine est réutilisable et que la réversibilité de sa réponse à l'oxygène permet de définir les mêmes valeurs de  $\tau_0$  pour plusieurs expériences.





**Figure 56** : Déclin de la fluorescence du Ru(phen) dans un gel en fonction du temps.



**Figure 57** : Temps de réponse d'un gel de gélatine chargé de Ru(phen).



#### III.4.2.5) Influence d'une monocouche de cellules endothéliales cultivées sur un gel de gélatine

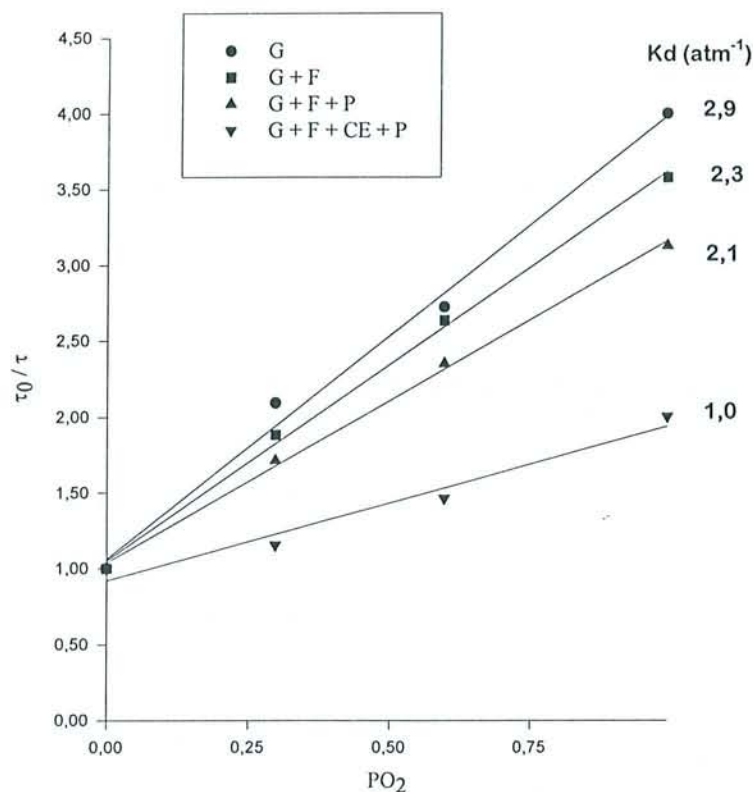
Certains facteurs ont été étudiés en relation avec les valeurs des durées de vie déterminées par microscopie à fluorescence résolue dans le temps et les résultats figurent dans la partie II.2.11 (mise au point expérimentale). Citons le nombre de cellules observées, de l'état de confluence, la mise au point, le temps d'exposition.

#### III.4.2.6) Influence d'une monocouche de cellules endothéliales cultivées sur un gel de gélatine et recouverte de plasmas plus ou moins visqueux

Dans cette étude, le gel (G) est revêtu successivement d'un film de PLGA (F), d'une monocouche de cellules endothéliales en culture à confluence (CE) et d'un volume de 0,5 mL d'une suspension de plasma. Les conditions expérimentales décrites dans la partie III.4.4 sont observées. La représentation de Stern-Volmer (Figure 58) fait état d'une diminution de la constante d'inhibition  $K_d$  avec chacun des compartiments que l'oxygène doit traverser pour atteindre les molécules de Ru(phen) prisonnières du gel. Les valeurs des constantes  $K_d$  sont respectivement  $2,9 \text{ atm}^{-1}$  (gel) -  $2,3 \text{ atm}^{-1}$  (gel + film PLGA) -  $2,1 \text{ atm}^{-1}$  (gel + film + plasma) et  $1 \text{ atm}^{-1}$  (gel + film + plasma + monocouche de cellules endothéliales).

Dans l'équation de Smoluchoski (cf. I.3.5.3), de nombreux paramètres restent très imprécis. Nous exploiterons donc ces résultats en traduisant non pas un coefficient de diffusion mais une diminution relative des valeurs des constantes  $K_d$  par rapport à celle mesurée dans le gel recouvert du film PLGA ( $K_d = 2,1 \text{ atm}^{-1} = 100 \%$ ). Ainsi les incidences sur la diffusion de l'oxygène se traduisent pour le plasma (viscosité 1,2 cSt) par une diminution de la diffusion de 8,7 % et pour la monocouche recouverte du même plasma par une diminution de 56,5 %.

Il apparaît nettement que la monocouche de cellule endothéliale présente une résistance passive à la diffusion de l'oxygène.



**Figure 58** : Représentation de Stern-Volmer. Effet de la  $\text{PO}_2$  sur l'inhibition des durées de vie du Ru(phen) dans la gélatine (G) recouverte d'un film de PLGA (F), d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) et d'1 mL de plasma sain (P).

#### III.4.2.7) Discussion

Ces études ont montré l'incidence du détachement des cellules endothéliales sur le phénomène d'inhibition de fluorescence par l'oxygène, en particulier sur l'accessibilité des sondes localisées dans la région profonde de la membrane.

L'utilisation d'une approche expérimentale respectant l'intégralité physique des cellules endothéliales s'en trouve justifiée à ce titre. Un banc optique (microscopie à fluorescence résolue dans le temps) a été mis au point pour apprécier l'amplitude de l'inhibition de fluorescence par l'oxygène et ceci selon les compartiments biologiques traversés. La microscopie à fluorescence résolue dans le temps apporte une nouvelle dimension à la microscopie à fluorescence classique, pour laquelle les fluctuations des intensités de fluorescence mesurées ont des origines variées. La mesure des durées de vie sur une monocouche cellulaire donne également accès à des informations d'ordre structural et fonctionnel (micro-environnement) et de ce fait, constitue une approche originale et complémentaire à la spectrofluorimétrie classique.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude mettent en évidence l'incidence des milieux biologiques sur la diffusion de l'oxygène, en particulier le plasma et la monocouche de cellules endothéliales. La mise en équation de ce phénomène physique, c'est-à-dire l'élaboration d'un modèle empirique donnerait directement accès à l'accessibilité à l'oxygène des molécules de Ru(phen) dans le gel. Les composantes sont connues ou mesurables (viscosité plasmatique, fluidité membranaire) ainsi que leurs conséquences sur la diffusion de l'oxygène.

### III.5) EFFET DE LA RIGIDIFICATION MEMBRANAIRE SUR LA DIFFUSION DE L'OXYGENE DANS LA MEMBRANE DE CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES EN CULTURE

Article 5 :

**Effect of rigidification induced by cholesterol on oxygen permeability of human endothelial cell monolayer.**D Dumas, ML Viriot, JF Stoltz.

Experimental Cell Research, soumis à publication.

Influence du cholestérol sur la perméabilité d'une monocouche de cellules endothéliales à l'oxygène

Comme nous l'avons montré précédemment, il est possible de modéliser la cinétique de diffusion de l'oxygène à travers divers compartiments : la monocouche de cellules endothéliales, le plasma et le gel. Une équation simple traduit de manière empirique le comportement de ces diverses résistances à la diffusion passive de l'oxygène. Les influences du gel (concentration en fluorophore, en gélatine, épaisseur, etc.) et de la viscosité plasmatique (sur le déclin de la fluorescence d'un fluorophore sensible à l'oxygène. Celle-ci a été établie à partir des résultats expérimentaux portant sur une monocouche de cellules endothéliales dont les paramètres rhéologiques sont considérés comme normaux. Cependant, l'endothélium vasculaire et capillaire subit de nombreux stress (physico-chimiques, biologiques et mécaniques) qui peuvent fortement affecter la diffusibilité de l'oxygène. C'est la raison pour laquelle nous avons abordé l'étude de l'influence de l'incorporation de cholestérol sur les propriétés rhéologiques et la diffusion de l'oxygène au sein d'une monocouche de cellules endothéliales en culture.

La description de ce travail figure dans la publication suivante. L'incorporation de cholestérol dans la membrane endothéliale a été réalisée par incubation dans un milieu de culture contenant différentes concentrations en cholestérol (3,42 , 6.84 et 17,11  $\mu\text{M}$ ).

Nous avons vérifié la rigidification membranaire grâce à des mesures de polarisation de fluorescence à l'aide des sondes DPH et TMA-DPH.



## Effect of rigidification induced by cholesterol on oxygen permeability of human endothelial cell monolayer

Dominique Dumas <sup>aa</sup>, Marie-Laure Viriot <sup>b</sup>, Jean-François Stoltz <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'AngioHématologie et Hémorhéologie, EA 1728 et FR CNRS W0070, Faculté de Médecine, F-54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>b</sup>DCPR (GRAPP) - URA, 328 CNRS, ENSIC-INPL, 1 rue Grandville F-54000 Nancy, France.  
Tel: 83592674; Fax : 83592643; E-mail : dumas@hemato.u-nancy.fr.

### Abstract

We tested the effect of enrichment of endothelial cells membranes with cholesterol on parameters of oxygen diffusion through this membrane. Membrane rigidification was induced by adding low quantities of cholesterol to extracellular medium (3.42  $\mu$ M, 6.84  $\mu$ M and 17,11  $\mu$ M) and the membrane fluidity was assessed by a fluorescence polarization method (anisotropy). The oxygen permeability of the endothelial cells was monitored by quantitative fluorescence imaging technique using fluorescent probes very sensitive for oxygen, incorporated at different depths in the membrane. Under our experimental conditions, we observed that the accessibility to oxygen significantly decreased both in the upper region (18.5 %) and in the middle part of the membrane bilayer (60.1 %). It was not expected that lowest physiological cholesterol concentration (5mM) may affect oxygen diffusion process. In conclusion, a very low level of free cholesterol significantly reduce the oxygen permeability of endothelium and molecular oxygen transfert process to underlying tissues.

*Key words* : oxygen permeability, endothelial cells, cholesterol, fluorescence quenching, quantitative microscopy.

### 1. Introduction

The development of atherosclerosis involves the accumulation of cholesterol in the intima of the arteries, leading to a reduction of blood flow which could lead to ischemia [1]. The vascular endothelium is the first barrier encountered by oxygen after exiting the lumen of the capillary and would not be of dominant importance in determining oxygen transport to tissue [2]. However, it has been known for some time that the membrane bilayer is a resistance factor to molecular oxygen diffusive transfert [3]. The diffusiveness of oxygen was thought to vary to

membrane fluidity [4,5]. As cholesterol molecules of plasma lipoproteins and cell membrane are capable to interchange [6,7], membrane rigidification may affect oxygen permeability of endothelium, as shown in rigidified erythrocyte membrane [8]. The effect of cholesterol on oxygen permeability of endothelial cells monolayer has been little investigated. The main purpose of the present study was to investigate the relation between the cholesterol-enrichment endothelial cells monolayer and the oxygen permeability. Membrane rigidification at various depths was assessed by fluorescence polarization of probes (DPH, TMA-DPH) specific for each membrane compartment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of endothelial cells and incorporation of cholesterol

The endothelial cells (ECV304 cell line, Cerdic, Sophia Antipolis, France) were grown in a humidified chamber at 37°C in culture 199 Medium (GIBCO) on glass coverslips (40 x 40 mm, Fisher). At confluence, the medium was removed and the coverslips were rinsed twice with the culture medium. Cells were incubated in 199 Medium in which 3.5 % polyvinylpyrrolidone (plasma expander), 0.4 % glucose, 1 % albumin, 0.8 % HEPES and various concentrations of cholesterol (cholesteryl hemisuccinate) was added, according to Shinitzky's modified procedure [9]. We used cholesteryl-hemisuccinate instead of cholesterol because of its miscibility without phase separation at the required concentrations [10]. Cholesterol final concentrations in medium culture were 3.42  $\mu$ M, 6.84  $\mu$ M and 17,11  $\mu$ M. The coverslips were incubated for 4 hours and then washed in 3 changes of PBS before fluorescent labelling (membrane fluidity or quenching experiments). A control was prepared under similar conditions but in a medium which contained the same proportion of ethanol (0.1%) without cholesteryl hemisuccinate. A blank phosphate buffer permitted assessment of the influence of incubation and ethanol. Similar results about membrane fluidity and oxygen quenching experiments were found with both control buffers.

### 2.2. Fluorescent probes and labelling

Stock solutions of probes were stored at + 4°C : diphenylhexatriene (DPH) 2 mM in THF (tetrahydrofuran) and 1-(4-(trimethylamino)phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH), 2 mM in DMF (dimethylformamide), pyrene butyric acid (PBA, Molecular Probes), pyrenedodecanoic acid (PDA, Molecular Probes) and pyrene-ketodecanoyl-cholesterol acid (PDA<sub>10</sub>-Chol, Sigma) 1 mM in DMF. For labelling, 3  $\mu$ L stock solutions were added to endothelial cells monolayer in 3 mL 199 Medium. After incubation for 30 min, the endothelial cells were washed in 3 mL phosphate buffer. The absence of excimers was confirmed by the

absence of fluorescence emission at 470 nm (Fig. 2 and 3). The concentrations used (1  $\mu$ M for the probes, 1/100 dilution for solvents) were too low to alter membrane fluidity.

### 2.3. Membrane «fluidity»

Membrane fluidity was studied by a fluorescence polarization method which measures the fluorescence anisotropy  $\langle r \rangle$  of 2 probes incorporated in the membrane (DPH and TMA-DPH). DPH was found to incorporate in the middle of the membrane and TMA-DPH to anchor by its cationic part at the membrane/water interface (Fig.1) [11,12]. The fluorescence anisotropy at 25°C was performed, on endothelial cells monolayer grown on glass coverslips, with a T-format continuous excitation spectrofluorometer (SLM Aminco 48000, SLM Instruments Inc, Urbana, IL) according to the formula  $\langle r \rangle = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{2(I_{\parallel} + I_{\perp})}$  where  $I_{\parallel}$  and  $I_{\perp}$  were the parallel and perpendicular emission intensities, respectively. The excitation wavelength was set to 365 nm and the emission wavelength to 425 nm. The background noise of light diffusion was corrected by a control monolayer.

### 2.4. Fluorescence digital imaging microscopy

A gaseous mixture was obtained by using the various oxygen and nitrogen outflows (atmospheric pressure) and a gas mixer (Schaefer techniques, Nozay, France).

For microscopy experiments, the gas was injected in an oxygen pressure chamber developed in our laboratory which was designed to be attached to the stage of a Olympus IX-70 fluorescence microscope. This one was equipped with a stabilized high-pressure mercury lamp (HBO 100 W) and an objective LCPlanFI20X. The intensity of the excitation source throughout one measurement did not induce any photobleaching. A dichroic mirror (WU cube, Olympus) selected the fluorescence excitation (330-365nm) and the integral part of the monomer emission spectrum (390-420 nm). Fluorescence emission was integrated at 25°C for 0.1 sec on a slow-scan cooling 12 bit CCD camera (effective area of 1317x1035 pixels, Kuv 1317, Princeton Instruments Inc, USA). A image intensity calibration kit (InSpeck, Molecular Probes, Eugene City, Ore., USA) was used for the calibration. The data is read out into a Pentium computer with 48MB RAM and is processed using WinView/Visilog imaging software. Both a blank image of detector dark current and the autofluorescence image were subtracted pixel-by-pixel from each image acquired and fluorescence intensities (grey level) measured.

### 2.5. Spectra emission fluorescence

For spectra fluorescence, the gas was bubbled in the dark in a quartz 199QS circulation well that contained the endothelial cells suspension (25°C). The fluorescence spectra were performed with

a photon counting spectrofluorometer for 1 sec with 5/3 slits (Fluoromax-2, Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, France) with a Datamax (grams) software. The excitation wavelength was set to 343 nm .

### *2.6. Pyrene derivative quenching by oxygen*

A technique of fluorescence intensity quenching was applied according to :  $F_0 / F = 1 + K_{sv} [O_2]$  with  $F_0$ ,  $F$  respectively the fluorescence intensities in the absence and in the presence of oxygen and  $K_{sv}$  the Stern-Volmer constant [13]. Fluorescent probes located at different depths depending on the alkyl chain length in the lipid bilayer were used;  $C_4$  for pyrene butyric acid (PBA) incorporated in the upper region and  $C_{12}$  for pyrene dodecanoic acid (PDA) located in the middle part of the endothelial cell membrane (Fig.1) [14]. In previous work by our group, it was shown that in the absence of static quenching by cholesterol [15], the molecular quenching constant  $K_{sv}$ , obtained from the slope of the regression line between  $[O_2]$  and  $F_0/F$ , represents the collision frequency between the fluorophore and oxygen (accessibility). The change in the characteristic values of quenching constant  $K_{sv}$  made it possible to assess the diffusion-solubility phenomenon. Although cholesterol itself can be oxidized, pyrene derivatives (PBA and PDA) used here are rather specific for molecular oxygen with its triplet multiplicity in the lowest energy electronic state.

## **3. Results**

In the present study we examined the effect of cholesterol on molecular oxygen diffusion. It must be kept in mind that we are below physiological cholesterol concentration in plasma (5mM).

### *3.1. Membrane fluidity*

Under the conditions used for labeling endothelial cells monolayer, the changes in fluorescence anisotropy are shown (Fig. 1). Membrane fluidity values, indicate that the DPH and TMA-DPH freedom of rotary motion decreased as the added cholesterol amount increased. The membrane fluidity was significantly reduced due to cholesterol enrichment process which is directly attributed to transfer of cholesterol into the membrane, leading to hardening. So we have verified membrane rigidification induced by cholesterol incorporation which can be explained by its property of increasing the order of bilayers.

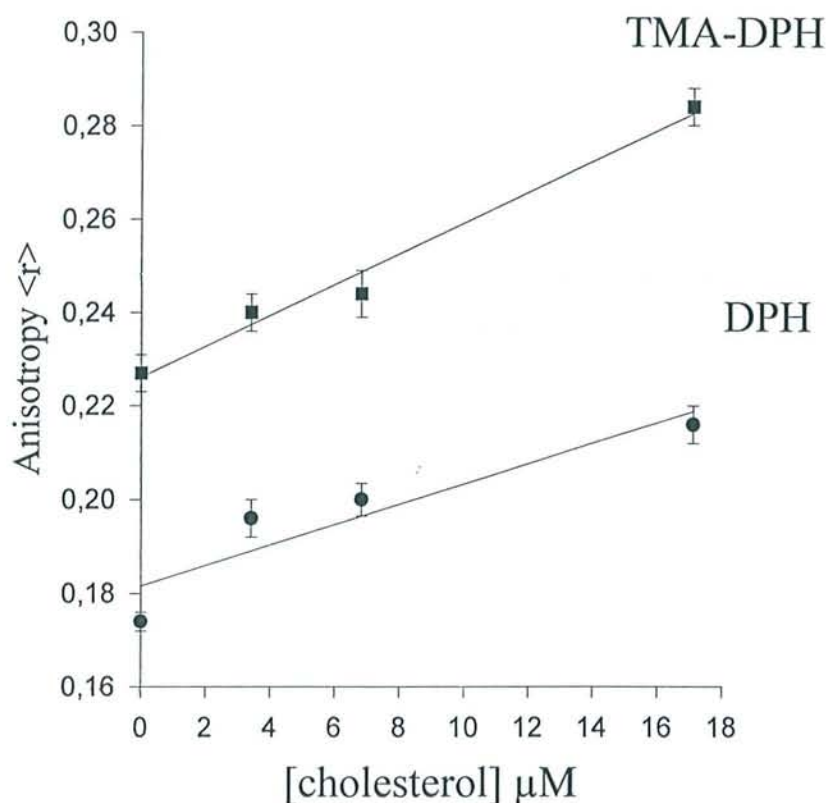


Figure 1. Effect of cholesterol concentration in culture medium on the evolution of fluorescence anisotropies measured on endothelial cells monolayer in culture with diphenylhexatriene (DPH) and 1-(4-(trimethylamino)phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH). The anisotropy  $\langle r \rangle$  was measured at confluence at 25 °C and corrected by a control unlabelled monolayer.

### 3.2. Effect of oxygen on Pyrene butyric acid (PBA) and Pyrene-ketodecanoyl-cholesterol acid (PDA10-Chol) fluorescence spectra in endothelial cells suspension.

The effect of molecular oxygen on fluorescence spectra of PBA and PDA in endothelial cells suspension are respectively shown in Fig.2. There is no detectable change in the fluorescence spectra and the absence of pyrene derivatives excimers was confirmed. For both probes, pyrene derivatives fluorescence is markedly decreased by oxygen. The constant quenching ( $K_{sv}$ ), obtained from the slope of the regression line between  $P(O_2)$  and  $F_0/F$ , were respectively 1.52  $\text{atm}^{-1}$  and 1.36  $\text{atm}^{-1}$  respectively for PBA and PDA.

