



HAL
open science

Mécanismes d'action des produits de contraste sur l'agrégation érythrocytaire : étude in vitro par des méthodes optiques

Xiaoduang Weng

► **To cite this version:**

Xiaoduang Weng. Mécanismes d'action des produits de contraste sur l'agrégation érythrocytaire : étude in vitro par des méthodes optiques. Médecine humaine et pathologie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1994. Français. NNT : 1994INPL096N . tel-01776591

HAL Id: tel-01776591

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776591>

Submitted on 24 Apr 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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

THESE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Présentée
pour obtenir le titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Spécialité Génie Biologique et Médical

par

Xiaoduan WENG

**MECANISMES D'ACTION DES PRODUITS DE
CONTRASTE SUR L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE**

- ETUDE *in vitro* PAR DES METHODES OPTIQUES

soutenue publiquement le 27 Septembre 1994

Membres du Jury

Rapporteurs :



D 136 001376 5

Mme le Docteur C. LACOMBE
Mme le Docteur F. PAULUS
Mr le Professeur G. POTRON
Mme le Docteur C. COROT
Mme le Docteur M. DONNER
Mr le Professeur J.F. STOLTZ

1360013765

94 INPL 036N

[M]1994 WENG, X.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

THESE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Présentée
pour obtenir le titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Spécialité Génie Biologique et Médical

par

Xiaoduan WENG

**MECANISMES D'ACTION DES PRODUITS DE
CONTRASTE SUR L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE**

- ETUDE *in vitro* PAR DES METHODES OPTIQUES

soutenue publiquement le 27 Septembre 1994

Membres du Jury

Rapporteurs :

Mme le Docteur C. LACOMBE
Mme le Docteur F. PAULUS
Mr le Professeur G. POTRON

Membres du Jury :

Mme le Docteur C. COROT
Mme le Docteur M. DONNER
Mr le Professeur J.F. STOLTZ

AVANT - PROPOS

Ce travail a été effectué sous la direction de Madame le docteur **Mireille DONNER**, directeur de Recherche INSERM. Elle a accepté de diriger mon travail. Ses nombreux conseils m'ont permis d'améliorer ce travail et de mener à bien la rédaction de cette thèse. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et mes sentiments les plus respectueux.

Je tiens à remercier vivement Monsieur **Jean-François STOLTZ**, professeur à l'Université de NANCY I, pour son accueil et l'honneur qu'il m'a fait d'accepter la présidence de ma thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur **Gérard POTRON**, professeur de l'Université de Reims, qui m'a fait l'honneur de juger mon travail et particulièrement d'être rapporteur.

Je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance à Madame le docteur **Françoise PAULUS**, maître de conférence de la Faculté de Pharmacie de NANCY, pour l'attention qu'elle a portée à ce travail en acceptant d'être le rapporteur de cette thèse.

Je tiens à remercier Madame le docteur **Catherine LACOMBE**, maître de conférence universitaire pour qu'elle m'a fait l'honneur de juger mon travail et d'en être le rapporteur de cette thèse.

Je remercie vivement Madame **Claire COROT**, responsable du Service d'Immunologie du Laboratoire Guerbet, qui a accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur **Michel LUCIUS**, président et professeur à l'Institut National Polytechnique de Lorraine qui m'a fait l'honneur de m'accueillir et de m'aider lors de mon inscription à L'INPL.

Je tiens également à exprimer mes remerciements à tous ceux et celles qui m'ont apporté leur aide morale et technique dans la réalisation de ce travail, en particulier :

Mesdames **Monique GENTILS** et **Ghislaine CAUCHOIS**, pour leur aide technique et matérielle à la réalisation de cette étude. Je tiens à leur exprimer ma reconnaissance et à leur témoigner mon amitié.

Monsieur le docteur **Michel MAUGRAS**; pour ses conseils et son aide dans la rédaction de ce mémoire, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Mademoiselle **Sandrine SAVONNIERE**, pour ses nombreuses aides, en particuliers dans la correction orthographique de ce mémoire, je tiens à lui exprimer mes remerciements. Qu'elle soit assurée de ma sincère amitié.

Madame le docteur **Sylvaine MULLER**, pour son aide morale et technique, je tiens à lui exprimer ma reconnaissance.

Enfin, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes de notre unité pour leur sympathie et leur gentillesse qui m'ont accompagnée durant les quatre années passées au Laboratoire.

à Jiansheng
à Dandan
à mes parents
à ma famille

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION GENERALE	1

PREMIERE PARTIE ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

I - 1 CARACTERISTIQUES ELEMENTAIRES DU SANG HUMAIN	6
I. INTRODUCTION.....	6
II. CONSTITUANTS DU SANG	6
II.1. Protéines du plasma.....	8
II.2. Hématie	10
II.2.1. Hémoglobine.....	