### *3.3. Effect of cholesterol on oxygen permeability of endothelial cells monolayer by fluorescence microscopy*

Accessibility to the probes (oxygen diffusion) was assessed by a technique of intensity fluorescence quenching by oxygen molecular. We applied this method to fluorescence microscopy under undamaged conditions (no trypsin digestion) with cultured endothelium monolayer.

The distribution of fluorescence intensity was not uniform throughout the monolayer, due to specific labelling of membrane areas by probes (Fig.3). In the presence of oxygen-enriched gaseous mixture (from 0 % to 100 %), the oxygen level in endothelial cells were high and fluorescence intensity decreased.

The Ksv constant quenching of fluorescence intensities by oxygen was measured, and shown respectively for PBA and PDA in Figure 4. The Ksv values decreased significantly after incubation with cholesterol (from 1.35 x to 1.10 atm<sup>-1</sup> for PBA and 1.28 to 0.51 atm<sup>-1</sup> for PDA, Table I). Because this reaction is cholesterol concentration-dependent, these results support the idea of a physical barrier to oxygen permeation due to rigidification and reflect the relative resistance to oxygen diffusive passage.

This may mean that increasing the amount of cholesterol in the endothelial cells membrane significantly reduce oxygen permeability of endothelial cells.

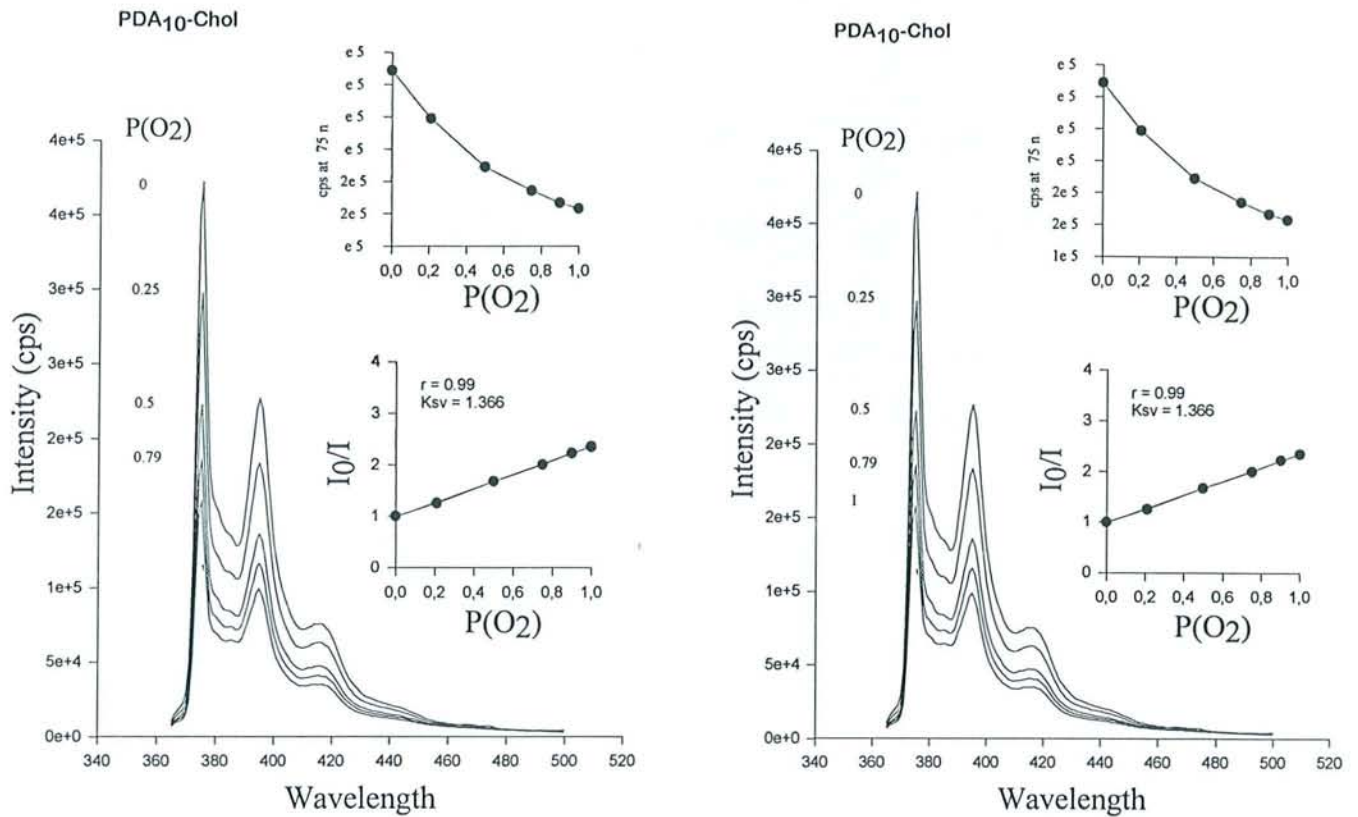
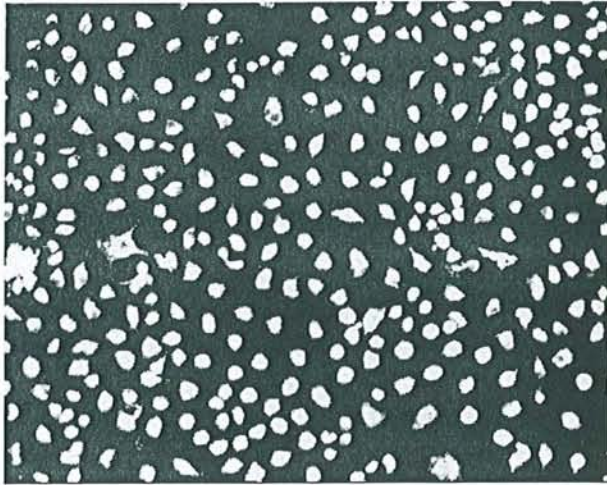
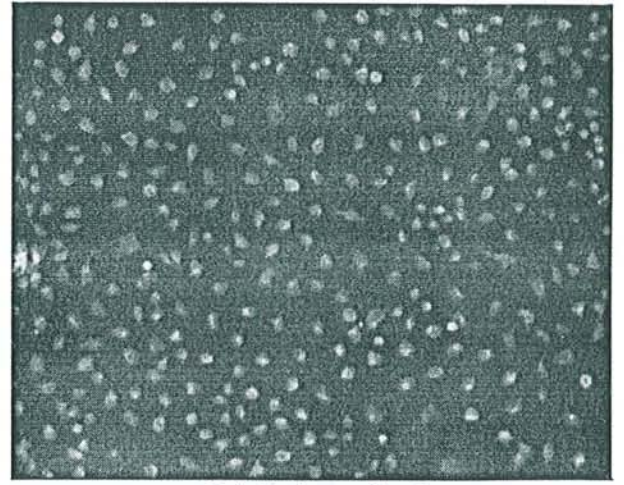


Figure 2. Human endothelial cells were grown on glass coverslips until confluent, rinsed twice in Medium 199 and labelled with pyrene butyric acid (PBA) or as described under "Materials and methods". To release cells from culture flask, endothelial were then washed in PBS (3 changes) and incubated for 2 min at 37 °C in PBS containing 0.25 % trypsin and 0.25 % EDTA. After washing, the cell suspension was resuspended in a quartz 199 QS circulation well containing 3 mL of culture medium. A gaseous mixture was bubbled in the dark at 25 °C. *in the Upper part* : quenching of PBA fluorescence intensity at 375 nm by oxygen; *in the middle part* : Stern-Volmer plots.; and *in the bottom part* : fluorescence emission spectrum.

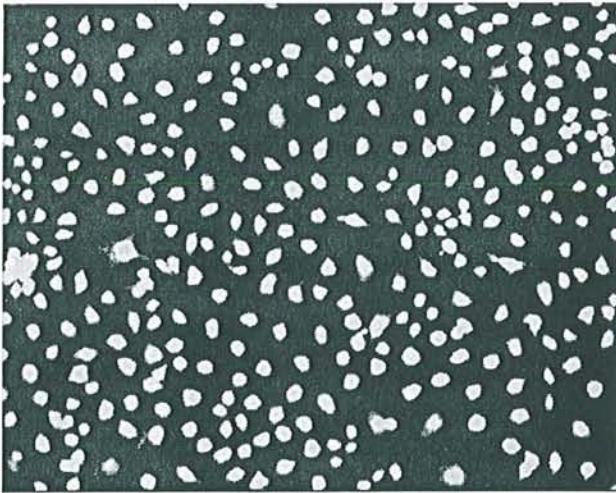
Figure 3. Fluorescence images of endothelial cells monolayer labelled with pyrene butyric acid (control, image magnification, x 20). The endothelial cells were grown until confluence on glass coverslips and incubated 4 hours in culture medium containing 3.42  $\mu\text{M}$ , 6.84  $\mu\text{M}$  or 17.11  $\mu\text{M}$  cholesterol. Then, cells were washed in PBS and labelled with pyrene butyric acid (PBA, 1 $\mu\text{M}$ ) or dodecanoic acid (PDA, 1 $\mu\text{M}$ ). The coverslips was inserted in a oxygen chamber staged on fluorescence microscope in which various P(O<sub>2</sub>) was injected at the atmospheric pressure. The excitation wavelength was set to 330-365 nm., fluorescence emission (390-420 nm) was integrated at 25 °C on a CCD camera for 0.1 sec (resolution of the images : 1317 x 1035)



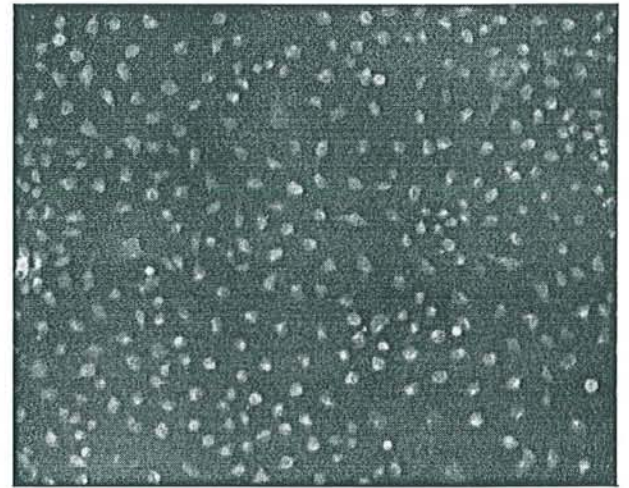
$P(O_2) = 0$



$P(O_2) = 0.6$



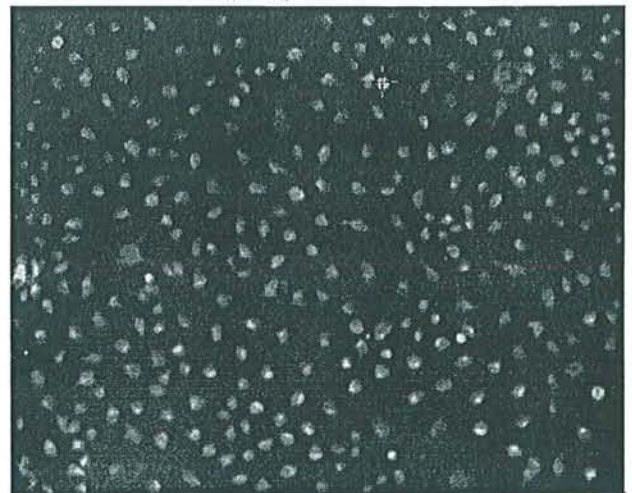
$P(O_2) = 0.2$



$P(O_2) = 0.8$



$P(O_2) = 0.4$



$P(O_2) = 1$

Figure 3. Fluorescence images of endothelial cells monolayer labelled with pyrene butyric acid (control, image magnification, x 20).



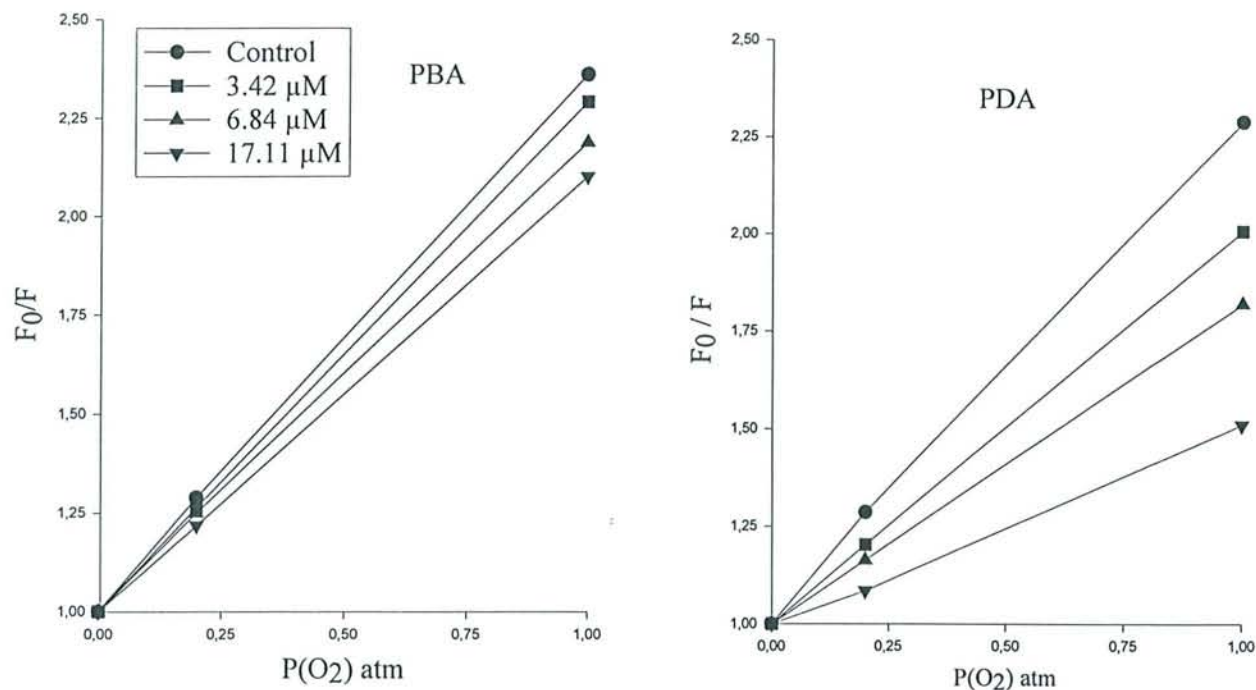


Figure 4. Stern-Volmer plots of oxygen quenching. Effect of cholesterol concentration in culture medium on pyrene derivatives (PBA and PDA) fluorescence intensity quenching by oxygen in endothelial cells monolayer.

Constant	cholesterol concentration in medium culture				
	Blank	Control	5 mg/L (3.42 $\mu\text{M}$ )	10 mg/L (6.84 $\mu\text{M}$ )	25 mg/L (17.11 $\mu\text{M}$ )
Ksv ( $\text{atm}^{-1}$ ) PBA	1.34 $\pm$ 0.03	1.35 $\pm$ 0.02	1.28 $\pm$ 0.03	1.18 $\pm$ 0.02	1.10 $\pm$ 0.03
Ksv ( $\text{atm}^{-1}$ ) PDA	1.30 $\pm$ 0.02	1.28 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.06

Table 1. Effect of cholesterol concentration in culture medium on Ksv quenching constant values (accessibility PBA and PDA to oxygen) measured on endothelial cells grown on glass coverslips under confluent. The results are presented as the means of four independent assays  $\pm$  SEM.

#### 4. Discussion

Increasing the amount of cholesterol in the extracellular medium was seen to increase the apparent membrane microviscosity, as assessed by fluorescence polarization, a method sensitive to the packing density. These results are consistent with results from other studies [6,16].

We have no quantitative information about the increase of membrane cholesterol content, but this phenomenon may be directly attributed to transfer of cholesterol into the endothelial cells membrane by interchange of free cholesterol molecules of medium culture. Cholesterol is known to modify the membrane properties by reducing fatty acyl chain motion in the phospholipid membrane and consequently the membrane core is rigidified more than the upper region. The diffusiveness of oxygen was thought to vary to membrane fluidity.

Using erythrocyte membrane, we have previously shown that determining oxygen diffusion did not confirm the predictions based on membrane fluidity [7]. In this study, on cultured endothelial cell monolayer, the results revealed that the changes in oxygen permeability were associated with a close relationship between the added cholesterol amount and the medium culture membrane microviscosity. It is worth noting that variations of resistance of oxygen diffusive passage are wider when the fluorescent probe (PDA) is in the proximity of cholesterol, as reflected by the DPH anisotropy values. The mechanism(s) by which rigidification may induce decreasing oxygen diffusion was not elucidated by this study. Only the changes in PBA end PDA accessibility to oxygen were compared inside the cell bilayer, and nothing proves that oxygen diffusion is greater across the endothelial cells than endothelial cell-to-cell junctions (interendothelial gaps).

In conclusion, our data clearly show that very low cholesterol concentration decreases the oxygen permeability of endothelial cells monolayer. The diffusion barrier imposed by the rigidified membrane is large and could affect molecular oxygen transfer to underlying tissues.

#### References

- [1] Björnheden T, Evaldsson M, Wiklund O: A method for the assessment of hypoxia in the arterial wall, with potential application in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:178-185.
- [2] Liu CY, Eskin S.G, Hellums J.D: The oxygen permeability of cultured endothelial cell monolayers; in V.Paupel (ed): *Oxygen transport to tissue IV*. New York, Plenum Press, 1994.
- [3] Hook C, Kamaguchi K, Scheid P, Piiper J: Oxygen transfer of red blood cells : experimental data and model analysis. *Respir. Physiol* 1988;72:65-73.

- [4] Geiger MW, Turrion NJ: Fluidity and oxygen penetration of lipid vesicles studied by fluorescence probes. *Photochem photobiol* 1977;26:221-224.
- [5] Vekshin NLJ: On measuring biomembrane microviscosity using pyrene luminescence in aerobic conditions. *Biochem Biophys Methods* 1987;15:97-105.
- [6] Hagerman JS, Gould RG: The in vitro interchange of cholesterol between plasma and red cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951;78:329-332.
- [7] Cooper RA, Leslie MH, Fischkoff S, Shinitzky M, Shattil S: Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterols per phospholipid. *Biochemistry* 1978;17:327-331.
- [8] Dumas D, Muller S, Gouin F, Baros F, Viriot ML, Stoltz JF: Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched erythrocyte membrane. *Arch Biochem Biophys* 1997;341:34-39.
- [9] Shinitzky M, Skornick Y, Haran-Ghera N: *Proc Natl Acad Sci* 1979;10:5313-5316.
- [10] Bach D, Borochoy N, Wachtel E.J, Shinitzky M: Cholesteryl hemisuccinate-cholesterol interaction, miscibility properties of the sterol. *Chem Phys Lipids* 1995;76:123-127.
- [11] Illinger D, Duportail G, Poirel-Morales N, Gerard D, Kuhry JG: A comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH as a probe for plasma membrane and for endocytic membrane. *Biochim Biophys Acta* 1995;1239:58-66.
- [12] Pebay-Peyroula E, Dufourc EJ, Szabo AG: *Biophys Chem* 1994;53:45-56.
- [13] Vanderkooi JM, Green J, Wilson DF: Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol-rich membranes. *Biochemistry* 1974;13:1589-1595.
- [14] Deumié M, El Baraka M, Quinones E: Fluorescence quenching of pyrene derivatives by iodide compounds in erythrocyte membranes : an approach of the probe location. *Photochem. Photobiol* 1995;87:105-113.
- [15] Dumas D, Muller S, Baros F, Gouin F, Viriot ML, Taccoen A, Stoltz JF: Measurement of oxygen diffusivity using fluorescence quenching of pyrenic probes in cholesterol enriched-erythrocyte membrane. *J Chim Phys* 1997;94:1-17.
- [16] Velez M, Lillo MP, Acuna AU, Gonzalez-Rodriguez J: Cholesterol effect on the physical state of lipid multibilayers from platelet plasma membrane by time-resolved fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1235: 343-350.

*Discussion générale*

### **III.6) Discussion générale**

L'hypoxie tissulaire est une conséquence commune à de nombreuses pathologies cardiovasculaires dites ischémiantes, mais son origine reste très variée. D'une façon générale et simplifiée, une perturbation de la distribution de l'oxygène aux tissus s'accompagne de plusieurs types d'hypoxie :

a) *Hypoxie hypoxémique* : lorsque le contenu en oxygène de l'hémoglobine fonctionnelle ne suffit pas au maintien du gradient nécessaire entre le sang et les tissus. Cette hypoxémie artérielle n'implique pas forcément une hypoxie tissulaire.

b) *Hypoxie anémique* : elle représente un défaut d'oxygénation lié à une diminution de la capacité de transport de l'oxygène par le sang, soit par une diminution du taux de l'hémoglobine (anémie) soit à cause d'une diminution de la capacité de transport par l'hémoglobine (méthémoglobine, intoxication par l'oxyde de carbone, etc.). Dans ce cas, le clinicien doit savoir établir la différence entre la pression partielle et le contenu en oxygène du sang artériel. En général, l'hypoxie anémique s'accompagne rarement d'une hypoxémie.

c) *Hypoxie d'origine circulatoire* : la circulation capillaire peut s'avérer incapable de satisfaire les besoins en oxygène des cellules, soit par une stase capillaire (stase sanguine), c'est à dire lorsque le système circulatoire est totalement ou partiellement obstrué (athérosclérose, thrombose, caillots...) au niveau de ses ramifications successives (artères, artérioles, capillaires...). Ces phénomènes touchent directement le transport global des érythrocytes qui dépend également de l'hématocrite et des propriétés rhéologiques macro- (viscosité) et microscopiques (déformabilité, agrégation, résistance à l'hémolyse) du sang.

d) *Hypoxie histologique* : la cellule n'utilise pas l'oxygène de manière optimale et une hypoxémie lui est rarement associée.

Enfin, un aspect lié à une résistance (barrière) aux phénomènes passifs de diffusion-convection qui régissent les échanges gazeux entre le sang et les tissus environnants, et qui a fait l'objet de ces études.



Comme nous l'avons vu dans la partie III.1, le transfert alvéolo-capillaire et la cinétique de fixation de l'oxygène à l'hémoglobine (dans les capillaires pulmonaires) ne constituent pas des facteurs limitants à une oxygénation optimale du sang. A l'autre bout du système circulatoire, c'est-à-dire dans les capillaires, la cinétique de libération de l'oxygène et les phénomènes de diffusion-convection de l'oxygène du plasma vers les tissus peuvent être à l'origine de graves états hypoxiques.

Pour diagnostiquer un état d'hypoxie tissulaire, un examen clinique permet d'évaluer le débit cardiaque ainsi que la perfusion capillaire, mais aucun examen ne peut déterminer les causes responsables des troubles de l'oxygénation tissulaire. Ainsi le degré et l'étendue d'une hypoxie tissulaire ne peuvent être caractérisés par une valeur mesurée du phénomène de diffusion de l'oxygène, car les cliniciens ne disposent d'aucun outil permettant d'effectuer ce type d'investigation.

Les seules informations quantitatives disponibles *in vivo* portent sur la valeur mesurée de la pression partielle artérielle en oxygène ( $PO_2$ ) mais celle-ci ne renseigne aucunement sur le degré d'oxygénation tissulaire. Seules quelques méthodes indirectes ont été développées sur la base de la détection des produits libérés par les dégâts causés par l'hypoxie sur le système vasculaire. Il apparaît clairement que les données apportées par des méthodes indirectes de quantification des signes extérieurs d'hypoxie n'apportent pas d'information sur le phénomène de diffusion de l'oxygène.

En étroite liaison avec le phénomène de convection, le phénomène de diffusion de type passif (gradients) est à l'origine des différents échanges gazeux qui alimentent l'organisme en oxygène. Celui-ci est régi par les différents gradients rencontrés de part et d'autre des membranes biologiques. Des barrières (ou résistances) à cette diffusion passive sont susceptibles d'être à l'origine de graves dysfonctionnements qui restreignent en partie ou annulent l'approvisionnement en oxygène des différents organes, tissus et cellules qui le consomment. Ces résistances restent à identifier, et seraient localisées au sein des divers compartiments traversés par l'oxygène, c'est-à-dire les membranes biologiques constitutives des cellules (érythrocytes), des vaisseaux sanguins (cellules endothéliales) et la composante liquide du sang (plasma) dans laquelle sont véhiculées les cellules circulantes.

A ce jour, peu d'études ont portées sur la localisation et l'amplitude des résistances à la diffusion passive de l'oxygène en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (élasticité, plasticité, déformabilité...). Nous nous sommes fixés comme objectif de préciser l'influence des différents compartiments biologiques sur le phénomène de diffusion de l'oxygène.

**Dans un premier temps**, nous avons caractérisé chaque milieu biologique rencontré par ses propriétés rhéologiques, à différents niveaux d'investigations. La **viscosité** plasmatique représente un paramètre rhéologique d'ordre *macroscopique* qui varie selon la composition biochimique des plasmas. Au niveau *microscopique*, deux paramètres ont été mesurés dans ce travail : 1) la **déformabilité** érythrocytaire qui représente la propriété élongationnelle des hématies soumises à un champ de cisaillement et 2) la **fragilité** osmotique qui reflète la résistance à l'hémolyse hypotonique lente. Ceux-ci nous ont permis de préciser le degré de rigidification de la membrane aussi bien par le cholestérol que par le glutaraldéhyde. Enfin, à l'échelle moléculaire, des expériences de polarisation de fluorescence (mesures des anisotropies de fluorescence) nous ont permis de caractériser les érythrocytes et les cellules endothéliales par leur **fluidité membranaire** apparente.

D'une façon générale, nos résultats sur la membrane érythrocytaire ont montré que l'incorporation de cholestérol entraîne des variations importantes des paramètres rhéologiques microscopiques (déformabilité et fragilité osmotique) et s'accompagne également d'une baisse de la fluidité membranaire apparente. Cette modulation de la réponse en fonction du degré de rigidification membranaire renseigne sur la validité de ce modèle d'étude qui répond de manière satisfaisante lorsqu'il est sollicité dans des conditions extrêmes (rapport cholestérol/protéine : de 0,18 à 0,83).

Le même type d'expériences portant sur la rigidification membranaire d'une monocouche de cellules endothéliales humaines en culture (par incubation dans des milieux plus ou moins riches en cholestérol) a donné des résultats similaires.

Enfin, nous avons utilisé des plasmas de patients présentant une macroglobulinémie (de Waldenström ou de Kahler) pour apprécier l'influence du taux en immunoglobulines sur la viscosité plasmatique. Cette étude nous a permis de disposer d'un modèle liquide dont les propriétés rhéologiques macroscopiques étaient figées.

Nous disposons ainsi de trois modèles biologiques *in vitro* (membrane érythrocytaire, monocouche de cellules endothéliales et plasma sanguin) aux caractéristiques physico-chimiques



définies. Leurs compositions sont variables (taux de cholestérol ou glutaraldéhyde, taux d'immunoglobulines) selon le type d'étude envisagé et affectent de manière importante les propriétés rhéologiques à différents niveaux (macroscopique, microscopique et moléculaire), c'est-à-dire une des composantes de la résistance à la diffusion passive de l'oxygène.

**Dans un second temps**, nous avons mis en œuvre une technique basée sur l'inhibition de fluorescence (capteur optique) pour apprécier le phénomène de diffusion de l'oxygène au sein des milieux biologiques. Les deux paramètres principaux, l'intensité de fluorescence ( $F$ ) et la durée de vie des états excités précurseurs de la fluorescence ( $\tau$ ), ont été mesurés à l'aide de différentes configurations matérielles (spectrofluorimètres, microscope à fluorescence) avec plusieurs méthodes (fluorimétrie de phase, comptage monophotonique, système de type Boxcar). Après la validation de ces différentes approches méthodologiques entre elles, de nombreux paramètres ont été testés, principalement pour la microscopie résolue dans le temps. Sur le plan théorique, nous avons vérifié que le processus d'inhibition de fluorescence du monomère de l'acide pyrène butyrique (PBA) et de l'acide pyrène dodécanoïque (PDA) est de type purement collisionnel (absence d'inhibition de type statique). Le calcul du coefficient de diffusion de l'oxygène est entaché d'erreurs liées aux éventuelles variations de la solubilité de l'oxygène dans les différentes phases que comporte une membrane biologique. Cependant, la fréquence de collision (accessibilité de la sonde à l'oxygène) c'est-à-dire les constantes d'inhibition statiques ( $K_{sv}$ ) ou dynamiques ( $K_d$ ) permet d'interpréter le phénomène de diffusion de l'oxygène.

**Dans un troisième temps** et forts de ces outils, nous avons appliqué ces techniques à l'étude des relations entre les paramètres rhéologiques décrits précédemment et le phénomène d'inhibition de fluorescence (par l'oxygène) de sondes localisées dans les milieux biologiques (dérivés pyréniques) ou dans des supports de culture (dérivé du ruthénium).

Comme nous l'avons déjà évoqué, il est attendu que la diminution de la fluidité membranaire (ou la présence d'obstacles) s'accompagne d'une diminution de la diffusion de l'oxygène. Nous avons tenté de vérifier cette relation *in vitro* sur chaque compartiment biologique accessible.

**SUSPENSION D'ERYTHROCYTES** : Nous avons retrouvé cette relation liant les propriétés rhéologiques (mesure de la fluidité par la formation d'excimères du pyrène) et la cinétique de diffusion de l'oxygène pour des érythrocytes rigidifiées à l'aide d'un fixateur chimique, le

glutaraldéhyde. Cependant, nous avons montré que la présence des molécules d'hémoglobine constitue une voie secondaire d'inhibition de la fluorescence des dérivés pyréniques, et constituait un facteur d'erreur non négligeable.

**MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE** : Un modèle inspiré des conditions biologiques a été élaboré, en vue de suivre les effets de l'incorporation de cholestérol sur les propriétés rhéologiques microscopiques des érythrocytes (déformabilité et fragilité osmotique). Afin de nous affranchir de l'influence de l'hémoglobine sur le signal de fluorescence, nous avons optimisé un protocole de préparation des membranes d'érythrocyte dépourvues de ce pigment. La relation précédente (rigidification et diffusion de l'oxygène) n'ayant pas été retrouvé avec des membranes d'érythrocyte enrichies en cholestérol, d'autres explications furent avancées. Celles-ci concernent un phénomène de ségrégation des molécules de phospholipides dans des régions membranaires restreintes, dans lesquelles la solubilité de l'oxygène serait augmentée. Dans ce dernier cas, l'incorporation de cholestérol augmente la diffusion de l'oxygène dans la partie centrale de la membrane et ceci malgré une rigidification membranaire importante (vérifiée par des mesures de polarisation de fluorescence avec les sondes DPH et 12-AS). Cette constatation n'est pas une donnée isolée dans la littérature et d'autres équipes ont décrit des résultats similaires montrant une augmentation de la diffusion de l'oxygène dans la partie centrale de la membrane d'érythrocyte. Par ailleurs, ces résultats concordent avec des mesures effectuées en RPE sur le transport de l'oxygène dans une membrane artificielle enrichie en cholestérol.

A ce stade, nous disposons donc d'un modèle fiable et facile à produire (hémolyse rapide et centrifugation) qui nous a permis d'analyser le phénomène de diffusion de l'oxygène à différentes profondeurs dans la membrane érythrocytaire (par rapport à la surface).

**PLASMA** : Le plasma représente la composante liquide du sang, et véhicule les érythrocytes jusqu'au plus profond de l'organisme. Une hyperviscosité sanguine, liée entre autres à une agrégation érythrocytaire, peut être à l'origine d'ischémies locales. Une hyperviscosité plasmatique liée à un taux anormalement élevé d'immunoglobulines serait à l'origine d'une résistance au phénomène de diffusion-convection de l'oxygène et contribuerait au phénomène d'hypoxie tissulaire. Dans cette étude, nous avons montré qu'une augmentation de la viscosité de plasmas pathologiques (Waldeström ou Kahler) affecte le phénomène de diffusion de l'oxygène de manière importante. En reproduisant ces expériences sur des plasmas de viscosités différentes mais comprises dans une fourchette qui reste à définir (gammaglobinopathies diverses), il apparaît envisageable d'établir une droite étalon reliant la constante  $K_{sv}$  à l'inverse de la

viscosité plasmatique. Cette approche permettrait de prendre en compte le facteur macroscopique (viscosité sanguine) dans un modèle diffusionnel de l'oxygène des érythrocytes aux tissus.

**CELLULES ENDOTHELIALES** : Pour reproduire le processus de transfert de l'oxygène à travers la paroi vasculaire (vers les tissus sous-jacents), des cellules endothéliales humaines immortalisées furent mises en culture. Les cellules endothéliales se présentent sous la forme d'une monocouche tapissant l'intérieur des parois vasculaires. La constitution de la paroi vasculaire montre d'autres compartiments (membrane basale, sous-endothélium, adventice...) dont l'influence sur le phénomène de diffusion de l'oxygène serait à prendre en considération. Cependant, nous avons focalisé nos recherches sur la monocouche de cellules endothéliales car celle-ci représente, dans le cas particulier des capillaires, plus qu'aucun autre compartiment en épaisseur.

Une approche méthodologique différente utilisant la microscopie à fluorescence a été mise en oeuvre pour pallier le problème de la mise en suspension des cellules endothéliales, condition cellulaire non physiologique. Cette méthodologie utilisant soit une caméra CCD soit un photomultiplicateur a permis de déterminer des intensités et des durées de vie de fluorescence tout en préservant la monocouche cellulaire (aucune digestion enzymatique par la trypsine). En collaboration avec le GRAPP-DCPR, nous avons utilisé un système de type Boxcar qui associe la résolution microscopique à la résolution temporelle de la fluorescence. Une chambre d'analyse en atmosphère contrôlée a également fait l'objet d'un développement au sein de notre laboratoire.

Celle-ci a permis d'entreprendre de nombreuses études préliminaires sur la diffusion de l'oxygène à l'aide de dérivés pyréniques (PBA, PDA, PDA<sub>10</sub>, PDA<sub>10</sub>-Chol) incorporés dans une monocouche de cellules endothéliales (objectif, bague de correction, mise au point, nombre de cellules, état de confluence, temps d'exposition). Le comportement du déclin de fluorescence de certaines sondes (PDA, PDA<sub>10</sub>) dans les milieux hétérogènes se traduisait par une déviation à la linéarité de la représentation dite « de Stern-Volmer » (déclin pluri-exponentiel). Il nous a semblé plus opportun de ne considérer que des déclins mono-exponentiels afin d'optimiser le traitement de ces derniers, c'est-à-dire d'utiliser une sonde dans un milieu homogène. Les dérivés pyréniques présentant un caractère hydrophobe très marqué (faible solubilité dans l'eau), le choix d'un autre fluorophore s'imposait. Nous avons retenu la combinaison d'un gel de gélatine (recouvert d'un film de PLGA) et d'un dérivé du ruthénium, le Ru(phen).

A l'aide du système de type Boxcar en « configuration microscopie », de la chambre d'analyse et d'un gel de gélatine contenant le Ru(phen), diverses expériences furent menées. Les valeurs des durées de vie obtenues avec ce système ont été confrontées à celles obtenues avec d'autres méthodes de déterminations (comptage monophotonique et modulation de phase). Ceci ne constitue pas véritablement une validation de ce système de microscopie à fluorescence résolue dans le temps, mais les valeurs sont similaires et du même ordre de grandeur. L'utilisation du système de type Boxcar sur un microscope ne s'en trouve par conséquent pas perturbé, malgré le trajet optique différent (lentilles, miroirs) qui n'affecte pas le déclin de la fluorescence.

De nombreuses expériences ont suivi afin de préciser le temps de réponse du système, la concentration en Ru(phen) dans le gel, et l'incidence du film de PLGA sur la diffusion de l'oxygène. Nous avons ensuite abordé l'influence d'une monocouche de cellules endothéliales sur la diffusion de l'oxygène. Dans cette configuration matérielle, l'oxygène doit traverser la monocouche de cellules, le film de PLGA et le gel avant que l'équilibre soit atteint et que la réponse soit stable. Les résultats font état d'une diminution importante des constantes  $K_d$ , ce qui signifie une résistance au phénomène de diffusion de l'oxygène. Cependant, la présence au-dessus de la monocouche d'une suspension de plasma fait brutalement chuter l'inhibition de fluorescence par l'oxygène.

Comme nous l'avons montré précédemment, la viscosité plasmatique constitue un facteur d'importance sur la diffusibilité de l'oxygène. Il paraît dès lors envisageable d'aborder ces expériences d'inhibition de fluorescence à l'aide de suspensions de plasmas de différentes viscosités, lesquels seraient déposés sur une monocouche de cellules endothéliales cultivées sur un gel enrichi en Ru(phen). Les résultats permettraient ainsi de "compiler" les résistances à la diffusion passive de l'oxygène, et de se rapprocher des conditions physiologiques. Il en ressort que l'établissement d'une courbe représentant la constante  $K_d$  en fonction de l'inverse de la viscosité plasmatique serait d'un réel intérêt. En fait, cette relation permettrait d'accéder directement à des informations sur l'oxygénation tissulaire à partir des seules valeurs de la viscosité plasmatique mesurée.

Cette approche n'est cependant valide que si la résistance présentée par la monocouche de cellules endothéliales est une constante, ce qui n'est vraisemblablement pas le cas dans l'organisme.

Pour tenter d'y répondre et inclure certains facteurs d'ajustement à ces modèles, nous avons abordé l'effet de la rigidification membranaire de la monocouche de CE sur la diffusion de l'oxygène.

Nos expériences ont permis de montrer qu'une incubation de cette monocouche en présence de faibles concentrations en cholestérol dans le milieu de culture (3,42 ; 6,84 et 17,11  $\mu\text{M}$ ) s'accompagnait d'une rigidification, c'est-à-dire d'une diminution de la fluidité membranaire mesurée (DPH et TMA-DPH). Il est à noter que les concentrations de cholestérol utilisées dans cette étude sont très inférieures à la concentration physiologique dans le plasma (5 mM). La diffusion de l'oxygène en fonction de la micro-fluidité membranaire est alors suivie au niveau de deux fluorophores (PBA et PDA). Nous avons réalisé des clichés des intensités de fluorescence (niveaux de gris) dans une chambre d'analyse à l'aide d'une caméra CCD refroidie. L'évolution des constantes d'inhibition des intensités de fluorescence ( $K_{sv}$ ) montre une diminution de la diffusion de l'oxygène aussi bien dans la région superficielle que dans la région profonde de la membrane. Ces résultats illustrent l'influence du cholestérol sur les propriétés rhéologiques moléculaires et les conséquences de cette rigidification sur la diffusion de l'oxygène à travers la paroi vasculaire, en particulier au niveau de la monocouche endothéliale. A ce niveau, nous avons mis en évidence que le transport de l'oxygène aux tissus pouvait être affecté de manière importante en présence de faibles concentrations en cholestérol.

En l'état actuel de nos résultats, plusieurs approches simples permettent de décrire le phénomène d'inhibition de la fluorescence par l'oxygène dans chaque cas (membrane érythrocytaire, plasma, monocouche de CE). Pour globaliser cette approche et construire un modèle fidèle aux conditions physiologiques, seule la résolution temporelle de la fluorescence devra être mise en oeuvre afin d'homogénéiser les approches et les précisions instrumentales. Cela n'a pas été possible dans ce mémoire et la chronologie des résultats présentés ne correspond pas à la chronologie des études réalisées. Une fois les optimisations réalisées, les performances de ce banc optique (microscopie à fluorescence résolue dans le temps) permettront de réaliser de multiples études.

## *Conclusion et Perspectives*

Au cours des diverses études réalisées, nous avons conservé comme objectif premier la modélisation du phénomène de diffusion de l'oxygène. Les compartiments biologiques susceptibles de présenter une résistance à la diffusion passive de l'oxygène seraient à l'origine d'une hypoxie tissulaire. Nous en avons étudié trois : la membrane érythrocytaire, le plasma et la monocouche de cellules endothéliales (qui représente la paroi du capillaire). Quelques facteurs correctifs majeurs (concentration en cholestérol, concentration en immunoglobulines) et qui affectent directement les propriétés rhéologiques macroscopiques (viscosité plasmatique), microscopiques (déformabilité érythrocytaire, fragilité osmotique) et moléculaire (fluidité membranaire) ont été précisés. D'autres facteurs d'importance restent à aborder (agrégation érythrocytaire, constitution exacte de la paroi vasculaire, hémodynamique). Aux termes de ces différents travaux, un outil prédictif de l'état d'oxygénation tissulaire pourrait apporter aux cliniciens une aide au diagnostic «d'hypoxie tissulaire». Ils ne disposent actuellement que de la mesure de la pression partielle artérielle en oxygène.

Au niveau instrumental, une étape importante a été franchie avec l'utilisation d'un microscope à fluorescence résolue dans le temps. Elle fait d'ailleurs l'objet d'un transfert industriel car à ce jour, aucune configuration identique est disponible sur le marché. Cette approche temporelle a permis de s'affranchir de nombreux problèmes rencontrés lors du recueil des intensités de fluorescence et constitue, à terme, un important potentiel d'applications biologiques.

Le développement d'une telle technique d'investigation en microscopie résolue dans le temps apporte des améliorations importantes en terme de détermination des durées de vie des états excités précurseurs de la fluorescence dans les milieux biologiques. Ces mesures peuvent être mises à profit dans le cadre d'études pharmacologiques par exemple l'incidence d'une drogue sur la perméabilité à l'oxygène de l'endothélium.

Enfin, quelques études complémentaires apporteront sur ce travail un nouvel éclairage. Elles porteraient sur l'influence de l'hémodynamique (influence des forces de cisaillement), la production de radicaux libres oxygénés sur l'intégrité de l'endothélium (péroxydation membranaire) et l'expression de molécules d'adhésion mises en cause dans les réactions immunologiques et inflammatoires.

*Annexes*



## ANNEXES

## ANNEXE 1 : LA FLUORESCENCE



## A1.1) Généralités

Le schéma 7 représente un diagramme très simplifié des différents niveaux d'énergie d'une molécule et décrit les principes des différents phénomènes liés à la photoluminescence.

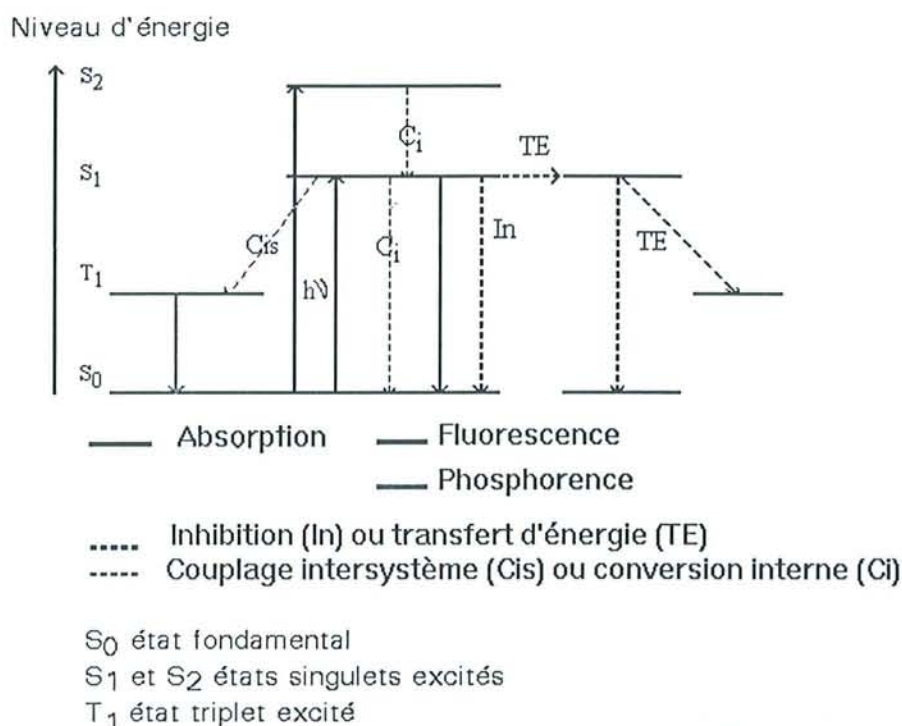


Schéma 7 : Diagramme simplifié des différents niveaux d'énergie d'une molécule.

Dans les conditions normales, le niveau d'énergie électronique d'une molécule a une valeur minimale (niveau fondamental  $S_0$ ). Lorsqu'une quantité appropriée d'énergie lumineuse est fournie à une molécule (absorption), cette molécule peut passer de l'état stable  $S_0$  à un état excité supérieur  $S_1$  ou  $S_2$  (états excités singulets), par transfert d'un électron d'une orbitale occupée à une orbitale inoccupée.

L'énergie est fonction de la fréquence de la radiation excitatrice et donc de sa longueur d'onde :

$$\Delta E = h\nu = hc / \lambda$$

$h$  : constante de Planck ( $6,6 \cdot 10^{-34}$  j/s)

$\nu$  : fréquence de la radiation excitatrice

$c$  : célérité de la lumière sous vide

$\lambda$  : longueur d'onde de la radiation excitatrice

L'absorption de la radiation par cette méthode obéit donc à la relation suivante :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$$

$E_1$  : niveau d'énergie initial de la molécule

$E_2$  : niveau d'énergie final de la molécule et  $E_2 > E_1$ .

Après un certain temps, la molécule à l'état excité peut retrouver son état d'énergie initial. Ce retour peut se produire suivant différentes voies, il peut se produire soit directement, soit par étapes successives avec passage pendant un certain intervalle de temps à des niveaux d'énergie intermédiaires.

Grâce à une désactivation vibrationnelle par conversion interne, on aboutit à la population de l'état  $S_1$ , généralement au plus bas niveau de vibration de l'état singulet excité.

A partir de  $S_1$ , la molécule peut être désactivée et revenir à l'état fondamental par divers processus :

\* Transition radiative : restitution d'énergie lumineuse par le phénomène de fluorescence.

\* Transition non radiative : restitution d'énergie sous forme de chaleur par collision.

\* Croisement intersystèmes par passage à l'état triplet, ce qui donne lieu à la phosphorescence après retour à l'état fondamental par transition radiative. Ainsi, la fluorescence est aussi en compétition avec le passage intersystèmes : état singulet  $S_1 \rightarrow$  état triplet  $T_1$ , l'émission de lumière qui accompagne le passage  $T_1 \rightarrow S_0$  (phosphorescence).

D'une manière globale, le phénomène de fluorescence peut être résumé comme un processus de relaxation radiative des molécules excitées entre états de même multiplicité.

### **A1.2) Fluorimétrie résolue dans le temps : mesure des durées de vie de fluorescence à l'état excité**

Deux méthodes sont utilisées pour la détermination des durées de vie, soit dans le domaine des fréquences soit dans le domaine temporel. Les besoins matériels sont alors totalement différents et leurs limitations conditionnent les applications.

#### **a) FLUORIMETRIE DE PHASE**

La substance fluorescente est excitée par une source lumineuse modulée sinusoïdalement en amplitude (Cranney et al, 1983. Alcalá et al, 1987).

En raison du caractère fini de la durée de vie, l'émission est retardée dans le temps par rapport à l'excitation modulée et ce retard de phase est proportionnel à la durée de vie du fluorophore. La réponse de l'échantillon se traduit également par une démodulation de l'émission par un facteur  $m$ , l'amplitude de  $B/A$  caractérisant l'émission étant plus faible que l'amplitude  $b/a$ , représentant l'excitation.

$$m = (B/A) / (b/a)$$

Le déphasage  $\phi$  et le facteur de démodulation sont utilisés pour les déterminations du déclin de la fluorescence. La plupart des substances émissives présentant plusieurs durées de vie, il est nécessaire de mesurer le déphasage et le facteur de démodulation sur une gamme de fréquence de modulation la plus large possible, la fréquence centrale étant proche de l'inverse de la durée de vie moyenne de l'émission. La forme de la réponse en fonction de la fréquence est déterminée par le nombre de durées de vie présentes dans l'échantillon. Il est possible d'interpréter les valeurs de déphasage et de démodulation en termes de durées de vie apparentes.

Dans le cas de multiples durées de vie, l'objectif est de déceler ces durées de vie à partir de la réponse en fréquence expérimentalement déterminée. Ceci est effectué par ajustement avec la méthode non linéaire des moindres carrés des valeurs de phase et de démodulation avec différents modèles proposés.

## b) BOXCAR

Il s'agit d'un Boxcar EG & G PARC modèle 4100 en partie piloté par ordinateur avec une acquisition informatisée. Ce matériel, acquis par le DCPR-GRAPP (ENSIC, NANCY, F. Baros, M-L.Viriot) dans le cadre de la thèse de J.F. Gouin (1996) nous a été aimablement confié pour réaliser ces travaux. Ce Boxcar est composé de quatre éléments, désignés sous leur numéro de modèle :

- Deux « Boxcar averager » 4121B qui sont les fenêtres d'observation A et B. Un signal de déclenchement du 4144 commande l'ouverture de cette fenêtre (fenêtre A uniquement dans notre cas) qui permet l'intégration par le photomultiplicateur du signal pendant un temps défini.
- Un générateur de retard digital 4144 : l'ouverture des fenêtres d'observation doit être commandée avec un certain retard par rapport au signal de déclenchement de l'expérience (éclair laser). Le générateur de retard assure ce rôle en délivrant deux signaux décalés par rapport au signal de déclenchement de l'expérience. Les retards qui correspondent à la position des fenêtres de mesure sont variables.
- Un 4161A qui permet la conversion analogique/numérique ainsi que l'affichage du signal mesuré par la fenêtre A.
- Une carte GPIBIIA National Instruments assure la liaison avec un ordinateur de type compatible PC. Les intensités de fluorescence mesurées avec ce système sont exprimés en Volts. Cela correspond à la valeur du signal donné par le PM qui est proportionnelle à l'intensité lumineuse.

On mesure directement l'intensité lumineuse émise par l'ensemble des molécules excitées entre  $t$  et  $t + \Delta t$  après l'instant d'émission de l'éclair laser. Une « fenêtre » de mesure de largeur  $\Delta t$  est ouverte (fenêtre de temps) et la lumière est intégrée entre  $t$  et  $t + \Delta t$  par un détecteur (photomultiplicateur).

L'instant d'émission de l'éclair laser sert de référence pour déterminer l'instant  $t$  où est positionnée la fenêtre. Le déclin est reconstitué en faisant défiler la fenêtre de mesure ( $\Delta t$ ). Pour chaque éclair laser, le délai  $t$  entre l'excitation et la mesure est incrémenté de  $\Delta t$ , ce qui revient à appliquer une fenêtre déroulante.

Le rapport signal sur bruit peut être notablement amélioré en faisant pour chaque instant de mesure la moyenne des intensités mesurées sur  $N_{\text{moy}}$  excitations. La position de la fenêtre est alors incrémentée tous les  $N_{\text{moy}}$  coups.

### c) COMPTAGE MONOPHOTONIQUE PAR EXCITATION PULSEE.

Le déclin de fluorescence, c'est-à-dire la distribution des intensités de fluorescence en fonction du temps, est obtenu par la distribution des probabilités d'émission d'un seul photon, suite à une excitation. Après une excitation infiniment brève (pulsée), l'intensité de fluorescence varie exponentiellement en fonction du temps selon :

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

$I(t)$ , intensité lumineuse, émise à l'instant  $t$ , est proportionnelle au nombre de photons émis à cet instant  $t$  pour l'ensemble des molécules excitées. En pratique, on mesure le nombre de photons émis entre  $t$  et  $t + \Delta t$ . A tout instant  $t$ , l'histogramme des probabilités d'émission d'un seul photon entre  $t$  et  $t + \Delta t$  donnera une image du déclin de fluorescence. Un appareil spécialisé couplé à un photomultiplicateur rapide permet de déterminer l'instant d'émission du « premier photon » à partir de l'instant de production de l'éclair laser. Un analyseur multicanaux compte le nombre de « premiers photons » pour tout intervalle de temps, gradué en canaux. En répétant les expériences, on établit alors la probabilité d'émission d'un seul photon pour tout intervalle de temps. Un traitement informatique des données permet d'effectuer des régressions exponentielles pouvant aller jusqu'à une somme de trois exponentielles. Ces modèles sont obtenus par reconvolution avec l'éclair laser et intègrent l'effet laser sur le déclin. Les mesures sont très précises et portent sur des déclins très rapides ( $< 1\text{ ns}$ ).

Les courbes de déclin de fluorescence de molécules de courtes durées de vie, électriquement excitées par des impulsions lumineuses, sont déformées par la réponse temporelle de l'appareillage électronique, la durée de l'éclair (environ 8 ps) étant ici négligeable. Ainsi, on observe la conjugaison de cette dernière, appelée éclair (ou "flash"), et du déclin de fluorescence de l'espèce en solution. C'est la relation de convolution suivante qui représente l'évolution temporelle du système réactif :

$$f_{\text{exp}}(t) = E_c(t) \otimes f_{\text{th}}(t) = \int_0^t E_c(t-\tau) f_{\text{th}}(\tau) d\tau$$

avec :

$f_{\text{exp}}(t)$  = courbe du déclin observé,

$E_c(t)$  = fonction de l'appareil (flash) et réponse de l'électronique,

$f_{\text{th}}(t)$  = réponse du système fluorescent.

En effectuant une transformation de FOURIER (TF) de l'équation ci-dessus, on obtient :

$$\text{TF}( f_{\text{exp}}(t) ) = \text{TF}( E_c(t) ) \cdot \text{TF}( f_{\text{th}}(t) )$$

d'où  $\text{TF}(f_{\text{th}}(t))$ , et par transformée inverse, l'expression de  $f_{\text{th}}(t)$ . Mais pour effectuer un tel calcul, il faudrait connaître, à tout temps  $t$ , les fonctions  $E_c(t)$  et  $f_{\text{exp}}(t)$ . Or expérimentalement la valeur obtenue dans un canal est en fait la valeur intégrée sur l'ensemble de ce canal. De plus des erreurs de troncature apparaissent, du fait que l'enregistrement est non périodique et limité dans

le temps. L'exploitation de cette technique, mathématiquement rigoureuse, sur des données expérimentales s'avère ainsi très délicate.

Une autre technique plus sûre est celle de la reconvolution qui prend en compte la nature discrétisée des signaux. Dans cette technique, on considère une fonction hypothétique  $f_{th}(t)$  sous une forme analytique choisie a priori et possédant plusieurs paramètres. On calcule alors le produit de convolution précédent pour une valeur de départ des paramètres, que l'on compare au signal observé. On ajuste ensuite progressivement les paramètres par une méthode d'optimisation comme nous allons le décrire dans le cas d'un signal de type monoexponentiel.

La fonction  $f_{th}(t)$  choisie est alors de la forme :

$$f_{th}(t) = c_1 \exp(-t/\tau)$$

avec :

$c_1$  = coefficient pré-exponentiel,

$t$  = temps,

$\tau$  = durée de vie de la molécule fluorescente.

L'optimisation se fait par la recherche de  $\tau$  par la méthode du nombre d'or alors que  $c_1$  est calculé analytiquement. La fonction optimisée est le  $\chi^2$ , prenant une valeur voisine de 1 quand l'optimum est atteint et qui est définie de la façon suivante :

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N_p} \left[ \frac{C_1 * U_1(i) - H(i)}{\sigma(i)} \right]^2}{N_p}$$

avec :

$U_1(i)$  = valeur de la fluorescence calculée par convolution pour le canal  $i$ ,

$H(i)$  = valeur de la fluorescence expérimentale au canal  $i$ ,

$N_p$  = nombre de canaux,

$\sigma_i^2$  = déviation standard, égale à 1 si  $H(i) = 0$  et à  $H(i)$  pour les autres valeurs.

$C_1$  est calculé en résolvant l'équation  $\frac{d\chi^2}{dt} = 0$

Pour tenir compte de la discrétisation du signal, différentes méthodes numériques sont décrites [BOUCHY, 1982].

Dans le cas d'un signal de type biexponentiel, le principe de la méthode est le même et conduit à la détermination des paramètres  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $C_1$ ,  $C_2$  de la fonction :

$$f_{th}(t) = C_1 \exp(-t/\tau_1) + C_2 \exp(-t/\tau_2)$$

### **A1.3) Polarisation de fluorescence**

Lorsqu'une population de molécules fluorescentes est éclairée par un faisceau de lumière incidente polarisée verticalement (faisceau traversant un polariseur) et de longueur d'onde appropriée, seules les molécules correctement orientées sont excitées. Si ces molécules excitées peuvent tourner rapidement et indépendamment les unes des autres sur elles-mêmes, elles

prennent des orientations quelconques au cours de leur désexcitation, et la lumière émise n'a pas de plan de vibration privilégié, elle n'est pas polarisée. Au contraire, si les molécules excitées sont soumises à une certaine contrainte stéréochimique, elles tournent plus lentement sur elles-mêmes, la lumière émise par fluorescence est alors partiellement polarisée. Le degré de polarisation de fluorescence, exprimé par l'anisotropie de fluorescence ( $\langle r \rangle$ ) peut être calculé et permet d'apprécier le degré de fluidité d'une membrane par exemple.

En fonction de la cohésion du milieu, la sonde sera plus ou moins mobile entraînant une dépolarisation plus ou moins importante de la lumière. Cette dépolarisation est en relation avec l'amplitude des mouvements de la sonde et sera d'autant plus importante que la probabilité du mouvement est élevée. L'analyse des composantes de l'intensité de fluorescence émise (à 90° de l'excitation), polarisée respectivement parallèlement ( $I_{//}$ ) et perpendiculairement ( $I_{\perp}$ ) à la direction de polarisation de la lumière excitatrice, permet de déterminer un paramètre variant de manière inverse à la fluidité : l'anisotropie de fluorescence émise  $\langle r \rangle$ .

L'anisotropie  $\langle r \rangle$  de la fluorescence émise est déterminée de la façon suivante :

$$\langle r \rangle = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + 2 I_{\perp})$$

avec  $I_{//}, I_{\perp}$  : intensités de fluorescence de l'échantillon marqué.

La turbidité des échantillons provoque une diffusion parasite de la lumière qui est à l'origine d'une erreur systématique. C'est pourquoi une mesure de  $I_{//}$  et de  $I_{\perp}$  est effectuée sur un échantillon sans marqueur (blanc) avant chaque analyse de l'échantillon marqué. En tenant compte du blanc :

$$I_F = (I_{F//} - I_{B//}) + 2 (I_{F\perp} - I_{B\perp})$$

avec  $I_{B//}, I_{B\perp}$  : intensités mesurées avec le blanc

Le degré de polarisation moyen P est déterminé de la façon suivante :

$$P = 3 \langle r \rangle / (2 + \langle r \rangle).$$

Ces paramètres peuvent être reliés en première approximation à la viscosité donc à l'organisation moléculaire du milieu selon l'équation de Perrin :  $1/\langle r \rangle = 1/\langle r_0 \rangle \cdot (1 + \tau RT/V\eta)$

avec	$r_0$	anisotropie de polarisation en absence de tout mouvement
	$\tau$	durée de vie
	R	constante des gaz parfaits
	T	température absolue
	$\eta$	viscosité du milieu
	V	volume moléculaire

L'application de cette loi est limitée lors de l'étude de membranes biologiques (Dale, 1987) pour les raisons suivantes :

- Molécules non sphériques
- Diffusion restreinte des sondes
- Membranes hétérogènes
- Inconstance des paramètres (constantes) de l'équation de Perrin.

Le paramètre  $\tau$  peut également varier en fonction de l'environnement de la sonde et la mesure de la durée de vie se réalise dorénavant en parallèle avec la mesure de  $\langle r \rangle$ .

Dans une solution fluide, les molécules excitées à l'aide d'une lumière polarisée ont le temps de se réorienter après excitation, et une émission de fluorescence faiblement polarisée est obtenue. Par contre, si la viscosité de la solution est élevée, la molécule excitée ne pourra plus se réorienter totalement pendant sa durée de vie et l'on peut observer alors des anisotropies particulièrement élevées.

Cependant, les sondes fluorescentes ne donnent d'informations que sur leur environnement immédiat. En fonction des phénomènes que l'on veut appréhender, il est important de choisir les marqueurs selon leur localisation dans la membrane. D'autres critères devront également figurer dans le choix d'une sonde utilisée en polarisation de fluorescence.

Le choix des sondes fluorescentes doit tenir compte des caractéristiques spectrales et de certains paramètres à maîtriser (André, 1983)

- Les propriétés spectroscopiques,
- Les interactions avec les constituants membranaires,
- Les perturbations éventuelles provoquées par l'introduction des sondes dans la membrane,
- La localisation au sein de la membrane,
- Les interférences possibles avec les molécules exogènes,
- La stabilité des sondes.

Article b:

**Interaction of a Phosphatidylcholine Derivative of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) with Intact Living Cells : Steady-State Fluorescence Polarization and Phase Fluorometry Studies.** L Miccoli, C Szczepaniak, D Dumas, S Savonnière, S Muller, MC Carré and M Donner. *Journal of Fluorescence* (1993) **3,4**, 251-255.

## **ANNEXE 2 : LE FRAGILIMETRE**

Article c:

**Development on an automated, slow dialysis device for measuring erythrocyte osmotic resistance.** J Didelon, T Gigout, D Dumas, JC Humbert, G Gauchois, M Gentils, JF Stoltz. *Innovation and technology in biology and Medicine* (1996) **17**, 4, 337-351.

### **A3) Chambre de mesures**

La chambre de mesure dont le dessin mécanique (vues de dessus) figure sur la page suivante a été réalisée par J.Didelon.

# Interaction of a Phosphatidylcholine Derivative of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) with Intact Living Cells: Steady-State Fluorescence Polarization and Phase Fluorometry Studies

L. Miccoli,<sup>1</sup> C. Szczepaniak,<sup>1</sup> D. Dumas,<sup>2</sup> S. Savonnière,<sup>1</sup> S. Muller,<sup>1</sup> M. C. Carré,<sup>1</sup> and M. Donner<sup>1</sup>

Received October 18, 1993

The potential interest of DPH-PC was checked with a macrophagic cell line (P388D1). The uptake of DPH-PC was associated with a rapid increase in both fluorescence intensity and a slow decrease in anisotropy values. A flow cytometry comparative study with DPH revealed in both cases the existence of two cell subpopulations with different labeling levels. The analysis of fluorescence decay of DPH-PC showed two components. The fractional intensity of the main component (9.7 ns) is higher than 92%. The Lorentzian distribution of the main lifetime presents an important homogeneity. The observation that an increase in temperature induced a decrease in steady state anisotropy values but did not affect the lifetime suggests that the anisotropy variations effectively reflect modifications in the cohesion of probe micro-surroundings. A transmembrane diffusional phenomenon of a fraction of fluorescent phospholipids (20%) was suggested by a study with a nonpermeant membrane quencher. The transmembrane diffusion was confirmed by extraction of the phospholipid analog with fatty acid free BSA. The use of inhibitors of endogenous phospholipase A2 showed a progressive hydrolysis of the fluorescent phospholipid. Nevertheless, the hydrolysis can be neglected in the case of short term interactions with cells (< 30 min). Therefore, it can be assumed that DPH-PC can be used as a membrane probe.

**KEY WORDS:** 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH); living cells; phosphatidylcholine; phase fluorometry; steady-state fluorescence.

## INTRODUCTION

DPH has been widely used as a fluorescent probe for assessment of the dynamic properties of biological membranes [10]. Unfortunately, in the case of intact cells, labeling with DPH is associated with a progressive

incorporation through the plasma membrane into intracellular membranes [5]. So this probe gives only average information on the whole lipid regions of the cells. In the past years, fluorescent derivatives of phospholipids have been proposed to be able to probe the plasma membrane. In the present work, we were concerned mainly with 1-palmitoyl-2-diphenyl-1,3,5-hexatrienylpropionyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPH-PC), where a DPH moiety replaces a hydrocarbon chain [6,8]. We focused our study on this probe because phospholipids are asymmetrically distributed over the two halves of the membranes of most cell types [3,9,12] and DPH-PC could

<sup>1</sup> Groupe de Recherches sur les Interactions Moléculaires aux Interfaces, -INSERM-CO 10, Brabois, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France.

<sup>2</sup> Laboratoire d'Hémorhéologie-Hématologie, Faculté de Médecine, Brabois, 54500, Vandoeuvre les Nancy, France.



probe one of the two leaflets of the plasma membrane. Using a macrophagic cell line (P388D1), we carried out steady-state and dynamic fluorescence measurements to determine the behavior of DPH-PC molecules with regard to its distribution in a cell population, transverse diffusion rate in plasma membrane [1,7,11], and membrane enzymatic metabolism [2,13].

## MATERIALS AND METHODS

**Fluorescent Probes and Labeling.** DPH-PC stock solution (Lambda, Graz, Austria) in *N,N'*-dimethylformamide (DMF) and DPH (Aldrich, St Quentin Fallavier, France) in tetrahydrofuran (THF) were stored at  $-18$  and  $4^{\circ}\text{C}$  respectively. For labeling,  $1\ \mu\text{l}$  of probe solution was added to  $1\ \text{ml}$  of cell suspension ( $3 \times 10^6$  cells/ml) in a phosphate buffer (PBS; pH 7.2) and cells were incubated for 30 min with DPH-PC and 20 min with DPH. In quenching experiments, bixin-glucosamine (BGA) synthesized in the laboratory was dissolved at a concentration of  $3\ \text{mM}$  in THF and at a final concentration of  $15\ \mu\text{M}$  and added to the labeled cell suspensions.

**Study of Phospholipid Translocation.** Prior to labeling, the cells were incubated with diisopropyl fluorophosphate (DFP) ( $5\ \text{mM}$  final concentration; 20 min) or with *N*-ethylmaleimide (NEM) ( $5\ \text{mM}$  final concentration; 15 min). In another series of experiments, translocation of the probe to the inner layer was quantified by the back-exchange technique using fatty acid-free serum albumin (BSA) [1].

**Fluorescence Instrumentation and Analysis.** Steady-state fluorescence anisotropy and fluorescence intensity were measured with a continuous-excitation instrument (Fluofluidimètre, Affibio, Villers les Nancy, France). Excitation was performed at  $365\ \text{nm}$  when emitted light was determined at  $425\ \text{nm}$ .

Excited-state lifetimes ( $\tau$ ) were determined by the modulation technique with a multifrequency phase fluorometer, SLM AMINCO 48000S (SLM Instruments, Urbana, IL). A large range of frequencies, between 15 and 180 MHz, was used for the lifetime measurements. The data were analyzed with both exponential and continuous components models. The continuous model is a distribution of the lifetime components values which are characterized by a "Lorentzian" form centered on a lifetime with a full width at half-maximum parameter (FWMH). The mean-square test and the chi-square test were used to estimate the goodness of the determination.

The distribution of DPH-PC at the single-cell level was analyzed with a flow cytometer ATC3000 (Bruker Spectrospin, Wissembourg, France) equipped with an

argon laser 2025 (Spectra-Physics, Mountain View, CA). For these experiments, the cells were labeled with variable amounts of probe solution ( $0.5$  to  $8\ \mu\text{M}$  for DPH-PC,  $0.5$  to  $2\ \mu\text{M}$  for DPH) at  $25^{\circ}\text{C}$ . The analysis was done on 30,000 cells with excitation laser UV light ( $357\ \text{nm}$ ,  $100\ \text{mW}$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Incorporation of DPH-PC ( $4\ \mu\text{M}$ ) at 4, 25, and $37^{\circ}\text{C}$ in P388D1 Cells

The kinetics of incorporation of DPH-PC in P388D1 cells is fast, whatever the temperature. After 2 min of labeling, the fluorescence intensity level corresponds to more than 50% of the final intensity and reaches a plateau after an incubation of about 20 min. As regards the evolution of fluorescence anisotropy  $\langle r \rangle$  during the cell labeling, the values are constant after about 30 min of incorporation, and the following experiments were carried out under these conditions.

### Distribution of the DPH-PC in Cell Populations

The fluorescence distribution of a cell population labeled with DPH-PC and DPH was analyzed by flow cytometry (Fig. 1). When the DPH-PC concentration increases, a modification of the histogram shape as well as a shift toward high fluorescence levels was noted. For a low concentration of DPH-PC ( $0.5\ \mu\text{M}$ ), there was only one homogeneous, slightly labeled cell population. On the other hand, at higher concentrations ( $2$  and  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 1A), a second highly labeled cell population appeared, which increased with DPH-PC concentration. A comparative study was performed with DPH. The evolution of the fluorescence distribution was quite similar for equivalent concentrations of fluorophore (Fig. 1B). Thus, the binding of the DPH moiety on the phospholipid does not induce a different macroscopic distribution of the probe in a cell population.

### Steady-State and Dynamic Fluorescence

Table I shows the variations in steady-state fluorescence anisotropy and lifetime determinations with temperature. It should be noted that  $\langle r \rangle$  values increased when the temperature increased.

Concerning lifetime measurements, the best fits were obtained with a biexponential analysis. DPH-PC decay is characterized by a main component of about  $9.7\ \text{ps}$  with a fractional intensity of 92% and a short component

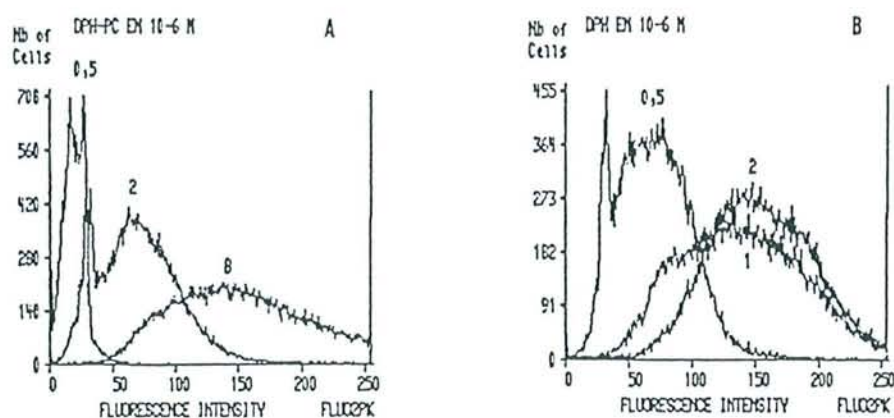


Fig. 1. Fluorescence distribution of a cell population labeled with various amounts of DPH-PC (A) and DPH (B).

Table I. Fluorescence Anisotropy, Discrete Values, and Lorentzian Distribution of the Fluorescence Lifetime of DPH-PC Incorporated in Cells

Temp. (°C)	$\langle r \rangle$	Lifetime exponential analysis (ns)			Lifetime Lorentzian distribution (ns)				
		$\tau_1$	Fl. ( $\tau_1$ ) <sup>a</sup>	$\tau_2$	$\tau_1$	Fl. ( $\tau_1$ ) <sup>a</sup>	$\tau_2$	FWMH	
								$\tau_1$	$\tau_2$
4°C	0.300	9.63	92.1	0.90	9.67	92.0	0.95	0.002	1.01
25°C	0.250	9.72	92.5	1.03	9.81	92.4	0.92	0.001	1.34
37°C	0.235	9.68	94.6	1.10	9.60	92.5	1.30	0.01	2.20

<sup>a</sup> FI = Fractional Intensity (%)

close to 1 ns. The long lifetime component corresponds to DPH-PC incorporated in the plasma membrane of the cells and the short lifetime, rather, corresponds to DPH-PC molecules present in a very polar environment within the membrane surface or at the interface between two domains [4].

The continuous Lorentzian distribution analysis of the decay is in agreement with discrete analysis. This analysis gives another parameter (FWMH) that allows the appreciation of the homogeneity of the two lifetime components' distribution. The FWHM of the main component is very low and means a high homogeneity in the lifetime component value, while the FWHM of the second component reflects heterogeneity in the distribution.

Regarding the values of the long lifetime component, they give information on the location of the probe within the membrane. The values of  $\tau_1$  are included between the value found for DPH (11.5 ns) and that for its cationic derivative TMA-DPH (8.6 ns) [11]. The data suggest that the fluorophore is located in an intermediate

area of the plasma membrane between those characterized by TMA-DPH (polar areas) and DPH (nonpolar areas). The  $\langle r \rangle$  values support this hypothesis (data not shown) and confirm the assumption of Parente *et al.* that the fluorophore part of DPH-PC is located much farther down in the lipid hydrocarbon region of the bilayer than the carbon close to the glycerol backbone [8].

Finally, it is important to note that the values of both lifetime components as well as their fractional intensities are independent of the temperature. Thus, it may be assumed that steady-state anisotropy variations represent a real modification in the cohesion of the probe surroundings.

#### Partitioning of DPH-PC in Cells

To verify if the whole DPH-PC molecule is located in the plasma membrane, experiments with a nonpermeant membrane quencher (BGA) were carried out. Figure 2 shows that immediately after the addition of the

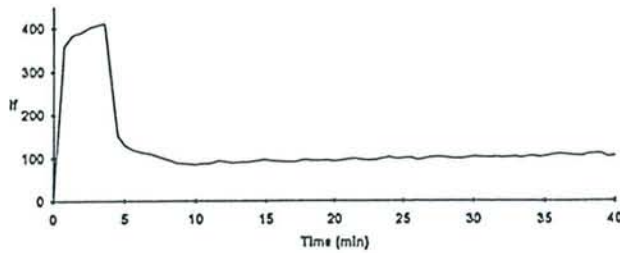


Fig. 2. Effect of BGA on the fluorescence intensity of a DPH-PC-labeled cell suspension.

quencher ( $15 \mu\text{M}$ ) to the cells previously labeled at  $25^\circ\text{C}$  for 2 min with DPH-PC, the fluorescence intensity decreases very rapidly and reaches a plateau after 5 min,

indicating that a constant amount of probe molecules (about 20%) was not quenched. The proportions of unquenched probe molecules varied weakly (20 to 27%) when the temperature range was  $4\text{--}37^\circ\text{C}$ . Therefore, it can be assumed that about 80% of the fluorescent phospholipid was in the plasma membrane.

#### Kinetics of Outside-Inside Translocation of DPH-PC in P388D1 Cells

The existence of transmembrane diffusion was confirmed by the back-exchange technique using cell labeling for various periods (0–6 h). Figure 3A shows that the percentage of probe molecules that were not extracted by BSA increased with time and with temperature. The pretreatment of cells with NEM, which is known

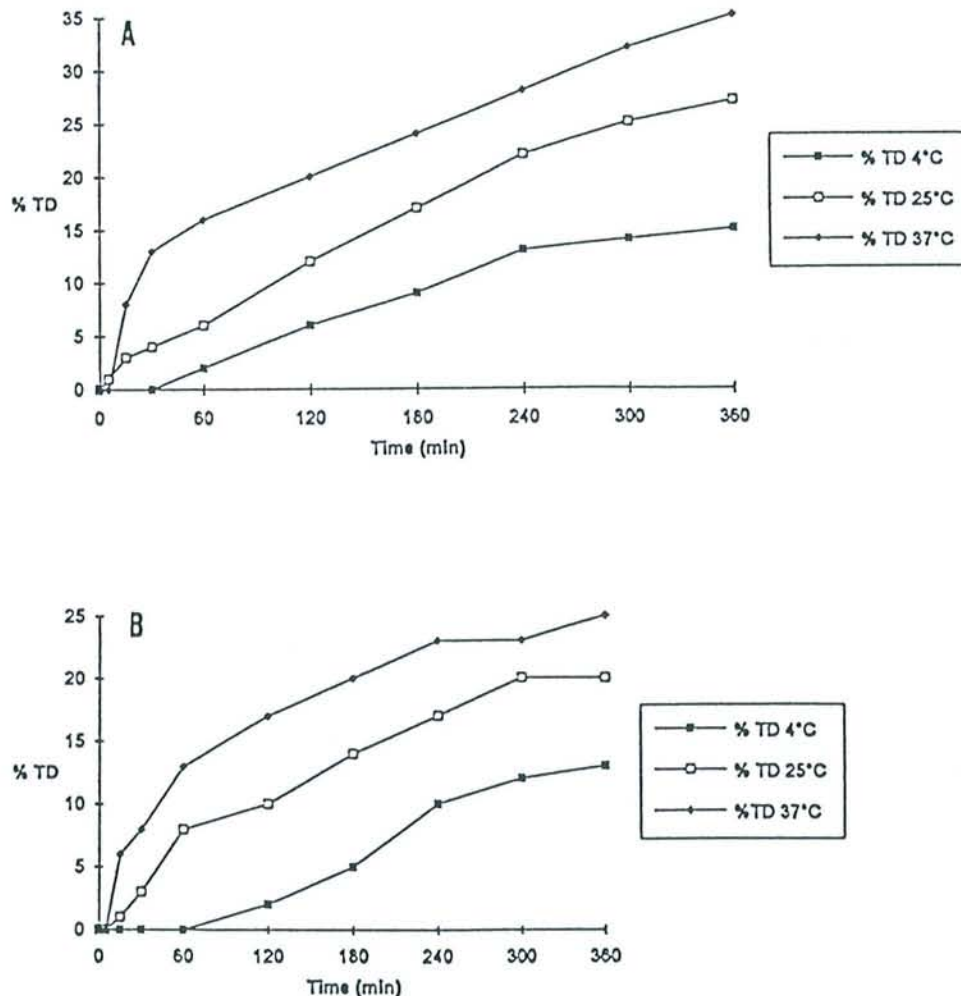


Fig. 3. Evolution of the percentage of transmembrane diffusion of the DPH-PC in P388D1 cells, without (A) or with (B) pretreatment with DFF as a function of time and temperature.

Table II.  $\langle r \rangle$  Value (Before and After Extraction) Evolutions of Labeled Cells During Translocation Experiments With or Without DFP Pretreatment of the Cells

Labeling time	$\langle r \rangle$					
	Before extraction			After extraction		
	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C
60 min						
- DFP	0.300	0.255	0.235	0.300	0.250	0.230
+ DFP	0.300	0.260	0.242	0.300	0.255	0.235
180 min						
- DFP	0.295	0.245	0.225	0.290	0.235	0.215
+ DFP	0.300	0.255	0.240	0.290	0.250	0.235
360 min						
- DFP	0.290	0.237	0.215	0.285	0.225	0.208
+ DFP	0.300	0.250	0.235	0.290	0.245	0.235

to be an inhibitor of phospholipid translocase, did not show any significant effects on the translocation rate, suggesting that the phenomenon is not protein dependent.

In another series of experiments, it was considered that DPH-PC might be the target of membrane enzymatic metabolism as native phospholipids. Thus, a study with another inhibitor, DFP, was carried out to display the enzymatic activity related to phospholipase A2 (PLA2), which could cleave the molecule and induce release of free DPH.

Preincubation of the cells with DFP (Fig. 3B) demonstrated a marked effect on the outside-inside diffusion rate, which was lower than that observed with cells not treated with DFP, suggesting the possible involvement of a membrane enzymatic protein responsible for DPH-PC cleavage, liberating the fluorophore (DPH).

The hypothesis is confirmed in Table II, which summarizes the results of the experiments before BSA extraction and after extraction with or without pretreatment with DFP. Before extraction of the DPH-PC pres-

ent in the outer leaflet and in the absence of DFP, it must be noted that  $\langle r \rangle$  regularly decreased as a function of time and the decrease is more important at 37°C. On the other hand, following pretreatment with DFP,  $\langle r \rangle$  remained constant at 4°C and decreased slightly at 25 and 37°C, suggesting that DFP treatment inhibited enzymatic activity. It is worth noting that pretreatment of the cells with DFP had no significant effect when cells were taken after a 30-min labeling with the fluorescent probe, which corresponds to the usual incorporation conditions of the probe.

## CONCLUSION

From this work, it can be assumed that DPH-PC can be used as a membrane probe. However, the interpretation of modifications of steady-state or dynamic properties in terms of membrane cohesion of living cells must also take into account variations in transmembrane diffusion which may be associated with cell function or pathological situations. In the same way, it is necessary to check the activity of endogenous phospholipases.

## REFERENCES

1. W. L. Bergman *et al.* (1984) *Biophys. Biochim. Acta* 772, 328-336.
2. M. Colletu *et al.* (1991) *Chem. Phys. Lipids* 57, 29-37.
3. P. F. Devaux (1991) *Biochemistry* 30, 1163-1173.
4. G. Ferreti *et al.* (1993) *Membr. Biochem.* 10, 17-27.
5. D. Grunberger *et al.* (1982) *Biophys. Biochim. Acta* 688, 764-774.
6. C. G. Morgan *et al.* (1982) *Biophys. Biochim. Acta* 692, 196-201.
7. G. Morrot *et al.* (1988) *Biochemistry* 28, 3456-3462.
8. R. A. Parente *et al.* (1985) *Biochemistry* 24, 6178-6185.
9. J. Rothman *et al.* (1977) *Science* 195, 743-753.
10. M. Shinitzky (1978) *Biophys. Biochim. Acta* 515, 367-394.
11. C. Szczepaniak *et al.* (1991) *IVème Réunion du Groupe d'Etude des Interactions Molécules Membranes (GEIMM)*, Strasbourg, Nov. 20-22, abstract.
12. A. J. Verkleij *et al.* (1973) *Biophys. Biochim. Acta* 323, 178-193.
13. R. L. Wykle *et al.* (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 526-537.

## CONCEPTION D'UN APPAREIL AUTOMATIQUE DE MESURE DE LA FRAGILITE OSMOTIQUE DE L'HEMATIE PAR DIALYSE LENTE

### DEVELOPMENT OF AN AUTOMATED, SLOW DIALYSIS DEVICE FOR MEASURING ERYTHROCYTE OSMOTIC RESISTANCE

J. DIDELON, T. GIGOUT, D. DUMAS, J.C. HUMBERT,  
GAUCHOIS G., M. GENTILS, J.F. STOLTZ

Laboratoire d'Hématologie EA1728, Faculté de Médecine, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

#### Correspondance et tirés à part :

J. DIDELON, Laboratoire de Réadaptation et d'Appareillage, Faculté de Médecine, 35 rue Lionnois, 54000 Nancy, France.

Remerciements : Projet financé par un Contrat Régional Lorrain (Programme GBM - Ingénierie de la Santé).

#### RESUME

La connaissance des propriétés physiques de la membrane érythrocytaire et en particulier de sa résistance osmotique aux solutions hypotoniques, présente un intérêt diagnostique pour le clinicien. En effet, de nombreuses pathologies hémolytiques influencent cette résistance (maladies hémolytiques auto-immunes, sphérocytoses héréditaires, ...). Quelques appareils permettent d'étudier les propriétés rhéologiques de la membrane, mais ils restent encore du domaine de la recherche car ils se révèlent difficiles d'utilisation en routine. Aucun cependant ne réalise spécifiquement la mesure de la résistance des membranes jusqu'à leur rupture et seule la méthode manuelle dite de DACIE est utilisée aujourd'hui dans les laboratoires d'Hématologie. Dans ce travail les auteurs proposent de mesurer la résistance des membranes à l'hémolyse à l'aide d'un appareil de conception nouvelle (Fragilimètre). Son principe consiste à faire varier progressivement la force ionique d'une suspension d'hématies, de 0.154 M à 0.025 M NaCl. La variation de la pression osmotique engendrée au niveau de la cellule provoque l'ouverture de pores par lesquels s'échappe l'hémoglobine. La mesure de l'intensité de lumière transmise renseigne sur le phénomène. L'expérience, entièrement automatisée, est réalisée en moins de 20 minutes. Les résultats obtenus informent sur la résistance de la membrane. Les déterminations des transmissions initiale à 50 % et totale permettent d'apprécier, comparativement à la technique de DACIE, les caractéristiques de l'hémolyse. La validation de la méthode a porté sur l'analyse d'échantillons de sang témoins prélevés depuis moins de 6h et/ou incubés 24h à 37°C afin de les fragiliser. La fragilisation des hématies par incorporation d'hémisuccinate de cholestérol a également été étudiée.

#### MOTS CLES :

HEMATIES, FRAGILITE OSMOTIQUE, HEMOLYSE, DEFORMABILITE.

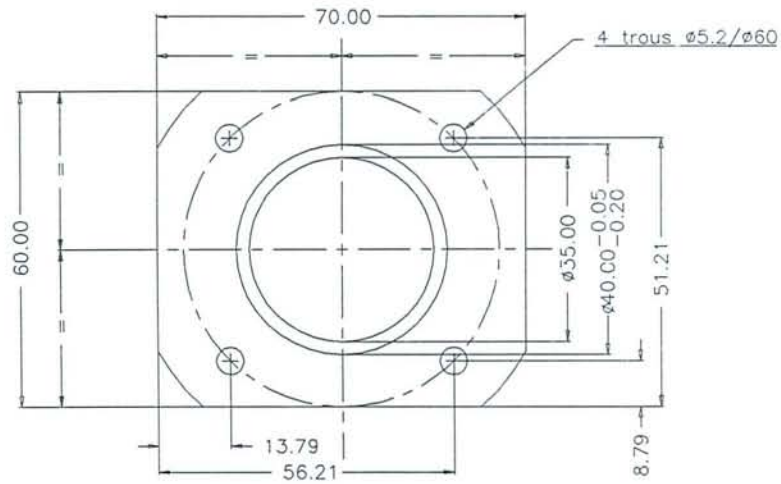
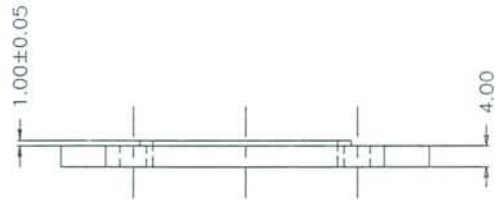
#### ABSTRACT

Knowing the mechanical properties of the erythrocyte membrane, and its osmotic resistance to hypotonic solutions in particular, is of great diagnostic interest to clinicians. Indeed, a number of haemolytic pathologies affect that osmotic resistance (autoimmune haemolytic disease, hereditary spherocytosis, ...). A few devices on the market make it possible to study the rheological properties of the erythrocyte membrane, but they are experimental and difficult to use as routine. But none of them specifically measures the membrane resistance to rupture and only the so-called DACIE's method has been used in the haematology laboratory to date. In this study, the authors set out to measure the resistance of membranes to haemolysis, using a newly designed device (Fragilimeter). Its principle consists in gradually varying the ionic strength of a diluted erythrocyte suspension, from 0.154 M to 0.025 M. The osmotic pressure variation produced at the cellular level induces the opening of pores through which haemoglobin is released. Measuring the transmitted light intensity provides information on the phenomenon. This entirely automated experiment takes less than 20 minutes. The results obtained provide direct information on membrane resistance. Determining baseline, 50% and total transmission permits assessing the haemolytic characteristics, comparatively as DACIE's method. Methodological validation involved analysing control blood samples collected less than 6h before and/or incubated for 24 H at 37° C so as to fragilise them. Erythrocyte fragilisation by cholesterol hemisuccinate incorporation has also been studied.

#### KEY WORDS :

ERYTHROCYTE, OSMOTIC FRAGILITY, HEMOLYSIS, CELL DEFORMABILITY.

2



3



Ra3,2	FRAGILITE 02	TOLERANCE GEN.	
		$\pm 0,1$	
ECHELLE : 1		ETUDIE Par: Didelon J.	
	INSERM - U284 - A.T.	Le: 01/12/94	
A 3	N? Projet: DD94	N? Dessin: DD-003	00

Ra3,2	FRAGILITE 02	TOLERANCE GEN.	
		$\pm 0,1$	
ECHELLE : 1		ETUDIE Par: Didelon J.	
	INSERM - U284 - A.T.	Le: 01/12/94	
A 3	N? Projet: DD94	N? Dessin: DD-004	00

## **A4) Physique des gaz et metrologie**

### **A4.1) Généralités**

L'échange de molécules gazeuses à travers des membranes perméables (respiration) est un phénomène physique essentiel au maintien de la vie. Les molécules gazeuses, en déplacement perpétuel, entrent en collision de façon aléatoire les unes avec les autres ainsi qu'avec diverses surfaces.

Trois notions assez intuitives découlent de la nature des gaz.

- 1) Le gaz occupe tout le volume qui lui est offert. Le comportement du gaz dépend de ce volume et du nombre de molécules gazeuses présentes.
- 2) Le gaz exerce une pression à l'intérieur de ce volume. Cette pression est la conséquence du choc des molécules contre les parois de l'enceinte.
- 3) Un gaz est caractérisé par sa température, car le mouvement des molécules est source de chaleur.

Les gaz se distinguent des autres formes de matière (solide et liquide) par leur capacité à se dilater sans limite de façon à occuper tout l'espace disponible et à exercer une pression uniforme sur toutes les surfaces. Cette propriété est très importante et participe au gradient de pression partielle en oxygène. La connaissance de certaines propriétés physiques des gaz est essentielle pour comprendre leur comportement. En voici citées quelques-unes avec les unités associées :

- *Le volume* correspond à l'espace occupé par un gaz et se mesure en centimètres cubes (cc) ou en millilitres (mL).
- *La pression* est définie mathématiquement comme une force s'exerçant sur une unité de surface. Le résultat s'exprime souvent en millimètres de mercure (mm Hg). L'échelle de mercure classique est connue sous le nom d'échelle de Torricelli ; l'unité de cette échelle (mm Hg) est souvent appelée Torr.

Si l'on veut évaluer le comportement de différents gaz, il est nécessaire de connaître la quantité de gaz (nombre de molécules) dans l'échantillon. Bien que de petite taille, les molécules gazeuses ont nécessairement une masse (ou un poids en fonction de la pesanteur). La masse d'une quantité déterminée de gaz est définie par le nombre d'Avogadro ( $6,023 \times 10^{23}$  molécules correspondant à une molécule gramme (poids atomique)).

### **A4.2) Terminologie**

Hypoxémie et hypoxie : certains traités emploient ces mots indifféremment, d'autres soulignent une différence.

#### **Hypoxie**

Terme plus général que l'hypoxémie. Décrit une altération de la distribution tissulaire de l'oxygène. Elle tient compte du débit cardiaque et de la captation de l'oxygène au niveau des tissus.

#### **Hypoxémie**

Traditionnellement, l'hypoxémie est un manque relatif d'O<sub>2</sub> dans le sang, autrement dit, il s'agit d'un niveau d'oxygénation du sang artériel inférieur à la valeur normale. L'hypoxémie est définie comme une diminution de la PaO<sub>2</sub>, de la SaO<sub>2</sub> ou du taux d'Hb dans laquelle la quantité d'O<sub>2</sub> du sang (CaO<sub>2</sub>) est le déterminant principal de la gravité clinique (Martin, 1992)

L'hypoxémie ne s'accompagne pas nécessairement d'une hypoxie tissulaire, de même qu'une hypoxie tissulaire peut être associée à une PaO<sub>2</sub> normale.

#### A4.3) Valeurs mesurées

##### **Pression partielle des gaz**

La loi de Dalton résume un très important principe de physique concernant les mélanges gazeux : *dans un mélange gazeux, la pression totale du mélange est égale à la somme des pressions partielles des différents composants*. Chaque gaz étant considéré comme agissant seul, sa contribution à la pression totale dépend de sa fraction (ou %) par rapport à la totalité du mélange gazeux.

##### **Pression de vapeur d'eau**

Sous sa forme gazeuse, l'eau s'appelle vapeur d'eau ou eau moléculaire et correspond à l'humidité. Quand il y a de la vapeur d'eau dans un mélange gazeux, elle obéit à la loi des gaz et exerce une pression partielle. Ainsi le gaz alvéolaire est saturé en vapeur d'eau (100 % d'humidité) à la température du corps. Pour les mesures cliniques, habituellement réalisées à 37°C dans les conditions standard, la pression saturante de la vapeur d'eau correspond à 47 mm Hg.

##### **Solubilité d'un gaz**

Si une membrane sépare un milieu gazeux d'un milieu liquide, le degré de solubilité du gaz dans le liquide va intervenir sur la diffusion. La *solubilité* représente la quantité des molécules gazeuses qui se dissolvent dans le liquide. Le nombre des molécules gazeuses entrant et sortant du liquide finit par s'égaliser : il s'établit alors un équilibre dynamique. Les pressions partielles dans la solution sont alors égales aux pressions partielles dans l'atmosphère.

##### **Coefficient de diffusion**

C'est la distance moyenne diffusée par unité de temps ( $DO_2 = 2,6 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/sec dans l'eau à 25 °C.).

##### **Diffusivité**

C'est la quantité (dQ) passant à travers une aire dydz dans la direction dx en un temps dt où dc/dt est l'augmentation en concentration de volume dans la direction x selon :

$$dQ/dt = -\Delta (dc/dx) dydz$$

##### **Perméabilité**

C'est le produit du coefficient de diffusion D et de la solubilité.

#### A4.4) Taux d'oxygène dans le sang

Trois termes différents sont employés pour décrire les taux d'O<sub>2</sub> dans le sang : *pression d'oxygène, saturation en oxygène et concentration en oxygène*. Ces termes sont définis ci-après.

**Pression d'O<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>** : Les molécules d'O<sub>2</sub> dissoutes dans le plasma (c'est-à-dire non liées à l'hémoglobine) sont libres pour entrer en contact avec l'électrode sensible. Ce contact se communique comme une pression, la PO<sub>2</sub> désignée par PaO<sub>2</sub> dans le sang artériel. Une fois que les molécules d'O<sub>2</sub> sont liées à l'hémoglobine, elles n'exercent plus aucune pression. Etant donné que la PaO<sub>2</sub> ne représente que les molécules d'O<sub>2</sub> dissoutes dans le plasma, la PO<sub>2</sub> ne renseigne



donc pas sur la « quantité » d'O<sub>2</sub> dans le sang. Ce renseignement est fourni par la concentration en O<sub>2</sub>.

**Saturation en O<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub>** : Les sites de fixation de l'O<sub>2</sub> sont des groupements d'hème, éléments Fe<sup>++</sup> porphyriques de la molécule d'hémoglobine (noté Hb). Les sites de l'hème occupés par des molécules d'O<sub>2</sub> sont dits « saturés » d'O<sub>2</sub>. Le % de tous les sites de fixation de l'Hb en O<sub>2</sub> correspond au taux de saturation de l'hémoglobine en O<sub>2</sub> (SaO<sub>2</sub> dans le sang artériel).

**Concentration en O<sub>2</sub>, CaO<sub>2</sub>** : Ni la PO<sub>2</sub> dans le sang, ni la SaO<sub>2</sub> n'indiquent combien le sang contient d'O<sub>2</sub>. Cette teneur est donnée par la concentration en O<sub>2</sub>, exprimée en unités de mL d'O<sub>2</sub> par dL (ou 100 mL). Cette teneur comprend l'O<sub>2</sub> lié à l'Hb (composante 1) ainsi que l'O<sub>2</sub> dissous dans le plasma (composante 2) de l'équation de la CaO<sub>2</sub> :

$$CaO_2 = (\text{Hb} \times 1,34 \times SaO_2) + (0,003 \times PaO_2)$$

composante 1                      composante 2

Précisions : La composante 1 (quantité d'O<sub>2</sub> combiné à l'Hb) est le produit du taux d'Hb (Hb, en g/dL), du pouvoir oxyphorique de l'Hb (1,34 mL O<sub>2</sub>/g) et de la saturation de l'Hb en O<sub>2</sub> (SaO<sub>2</sub>). Cette équation peut être utilisée pour calculer la concentration en O<sub>2</sub> de tout échantillon de sang ou de plasma.

#### A4.5) Lois établies

##### **Flux moléculaire :**

Le flux d'oxygène (JO<sub>2</sub>) à travers une membrane d'une épaisseur d, avec α la solubilité et D le coefficient de diffusion est donné par JO<sub>2</sub> = D.α.ΔPO<sub>2</sub>/d, proportionnel à la différence de pressions en oxygène. On admet que le flux J est proportionnel à son gradient et pour une direction privilégiée, on peut écrire : J = - D dc/dx avec c le nombre de molécules par unité de volume et D une constante de proportionnalité (ou de diffusion).

##### Lois de Fick

La première loi de Fick décrit l'existence locale d'un gradient de concentration c, d'un vecteur densité de flux F de particules atteignant une surface S et qui dépend du coefficient de diffusion d'un gaz (coefficient de proportionnalité) D selon F = -D gradC.

La seconde loi de Fick concerne la variation de la quantité de soluté pendant le temps dt ce qui correspond également au produit : (volume de l'élément) x (variation de concentration en un point du volume pendant le temps dt). Si l'on désigne par S(x,t) et S(x,t+dt) les concentrations en un point d'abscisse x au temps t et dt, on a: dS/dt = - dJ/dx = D.d<sup>2</sup>.S/dx<sup>2</sup>.

##### Loi de Henry

Elle établit que la quantité de gaz dissoute dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle du gaz mis en présence de ce liquide.

##### Loi de Graham

Elle établit que la diffusibilité d'un gaz est inversement proportionnelle à la racine carrée de son poids moléculaire.

## **A5 : Microscopie quantitative (cytométrie par analyse d'images)**

### A5.1) Généralités

L'analyse d'images par ordinateur, très utilisée dans de nombreux domaines industriels peut être avantageusement appliquée à l'observation microscopique des cellules dans des situations biomédicales variées, dans les domaines de la biologie fondamentale, de la cancérologie, de l'hématologie. L'observateur humain n'appréhende l'information contenue dans une image que de manière subjective, qualitative et lente. C'est pourquoi le traitement et l'analyse des images apparaissent comme des outils permettant d'effectuer rapidement des mesures sur des images avec une grande fiabilité et un haut degré de résolution.

Les besoins de notre laboratoire s'expriment en termes correspondant à des activités de recherche et concernent :

- la détection de faibles niveaux de lumière de fluorescence (grande sensibilité),
- une importante résolution de l'image,
- un suivi en temps réel des divers phénomènes étudiés,
- la description quantitative des cellules endothéliales humaines (taille, forme...),
- la compréhension rationnelle des phénomènes traduits par leur image (cinétique cellulaire, diffusion d'oxygène).

Afin de satisfaire de tels besoins, le microscope peut être connecté, via un ordinateur capable de traiter et d'analyser les images des cellules ou des émissions de fluorescence. L'instrument de microscopie quantitative résultant doit donc, non seulement traiter des images en exploitant au mieux les possibilités technologiques, mais il doit aussi en extraire des mesures nombreuses, en évaluer la signification statistique et surtout permettre, à chaque instant de l'analyse, la comparaison entre l'observation visuelle directe de l'échantillon et les données qui en sont extraites.

Les étapes comportent successivement :

- l'acquisition des images à l'aide de photodétecteurs adaptés à la dynamique très large de luminosité et aux besoins en résolution spatiale élevée ;
- le prétraitement qui permet d'améliorer les contrastes de l'image et de calculer les paramètres photométriques de référence du fond ;
- la segmentation qui permet de sélectionner, parmi les points de l'image, ceux qui appartiennent à la cellule et aux organites cellulaires à caractériser ;
- la paramétrisation qui permet de calculer, pour chaque zone d'intérêt, des paramètres caractérisant sa forme, sa densitométrie, sa fluorimétrie ;
- le traitement des données qui permet d'extraire, parmi les multiples paramètres calculés sur les cellules d'une population, ceux qui représentent une variation significative dans le contexte de l'expérience réalisée (diffusion de l'oxygène, marqueur de l'hypoxie...).

### A5.2) Acquisition des images

Pour qu'elle puisse être traitée par un ordinateur, une image optique obtenue au travers d'un microscope, doit être mise sous forme d'un tableau de valeurs numériques, c'est-à-dire digitalisée. On entend alors par « acquisition » le processus permettant de disposer de l'image

microscopique au niveau de la mémoire de l'unité de calcul (ordinateur ou processeur d'image spécialisé).

Ce processus comporte :

- la capture d'image, réalisée par un capteur d'images photométrique transformant l'image microscopique photonique en un signal électrique ;
- la transmission du signal électrique de la caméra vers une carte d'acquisition selon un standard donné (vidéo)
- la conversion analogique / numérique du signal électrique en une matrice image numérique.

Le choix du capteur photométrique dépend des paramètres physiques de l'image microscopique à traiter (niveau de lumière, longueur d'onde dans le spectre, temps d'exposition) et des paramètres de l'analyse (nature et précision des paramètres à extraire...).

### **A5.3) Amélioration d'images**

Après une conversion analogique / numérique, l'image fournie par la caméra est disponible pour divers traitements. Les techniques d'amélioration des images constituent l'ensemble des procédés visant à renforcer la qualité de l'apparence visuelle d'une image par la mise en évidence de structures ou de marquages peu contrastés. Quatre types de méthodes d'amélioration d'images sont distingués :

- les méthodes fondées sur des modifications ponctuelles de l'amplitude (modification de l'histogramme des valeurs de niveaux de gris) ;
- les méthodes fondées sur la transformation d'images dans le domaine spatial (techniques des masques de convolution) ;
- les méthodes fondées sur les transformations d'images dans le domaine de Fourier ;
- les méthodes fondées sur l'emploi de pseudo-couleurs.

Il n'y a pas de recettes généralisées en amélioration d'images. On peut tout au plus définir des critères de choix selon l'application étudiée et le résultat recherché, qui induiront une préférence pour telle ou telle méthode.

Dans le présent travail, le traitement de l'image a consisté principalement en une augmentation du contraste de l'image, en un lissage pour éliminer le bruit, et en une amélioration du rapport signal / bruit de l'image. Les autres méthodes d'amélioration d'images non utilisées systématiquement seront décrites au cas par cas.

### **A5.4) Paramètres fluorimétriques**

L'étape de paramétrisation conduit au calcul de paramètres sur les entités qui intéressent l'observateur.

Seuls les paramètres fluorimétriques qui nous intéressent seront développés ci-dessous.

Certaines substances possèdent la propriété, quand elles reçoivent une radiation lumineuse d'émettre un rayonnement de plus grande longueur d'onde que la lumière excitatrice. Si le rayonnement n'existe que pendant l'irradiation par la lumière d'excitation, il s'agit d'une fluorescence (Rost, 1992). La majorité des constituants biologiques ne possèdent pas la propriété de fluorescence, ils doivent être associés à un colorant fluorescent ou fluorochrome afin d'être

détectés ou mesurés. Chaque fluorochrome est caractérisé par les valeurs spectrales des rayonnements d'excitation et d'émission de leur fluorescence. Ces dernières définissent la combinaison des filtres d'excitation et d'arrêt à placer, respectivement entre la source lumineuse et entre l'échantillon biologique et le photodétecteur. Si un objet est illuminé par un rayonnement, un phénomène d'absorption intervient et une fluorescence apparaît, d'intensité proportionnelle à l'absorption.

En imagerie microscopique, l'intensité de fluorescence est calculée en chaque point de l'image. Les paramètres fluorimétriques sont calculés au regard de la distribution des intensités de fluorescence dans l'objet.

On définit ainsi :

- Les paramètres de valeur intégrée comme la **fluorescence totale**.
- Les paramètres de valeur moyenne comme la **fluorescence moyenne** (fluorescence totale normalisée à la surface de l'objet).
- Les paramètres décrivant la distribution des intensités de fluorescence : **écart-type, dissymétrie et aplatissement**.

Les paramètres de fluorescence totale et moyenne ont tous deux une signification cellulaire puisqu'ils reflètent, respectivement, pour une pression partielle en oxygène donnée, l'ensemble des sites non atteints par l'oxygène et le phénomène d'extinction moyen de fluorescence.

En absence d'oxygène, la variance reflète l'hétérogénéité de distribution des intensités de fluorescence.

### A5.5) Analyse des données

La statistique classique et les méthodes regroupées sous le nom d'analyse des données offrent des outils puissants de description, de classification et de représentation synthétique des paramètres calculés sur les images d'un grand nombre de cellules ou d'acquisitions successives.

### A5.6) Type de capteurs utilisés

La mesure de la quantité de lumière émise (de fluorescence) en chaque point d'un objet est réalisée au moyen d'un détecteur de lumière, qui amplifie éventuellement et convertit le rayonnement photonique en un signal électrique proportionnel et mesurable par une unité de calcul. Le détecteur idéal est supposé être linéaire sur toute la dynamique (noir complet 0, éblouissement 4096) et suffisamment sensible pour détecter de faibles rayonnements sur tout le spectre lumineux.

Nous avons utilisé deux types de photodétecteurs : un photomultiplicateur pour la détermination des durées de vie à l'état excité et un capteur matriciel (caméra CCD « coupled charge device ») pour l'acquisition des images (par balayage) et la distribution des intensités de fluorescence.

Le photomultiplicateur est un capteur qui offre la meilleure dynamique (nombre de niveaux d'intensité effectivement discernables) et la meilleure linéarité (respect de la proportionnalité en points de la dynamique).

Le capteur matriciel équipe tous les systèmes récents de cytométrie à balayage et offrent les mêmes caractéristiques photoniques que des photomultiplicateurs.

*Références bibliographiques*



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alcala JR, Gratton E, Prendergast FG. (1987). Resolvability of fluorescence lifetime distributions using phase fluorimetry. Biophys J. 51, 587-596.

Anastasia, B., P. Blanchemaison, et al. (1997). "Oxymétrie transcutanée (TcPO<sub>2</sub>) en pathologie veineuse (3)." Actualités Vasculaires Internationales (47): 6-10.

André, J.C., M. Bouchy, Viriot, M.L. (1983). "La fluorescence moléculaire, son application à l'étude des mouvements à l'échelle moléculaire dans les membranes biologiques." Techniques Avancées en Hémostase 708-752.

André, J. C. and M. Donner (1987). "Mouvements de translation dans les membranes biologiques". Techniques avancées en Hémostase 361-401.

Bach, D., N. Borochoy, et al. (1995). "Cholesteryl hemisuccinate-cholesterol interaction : miscibility properties of the sterols." Chem Phys Lipids 76,(1): 123-127.

Bacon, J. R. et Demas J.N. (1987). "Determination of oxygen concentrations by luminescence quenching of a polymer-immobilized transition metal complex." Anal Chem (59): 2780-2785.

Baghi, M., M. R. Prasad, et al. (1989). "Effects of free radicals on the fluidity of myocardial membranes." Free Rad Res Comms 7,(3-6): 375-380.

Bambot, S., R. Holavanahali, et al. (1994). Optical oxygen sensor using fluorescence lifetime measurement. New York, Plenum Press.

Barbier, A., M. R. Boisseau, et al. (1994). "Microcirculation et rhéologie." La presse Médicale(23): 5-8.

Baros, F., A. Naoumi, et al. (1991). "Lateral diffusion in synthetic membranes models and experiments on protein influence." J Chem Soc Faraday Trans 87(13): 2039-2046.

Battino, R. F. D. et al.[Benson, 1985 #27] (1968). "Solubilities of seven gases in olive oil with reference to theories of transport through the cell membrane." J Am Oil Chem Soc 45: 830-837.

Belcaro, G. et N. Laboratoires Negma. (1995). Veines et Vasa Vasorum. Anatomie, histologie, Physiologie, physiopathologie.

Benson, D. M., J. Bryan, et al. (1985). "Digital imaging fluorescence microscopy: spatial heterogeneity of photobleaching rate constant in individual cells." The Journal of Cell Biology 100: 1309-1323.

Bergman, I. (1968). "Rapid-response atmospheric oxygen monitor based on fluorescence quenching." Nature(218): 396-402.

Bessis, M. et N. Mohandas (1975). "A diffractometric method for the measurement of cellular deformability." Blood cells(1): 307-312.

Birks, J. B. (1970). Photophysics of Aromatic Molecules. New York.

Boivin, P. (1992). "Interactions between hemoglobin and erythrocyte membrane and membrane protein oxidation." .

Braquet, P., P. E. Chabrier, et al. (1994). "Les fonctions de l'endothélium." La Presse Médicale 23(5): 225-227.

Brugal, G., R. Dye, et al. (1992). "HOME : Highly optimized microscope environment." Cytometry (13): 109-116.

Bruining, H. A., G. J. M. Pierik, et al. (1992). "Optical spectroscopic imaging for non-invasive evaluation of tissue oxygenation." Chirurgie (118): 317-323.

Bucci, E. et C. Fronticelli (1985). "Anion bohr effect of human hemoglobin." Biochemistry (24): 371-376.

Bucher, H. V. (1991). "Comparison between <sup>133</sup>Xenon clearance and near IR spectroscopy for estimation of cerebral blood flow." Paed Research 4(11): 12(14).

Caimi, G., A. Serra, et al. (1993). "Erythrocyte membrane fluidity, red cell membrane protein lateral mobility and red cell Ca<sup>2+</sup> content (total and cytosolic) in a group of vascular atherosclerotic disease subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus." J Blood Rheol 7(1): 19-22.

Carraway, E. R., J. N. Demas, et al. (1991). "Luminescence quenching mechanism for microheterogeneous systems." Anal Chem (63): 332-336.

Carrero, J., D. M. Jameson, et al. (1995). "Oxygen penetration and diffusion into myoglobin revealed by quenching of zincprotoporphyrin IX fluorescence." Biophysical Journal (54): 143-145.

Celedon, G., C. Behn, et al. (1992). "Transbilayer asymmetry of pyrene mobility in human spherocytic red cell membranes." Biochem Biophys Acta (1104): 243-249.

Coin, J. T. et J. S. Olson. (1979). "The rate of oxygen uptake by human red blood cells." The Journal of biological chemistry **254** (4): 1178-1190.

Cranney M, Cundall RB, Jones GR, Richards JT, Thomas EW. (1983) Fluorescence lifetime and quenching studies on some interesting diphenylhexatriene membrane probes. Biochim Biophys Acta **735**, 418-425.

Dale, RE. (1987). A happy huntig ground for the time resolved fluorescence depolarization spectroscopist. Studia Biophysica **2**, 5-24.

Davies, P. F. et R. O. Dull (1990). How does the arterial endothelium sense flow hemodynamic forces and signal transduction. Tobacco Smoking and Atherosclerosis. N Diana, New York, Plenum Press, 281-293.

Demas, J. N. et B. A. DeGraff (1991). "Design and Applications of highly luminescent transition metal complexes." Analytical chemistry **63**(17): 829-837.

Dembo, M., V. Glushko, et al. (1979). "A method for measuring membrane microviscosity using pyren excimer formation. Application to human erythrocyte ghost." Biochem Biophys Acta (522): 201-211.

Denicola, A., J. M. Souza, et al. (1996). "Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching." Archives of Biochemistry and Biophysics **328**(1): 208-212.

Desjardins, C. et B. R. Duling (1990). "Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit." American Journal of Physiology **258**: H647-H652.

Didelon, J., T. Gigout, et al. (1996). "Development on an automated , slow dialysis device for measuring erythrocyte osmotic resistance." Innovation and Technology in Biology and Medecine **17**(4): 337-351.

Dix, J. A. et A. S. Verkman (1990). "Pyrene excimer mapping in cultured fibroblasts by ratio imaging and time-resolved microscopy." Biochemistry (29): 1949-1953.

Dodge, J. T., C. Mitchell, et al. (1963). "The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes." Arch Biochem Biophys (100): 119-125.

Edwards, A. D., C. Richardson, et al. (1993). "Measurement of hemoglobin flow and blood flow by near-infrared spectroscopy." J Appl Physiol **75**(4): 1884-1889.



Eisinger, J. et J. Flores (1986). "A milling crowd model for local and long-range obstructed lateral diffusion. Mobility of excimeric probes in the membrane of intact erythrocyte." Biophysic Journal **49**: 987-1001.

Ellis, C. G., M. L. Ellsworth, et al. (1990). "Determination of red blood cell oxygenation in vivo by dual video densitometric image analysis." American Journal of Physiology **258**(4): H1216-H1223.

Ellsworth, M. L. et P. R.N. (1990). "Arterioles supply oxygen to capillaries by diffusion as well as by convection." American Journal of Physiology **258**(4): H1240-H1243.

Expert panel. (1986). "Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability." Clinical Hemorheology **6**: 439-453.

Fine, I. et A. Weinreb (1993). "Multiple-scattering effects in transmission oxygmetry." Medical & Biological Engineering & Computing (31): 516-522.

Fischkoff, S et J. M. Vanderkooi (1975). "Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene." The Journal of General Physiology **65**: 663-676.

Forster, R. E et F. J. W. Roughton. (1957). "Photocolorimetric determination of rate of uptake of CO and O<sub>2</sub> by reduced human red cell suspension at 37°C." J Appl Physiol **11**(2): 260-268.

Galla, H. et E. Sackmann (1974). "Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes use of pyrene excimers as optical probes." Biochem Biophys Acta (339): 103-115.

Gatt, S. et E. Fibach (1988). "Spectrofluorometric measurements of a dispersion state of pyrenedodecanoic acid and its uptake by cultured cells and liposomes." Biochem Biophys Acta (943): 447-453.

Gouin, J. F. (1996). Fluoro-capteur à fibres optiques pour le dosage de l'oxygène en milieu marin. Nancy, Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine: 190.

Graven, K. K., L. H. Zimmerman, et al. (1993). "Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific." J Cell Physiol **157**(3): 544-554.

Groebe, K. (1992). "Relating measuring signals from PO<sub>2</sub> electrodes to tissue PO<sub>2</sub>: a theoretical study." Adv Exp Med Biol (316): 61-69.

Guilbault, G. G. (1973). Practical fluoresceine. New York, Marcel Dekker.

Halliwell, B. (1993). "The role of oxygen radicals in human disease with particular reference to the vascular system." Haemostasis **23**(1): 118-126.

Hardeman, M., P. Goedhart, et al. (1987). "Laser Diffraction ellipsometry of erythrocytes under controlled shear-stress using a rotational viscosimeter." Clin Chim Acta (165): 227-234.

Hartmann, P., M. Leiner, et al. (1995). "Response characteristics of luminescent oxygen sensors." Sensors&Activators (29): 251-257.

Hashimoto, M., R. Hata, et al. (1990). Facilitated transport of oxygen through hemoglobin solutions. New York, Plenum Press.

Holst, G., T. Kuster, et al. (1995). "FLOX-an oxygen flux measuring system using a phase-modulation method to evaluate the oxygen dependent fluorescence lifetime." Sensors&Activators (29): 231-239.

Hoofd, L., Z. Turek, et al. (1990). Concentric oxygen diffusion in tissue with heterogeneous permeability and consumption. New York, J Piiper.

Hook, C., K. Yamaguchi, et al. (1988). "Oxygen transfer of red blood cells: experimental data and model analysis." Respir Physiol (72): 65-69.

Huxley, V. et H. Kutchai (1983). "Effect of diffusion boundary layers on the initial uptake of O<sub>2</sub> by red cells. Theory versus experiment." Microvasc Res (29): 89-107.

Illinger, D., G. Duportail, et al. (1995). "A comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH as a probe for plasma membrane and for endocytic membrane." Biochem Biophys Acta (1239): 58-66.

Ince, C. (1994). "Future optical techniques for clinical assessment of the oxygenation of the microcirculation and of the metabolic state of tissue." Int J Microcirc 1(14): 45-62.

Ishiji, T. et M. Kaneko (1995). "Photoluminescence of pyren butyric acid incorporated into silicone film as a technique in luminescent oxygen sensing." Analyst (120): 1633-1638.

Itoh, T., K. Yaegashi, et al. (1995). Oxygen transport in rat mesenteric microvessels visualized by an oxygen sensitive membrane, Osaka.

Jamata, J., M. Josowicz, et al. (1994). "Chemical sensors." Anal Chem (66): 207R-228R.

Jurgens, K. D., T. Peters, et al. (1990). A method to measure the diffusion coefficient of myoglobin in intact skeletal muscle cells. Oxygen transport to tissue XII. J. P. e. al. New York, Plenum Press.

Kautskyt, H. (1939). "Quenching of luminescence by oxygen." Trans Faraday Soc 56(1): 168-172.

Khandelwal, S. V., R. S. Randad, et al. (1993). "Enhanced oxygenation in vivo by allosteric inhibitors of hemoglobin saturation." Am J Physiol 365(412): 1450-1453.

Kikuchi, Y., Q. W. Da, et al. (1994). "Variation in red blood cell deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue." Microvascular Research (47): 222-231.

Kinnula, V. L., J. I. Everitt, et al. (1991). "Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages and endothelial cells." Am J Physiol (261): L84-L91.

Kinnula, V. L., Z. Mirza, et al. (1993). "Modulation of hydrogen peroxide release from vascular endothelial cells by oxygen." Am J Respir Cell Mol Biol (19): 603-609.

- Klug, A., F. Kreuzer, et al. (1956). "The diffusion of oxygen in concentrated haemoglobin solutions." Helv physiol Acta(14): 121-128.
- Knopp, J. et G. Weber (1967). "Fluorescence depolarization measurements on pyrene butyric-bovine serum albumin conjugates." The journal of Biological Chemistry 42(6): 1353-1359.
- Kobayashi, H., H. Sano, et al. (1993). Oxygen flux and pH changes in microvessels of rat cremaster muscle, Congrès Osaka.
- Kourembanas, S., R. L. Hannan, et al. (1990). "Oxygen tension regulates the expression of platelets-derived growth factor B chain gene in human endothelial cells." J Clin Invest(86): 670-674.
- Kovitz, K. L., T. D. Aleskowitch, et al. (1993). "Endothelium-derived contracting and relaxing factors contribute to hypoxic responses of pulmonary arteries." Am J Physiol 265(412): 1139-1149.
- Kreutzer, F. (1970). "Facilitated diffusion of oxygen and its possible significance : a review." Respiration Physiology (9): 1-30.
- Kreuzer, F. et L. J. C. Hoofd (1987). Facilitated diffusion of oxygen and carbon dioxide. Handbook of Physiology. L. Fahri. Bethesda. 4: 89-95.
- Krogh, A. (1919). "The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation." J Physiol 299: 247-251.
- Kuo, L. et R. N. Pittman (1988). "Effects of hemodilution on oxygen transport in arteriolar network of hamster striated muscle." Am J Physiol(254): H331-H339.
- Lakowicz, J. R. et G. Weber (1973). "Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale." Biochemistry(12): 4171.
- Lakowicz, J. R., R. Thompson, et al. (1983). "Phase fluorometric studies of spectral relaxation at the lipid-water interface of phospholipid vesicles." Biochem Biophys Acta(734): 295-308.
- Lakowicz JR, Laczko G, Gryczynski I, Szmackinski H, Wiczek W. (1990) Frequency domain fluorescence spectroscopy ; principles, biochemical applications and future developments. Phys Chem. 93, 316-327.
- Lazarides, E. (1987). Cell 51: 345-352.
- Lee, E. D., T. C. Werner, et al. (1987). "Luminescence ratio indicators for oxygen." Anal chem (59): 279-283.
- Lee, G., M. Delohery, et al. (1993). "A comparison of techniques for introducing macromolecules into living cells." Cytometry (14): 265-270.
- Lee-gau, P. et T. E. Thompson (1985). "Oxygen quenching of pyrene-lipid fluorescence in phosphatidylcholine vesicles." Biophys J 47: 623-621.

- Legler, G., C. Muller-Platz, et al. (1985). "On the chemical basis of the Lowry determination." 150 (278-287).
- Leiner, M. J. P. (1995). "Optical sensors in vitro blood gas analysis." Sensors & Activators **b** (29): 169-173.
- Lenaz, G. (1987). "Lipid fluidity and membrane protein dynamics." Bioscience Reports **7**(11): 59-66.
- Lippitsch, M. E., S. Draxler, et al. (1996). Luminescence lifetime based sensing : new materials. Europt(r)ode III, Zurich.
- Lippitsch, M. E., J. Pusterhofer, et al. (1988). "Fiber optic oxygen sensor with the fluorescence decay time as the information carrier." Anal Chim Acta (205): 1-6.
- Liu, C. Y., S. G. Eskin, et al. (1994). The oxygen permeability of cultured endothelial cell monolayers. Oxygen transport to tissue. V.. New york, Plenum Press. **IV**.
- Lowe, G. D. O. (1992). "Blood viscosity and cardiovascular disease." Thromb Haemost.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem (193): 265-275.
- Lubbers, D. W. N. Opitz. "Luminescence lifetime based sensing : new materials.". EUROPT ODE III conference book of abstract, Zurich, March 31-April 1997,47.
- Martin, L. (1992). L'essentiel sur l'interprétation des gaz du sang artériel, Lea & Febiger.
- Maziere, J. C., J. D. Routier, et al. (1997). "Diphenylhexatriene (DPH)-labeled lipids as a potential tool for studies on lipid peroxidation in monolayer films." Free Radical Biology & Medicine **22**(5): 795-802.
- Mc Cabe, M. (1986). "The solubility ox oxygen in erythrocyte ghosts and the flux of oxygen across the red cell membrane." Adv Exp Med Biol (200): 13-20.
- Miccoli, L., C. Szczepaniak, et al. (1993). "Interaction of a phosphatidylcholine derivative of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriène (DPH) with intact living cells. Steady-state fluorescence polarization and phase fluorometry studies." Journal of Fluorescence **3**(4): 251-255.
- Milligan, L. C. et C. M. Wood (1987). "Regulation of blood oxygen transport and red cell pHi after exhaustive activity in rainbow trout and starry flounder." J Exp Biol (133): 263-282.
- Mitnick, M. H. (1976). "Pyrenebutyric acid as an optical oxygen probe in the intact cerebral cortex." Journal of Applied Physiology **41**(4): 593-597.
- Mochizuchi, M. (1990). Blood gas transfer of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in the lungs: new models measurements and conclusions. Oxygen transport to tissue. J. P. e. al. New York, Plenum Press. **XII**.

- Mohandas, N., M. R. Clark, et al. (1980). "Analysis of factors regulating erythrocyte deformability." J Clin Invest (66): 563-573.
- Moll, W. (1968). "The influence of hemoglobin diffusion on oxygen uptake and release by red cells." Respir Physiol (6): 1.
- Morov, S. L. (1973). Handbook of Photochemistry. Marcel Dekker, New York.
- Muller, S., M. Donner, et al. (1986). Fluofluidimètre. Techniques en Biorhéologie. M. D. JF Stoltz, E Puchelle, Séminaire INSERM. **143**: 349-351.
- Murr, R., S. Berger, et al. (1994). "A novel, remote-controlled suspension device for brain tissue PO<sub>2</sub> measurements with multiwire surface electrodes." Pflugers Arch (426): 348-350.
- Nicolson, P. et F. J. W. Roughton (1951). "A theoretical study of the influence of diffusion and chemical reaction velocity on the rate of exchange of carbon monoxide and oxygen between the red blood corpuscle and the surrounding fluid." Proceeding of the Royal Society (London)(138): 241-264.
- Obi-Tabot, E. T., L. M. Hanrahan, et al. (1993). "Changes in hepatocyte NADH fluorescence during prolonged hypoxia." J Surg Res **55**(6): 575-580.
- Olson, J. S. (1996). "Protein engineering strategies for designing more stable hemoglobin-based blood substitutes." Immob Biotech (24): 397-403.
- Orntoft, T. F. et N. Clausen (1994). "Hereditary spherocytosis : diagnostic and anemia-associated aberrations of ghost proteins." Scand J Clin Lab Invest **54**(2): 95-103.
- Osborn, A. D. et G. Porter (1965). "Diffusion studies in viscous media." Proc R Soc Lond B Biol Sci(284): 9-15.
- Owen, C. S. (1974). "Two dimensional diffusion theory : cylindrical diffusion model applied to fluorescence quenching." The Journal of Chemical Physics **62**(8): 3204-3209.
- Panato, P. et D. R. Walt (1995). "Analytical applications of optical imaging fibers." Anal Chem **67**: 481-487.
- Peterson, J. I., R. V. Fitzgerald, et al. (1984). "Fiber-optic probe for in vivo measurement of oxygen partial pressure." Anal Chem **56**: 151-162.
- Pierik, E. G. J. M., C. Ince, et al. (1991). The application of NADH fluorescence to identify non invasively tissue hypoxia in vivo. XXVI th Congress of the European Society for Surgical Research.
- Pittman, R. N. et B. R. Duling (1975). "Measurement of percent oxyhemoglobin in the microvasculature." Journal of Applied Physiology **38**(2): 321-327.
- Popel, A. S. (1989). "Theory of oxygen transport to tissue." Critical Reviews In Biomedical Engineering **17**(3): 257-321.

- Poss, M. J., I. S. Longmuir, et al. (1990). Hyperchylomicronemia; oxygen affinity and proton passage across the red cell membrane. *Oxygen Transport To Tissue*. J.Piiper. New York, Plenum Press. **XII**.
- Rego, A. C. et C. R. Oliveira (1995). "Dual effect of lipid peroxidation on the membrane order of retinal cells in culture." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **321**(1): 127-136.
- Reinhart, W. H. (1994). "Shear-dependence of endothelial functions." *Experientia* **50**: 87-93.
- Riess, J. G. (1992). "Les emulsions de fluorocarbures comme transporteurs d'oxygène injectables. Progres recents et perspectives." *Rev Fr Transfus Hemobiol* **35**(6): 391-406.
- Robinson, J. et J. M. Cooper (1970). "Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode." *Analytical biochemistry* **33**: 390-399.
- Rose, H. G. et M. Oklander (1965). "Improved procedure for extraction of lipids from human erythrocytes." *J Lipids Res* **6**: 428-431.
- Rosenzweig, Z. et R. Kopelman (1995). "Development of a submicrometer optical fiber oxygen sensor." *Anal chem* **67**: 2650-2654.
- Roughton, F. J. W. et R. E. Forster (1957). "Relative importance of diffusion and chemical reaction rates in determining rate of exchange of gases in the human lungs, with special reference to true diffusing capacity of pulmonary membrane and volume of blood in the lung capillaries." *J Appl Physiol* **11**: 290-301.
- Rumsey, W. L., R. Iturriaga, et al. (1991). "Optical measurements of the dependence of chemoreception on oxygen pressure in the cat carotid body." *American Journal of Physiology* **261**(4): 614-623.
- Rusch, P., A. Champaviller, et al. (1983). Exploration quantitative des processus de transfert transcapillaires. *Techniques Avancées en Hémorhéologie*. DPIC-INPL. Nancy: 851-857.
- Salathe, E. P. et Y. Xu (1991). "Non-linear phenomena in oxygen transport to tissue." *J Math Biol* **30**: 151-160.
- Schachter, D., U. Gogan, et al. (1982). "Asymmetry of lipid dynamics in human erythrocyte membranes studied with permeant fluorophores." *Biochemistry* **21**: 2146-2150.
- Seitz, W. R. (1988). "Chemical sensors based on immobilized indicators and fiber optics." *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* **19**: 135-173.
- Shibuya, I., K. Niizeki, et al. (1988). "Estimation of the transfer coefficients of oxygen and carbon monoxide in the boundary of human and chicken red blood cells by a microphotometric method." *Adv Exp Med Biol* **222**: 219-229.
- Shiga, T., N. Maeda, et al. (1979). "The decreased membrane fluidity of in vivo aged human erythrocyte." *Biochim Biophys Acta* **553**: 84-85.

- Shinitzky, M., Y. skornick, et al. (1979). "Effective tumor immunization induced by cells of elevated membrane-lipid microviscosity." Proc Natl Acad Sci USA **76**(10): 5313-5316.
- Sholander, P. F. (1960). "Oxygen transport through hemoglobin solutions." Science **131**: 585.
- Sirieix, D., R. A. Nicolas, et al. (1996). "Les transporteurs de l'oxygène : solutions d'hémoglobine et fluorocarbones." Sang Thrombose et Vaisseaux **8**: 511-517.
- Smoluchowski, M. V. (1917). Z.Phys.Chem **92**: 129-135.
- Staub, N. C., J. M. Bishop, et al. (1961). "Velocity of O<sub>2</sub> uptake by human red blood cells." Journal of Applied Physiology **612**: 511-513.
- Stein, P. R., J. C. Martin, et al. (1971). "Steady-state oxygen transport through red cell suspensions." Journal of Applied physiology **31**(3): 397-405.
- Stevens, T., D. N. Cornfield, et al. (1994). "Acute reductions in PO<sub>2</sub> depolarize pulmonary artery endothelial cells and decrease [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>." A J Physiol **266**(412): 1416-1421.
- Stoltz, J. F., F. Y. Zhuang, et al. (1996). Aspects biochimiques, rhéologiques et physico-chimiques de l'adhésion leucocytaire. 4<sup>ème</sup> Symposium Inter Agrégation et Adhésion cellulaire, Nancy (france).
- Streiff, F., P. Labrude, et al. (1973). "Mise au point concernant l'affinité de l'Hb pour l'oxygène." Comptes Rendus de séances de la Société de Biologie (12): 1919.
- Stroeve, P., C. K. Colton, et al. (1976). "Steady-state diffusion of oxygen in red blood cell and model suspensions." AIChE Journal **22**(6): 1133-1142.
- Stroeve, P., K. A. Smith, et al. (1976). Facilitated diffusion of oxygen in red blood cell suspensions. Plenum. Press, New York.
- Subczynski, W. K., J. S. Hyde, et al. (1991). "Effect of alkyl chain unsaturation and cholesterol intercalation on oxygen transport in membranes, a pulse ESP spin labeling study." Biochemistry **30**: 8578-8590.
- Sutherland, W. (1905). "A dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin." Phil Mag (9): 781-785.
- Suzuki, H. (1993). "Miniature Clark oxygen electrodes using anisotropic etching of silicon and their application to biosensors." Applied Biochemistry and Biotechnology **41**: 73-74.
- Swain, D. P. et R. N. Pittman (1989). "Oxygen exchange in the microcirculation of hamster retractor muscle." Am J Physiol **256**: 247-255.
- Szmacinski, H. et J. R. Lakowicz (1995). "Fluorescence lifetime-based sensing an imaging." Sensors & Actuators B **167**: 17-36.

Tateishi, N., N. Maeda, et al. (1990). A method for measuring the rate of oxygen release from flowing erythrocytes in microvessels. Oxygen transport to tissue. J.Piiper. New York, Plenum Press. **XII**.

Tateishi, N., N. Maeda, et al. (1992). "A method for measuring the rate of oxygen release from single microvessels." Circulation Research **70**(4): 812-819.

Teitel, P. (1983). Short introduction to the physiology of the circulation in relation to hemorheology. Travaux Avancés en Hémorhéologie : 63-71.

Tomita, M., F. Gotoh, et al. (1990). Diffusion of oxygen and hydrogen as a faster through a layer of suspended cultured C6 cells than through the medium. Oxygen transport to tissue. J.Piiper. New York, Plenum Press. **XII**.

Toulmond, A. et J. P. Truchot (1993). "Les transporteurs d'oxygène." La recherche **24**(254): 562-572.

Treenak, W., W. Gruber, et al. (1995). "Recent progress in optical oxygen sensor instrumentation." Sensors & Activators B **29**(219-225).

Tsai, A. G., B. Friesenecker, et al. (1994). "Vessel wall oxygen gradients and the redistribution of tissue oxygen tension during perfusion with cross-linked Hb in awake hamster." Int J Microcircis **14**(1).

Tulborn, K. R., L. M. Tilley, et al. (1979). "The use of n-(9-anthroyloxy) fatty acids to determine fluidity and polarity gradients in phospholipids bilayers." Biochim Biophys Acta **558**: 166-178.

Uchida, R. K., K. Matsuyama, et al. (1992). "Diffusion coefficient for O<sub>2</sub> in plasma and mitochondrial membranes of rat cardiomyocytes." Respiration Physiology (90): 351-362.

Van Belle, E. et C. Bateurs (1997). "Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et pathologie artérielle." Sang Thrombose Vaisseaux **9**: 114-119.

Vanderkooi, J. M., S. Fischkoff, et al. (1974). "Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol-rich membranes." Biochemistry **13**(8): 1589-1595.

Vaughan, W. M. et G. Weber (1970). "Oxygen quenching of pyrenebutyric and fluorescence in water : a dynamic probe of the microenvironment." Biochemistry **9**(3): 464-473.

Vekshin, N. L. (1987). "On measuring biomembrane microviscosity using pyrene luminescence in aerobic conditions." Journal of Biochemical and Biophysical Methods (15): 97-105.

Wade, M. H., A. Feijter, et al. (1994). "Quantitative fluorescence imaging technologies for the study of organization and signaling mechanisms in cells." Bioanalytical instrumentation **37**: 117-141.

Weiner, M. (1992). The application of newer concepts of oxygen transport to the evaluation of the potential utility of reduced Hb-O<sub>2</sub> affinity. The use of resealed erythrocytes as carriers and bioreactors. M R. Deloach. New York, Plenum press.



- Wieringa, P. A., H. G. Stassen, et al. (1993). "Oxygen diffusion in a network model of the myocardia microcirculation." Int J Microcirc Clin Exp **13**: 137-169.
- Windrem, D. A. et W. Z. Piachy (1980). "The diffusion-solubility of oxygen in lipid bilayers." Biochim Biophys Acta (600): 655-665.
- Wittenberg, J. B. (1970). "Facilitated oxygen diffusion : role of myoglobin in oxygen entry into muscle." Physiol Rev **50**: 599-608.
- Wolfbeis, O. S. (1991). Fiber optic chemical sensors and biosensor. London, Boca Raton Ann Arbour Boston.
- Wolbfeis, O. S., H. Offenbacher, et al. (1984). "A fast responding fluorescence sensor for oxygen." Krochimica Acta **1**: 153-158.
- Wyman, J. (1966). "Facilitated diffusion and the possible role of myoglobin as a transport mechanism." J Biol Chem **241**: 115-121.
- Yamaguchi, K., A. Kawai, et al. (1991). "Distribution of ventilation and of diffusing capacity to perfusion in the lung." Respir Physiol Nov **86** (2): 171-187.
- Yarnell, J. W. G., I. A. Baker, et al. (1991). "Fibrinogen, viscosity and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease." Circulation (83): 836-844.
- Yarnell, J. W. G., P. M. Sweetnam, et al. (1988). "Plasma and whole blood viscosity in ischaemic heart disease : the caerphilly studies." Clin Hemorheol (8): 501-506.
- Yguerabide, J. (1994). "Theory for establishing proximity relations in biological membranes by excitation energy transfer measurements." Biophysical Journal **66**: 683-693.
- Youngson, C. Nurse, et al. (1993). "Oxygen sensing in airway chemoreceptors." Nature **365**: 153-155.
- Zak, B. (1977). "Cholesterol methodologies: a review." Clin Chem **23**: 1201-1214.
- Zlatkis, A. and B. Zak (1969). "Study of new cholesterol reagent." Anal Biochem **29**: 143-148.
- Zlatkis, A., B. Zak, et al. (1953). "A new method for the direct determination of serum cholesterol." J Lab Clin Med (41): 486-492.
- Zhang, S. L. et F. Y. Zhuang (1992). Effects of traditional chinese medicine, PBRS on oxygen diffusion and relevances, Beijing.

## LISTE DES TRAVAUX ET PUBLICATIONS

Janin G., Ory JM., **Dumas D.**, Lavisici P.

Colorimétrie de la pâte écrue. Mesure automatique de la longueur des fibres avec l'appareil Histafibre.

ATP (1989) 43 (2), 63-74.

Mathiot B., Perani A., **Dumas D.**, Maugras M., Didelon J, Stoltz JF.

Increase of hybridoma productivity using an original dialysis culture system.

Cytotechnology (1993) 11, 41-48.

Miccoli L., Szczepaniak C., **Dumas D.**, Savonnière S., Muller S., Carré MC, Donner M.

Interaction of a Phosphatidylcholine Derivative of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) with Intact Living Cells. Steady-State Fluorescence Polarization and Phase Fluorometry Studies.

Journal of Fluorescence (1993) 3,(4), 251-255.

**Dumas D.**, Didelon J., Humbert JC., Gigout T., Rasia RJ, Stoltz JF

Influence du cholestérol sur la déformabilité cellulaire et la fragilité osmotique des hématies..

Journal des Maladies Vasculaires (1996) 21, (3), 181-184.

Didelon J., Gigout T., **Dumas D.**, Humbert JC., Gauchois G., Gentils M, Stoltz JF.

Development on an automated, slow dialysis device for measuring erythrocyte osmotic resistance.

Innovation and Technology in Biology and Medicine (1996) 17, (4), 337-351.

**Dumas D.**, Muller S., Baros F., Gouin F., Viriot ML., Taccoen A, Stoltz JF.

Mesure de la diffusivité de l'oxygène par inhibition de fluorescence de sondes pyréniques dans la membrane d'érythrocyte enrichie en cholestérol.

Journal de Chimie Physique (1997) 94, 1-17.

**Dumas D.**, Muller S., Gouin G., Baros F., Viriot ML, and Stoltz JF.

Membrane fluidity and Oxygen Diffusion in Cholesterol-Enriched Erythrocyte Membrane.

Archives of Biochemistry and Biophysics (1997) 341, (1), 34-39.

**Dumas D.**, Gouin F., Viriot ML, and Stoltz JF.

Effect of glutaraldehyde on hemoglobin-dependent quenching of pyrene fluorescence. Application to oxygen diffusion in erythrocyte.

Clinical Hemorheology (1997) 5.(sous presse).

**Dumas D.**, Didelon J., Humbert JC., Gigout T., Valverde RJ., Rasia RF, and Stoltz JF.

Influencia del colesterol en membrana sobre la deformabilidad y la fragilidad osmotica eritrocitarias.

Acta Bioquímica Clínica Latino-america (sous presse).

**Dumas D.**, Muller S., Viriot ML, Stoltz JF

Effect of rigidification induced by cholesterol on oxygen permeability of cultured human endothelial cell monolayer.

Experimental Cell Research (soumis à publication).

COMMUNICATIONS AVEC ACTE

**Dumas D**, Stoltz JF.

Oxygen exchange through the human endothelial cells membrane monitored by the fluorescent probe, pyrene derivatives : preliminary measurements by fluorescence microscope.

Congrès AFC Cytométrie. 16-18 octobre 1996, Rouen, France.

Analytical Cellular pathology (1997) 3, (13), 147-301.

**Dumas D**, Muller S., Baros F., Viriot ML., Gouin F., Taccoen A, Stoltz JF.

Influence du cholestérol sur les propriétés mécaniques de la membrane d'érythrocyte et la diffusion de l'oxygène.

IX<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Biorhéologie Fondamentale et Clinique. 23-25 septembre 1996, Nancy, France.

Archives of Physiology and Biochemistry (1996) 104-564.

Stoltz JF., **Dumas D**., Wang X., Lehalle B., Taccoen JC., Burger M., Maurice G, and Lucius M.

Oxygénation tissulaire : transport global et moléculaire de l'oxygène - rôle des vasa-vasorum.

4<sup>ème</sup> Symposium Inter Agrégation et Adhésion cellulaire, 24 septembre 1996, Nancy, France.

Archives of Physiology and Biochemistry (1996) 104-577.

Stoltz, JF., Zhuang FY., Senger B., Voegel JC., Delamaire M., Boisseau M., Sun RI., Paulus F., **Dumas D**., Lakomsky D., Humbert JC., Lecompte T, Schaaf P.

Aspects biochimique, rhéologique et physico-chimique de l'adhésion leucocytaire.

4<sup>ème</sup> Symposium Inter Agrégation et Adhésion cellulaire, 24 septembre 1996, Nancy, France.

Archives of Physiology and Biochemistry (1996) 104-578.

Latger V., Regnault V., **Dumas D**., Muller S., Humbert JC., Schooneman F., Lecompte T, and Stoltz JF.

Quantimetry of neutrophil adhesion molecules in physiologic condition and after inflammatory stimuli incubation.

Société de Médecine de Nancy, Angio-Hématologie, 28 mai 1997, Nancy, France.

**Dumas D**., Gouin F., Stoltz JF, Baros F, Viriot ML.

Développement de capteurs pour la biologie et la médecine : Diffusion de l'oxygène dans les milieux biologiques

Programme régional Procédés optiques. Sous-programme Biologie-Santé, réunion préparatoire, ESSIDEC Metz, 6 novembre 1996, Metz, France.

**Dumas D**., Gouin JF., Viriot ML., and Stoltz, JF.

Oxygen diffusion en Human Cells by Time-Resolved Fluorescence Microscopy.

XVIII International Conference on Medical and Biological Engineering ; XI International Conference on Medical Physics, 14-19 Septembre 1997, Nice, France. Medical & Biological Engineering & Computing (1997) 35,(1),98.

**Dumas D**, Viriot ML, and Stoltz JF.

Influence of plasma viscosity and endothelium monolayer on oxygen supply to tissues. International Union of Angiology. European Congress of Angiology. 11th meeting. 23-26 octobre 1997, Rome, Italie.

Nom : DUMAS

Prénom : Dominique

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

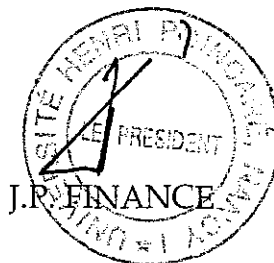
en BIOLOGIE ET SANTÉ

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 25 NOV 1997 n° 114

Le Président de l'Université



## **PROPRIETES RHEOLOGIQUES ET PERMEABILITE A L'OXYGENE DES MILIEUX BIOLOGIQUES :**

### **Diffusion de l'oxygène des érythrocytes aux tissus.**

L'hypoxie tissulaire est une conséquence à de nombreuses pathologies cardio-vasculaires dites ischémiantes mais son origine reste très variée. L'oxygénation tissulaire dépend de mécanismes physico-chimiques et chimiques complexes (transport et libération de l'oxygène).

Notre intérêt s'est porté sur l'étude de l'influence des divers compartiments biologiques traversés lors du transfert de l'oxygène des érythrocytes aux tissus. Nous avons principalement considéré la membrane érythrocytaire, le plasma et l'endothélium capillaire.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé chaque milieu biologique par ses propriétés rhéologiques à différents niveaux d'investigation (viscosité plasmatique, déformabilité érythrocytaire, fragilité osmotique et fluidité membranaire). Nous disposions de trois modèles biologiques aux caractéristiques physico-chimiques finies.

Dans un second temps, nous avons mis en œuvre une technique basée sur l'inhibition de fluorescence (capteur optique) pour aborder le phénomène de diffusion de l'oxygène. Les deux principaux paramètres, l'intensité de fluorescence et la durée de vie des états excités précurseurs de la fluorescence, ont été mesurés à l'aide de différentes configurations matérielles (spectrofluorimètre, microscope à fluorescence) avec plusieurs méthodes (fluorimétrie de phase, comptage monophotonique et système de type Boxcar).

Enfin, nous avons appliqué ces techniques à l'étude des relations entre les paramètres rhéologiques macroscopiques, microscopiques, moléculaires et le phénomène de diffusion de l'oxygène. Il était attendu que la diminution de la fluidité membranaire (ou la présence d'obstacles) s'accompagne d'une diminution de la diffusion de l'oxygène. Nous avons tenté de vérifier cette relation sur chaque compartiment biologique en modulant leurs propriétés rhéologiques (rigidification membranaire, hyperviscosité plasmatique...).

L'ensemble de cette étude a montré que le phénomène de diffusion de l'oxygène pouvait être quantifié à l'aide de capteurs optiques pour chacun des compartiments biologiques étudiés. Un outil prédictif de l'état d'oxygénation tissulaire permet d'apporter aux cliniciens une aide au diagnostic "d'hypoxie tissulaire". Le développement de la microscopie à fluorescence résolue dans le temps, apporte des améliorations importantes en terme de détermination des durées de vie de fluorescence dans les milieux biologiques. Cette instrumentation non disponible sur le marché à ce jour, a permis de globaliser cette approche et d'envisager à terme un modèle d'inhibition de la fluorescence par l'oxygène très fidèle aux diverses conditions physiologiques rencontrées dans le système circulatoire.

Mots clés : Erythrocytes, Plasma, Endothélium, Propriétés rhéologiques, Diffusion de l'oxygène, Durée de vie de fluorescence, Microscopie résolue dans le temps, Modélisation.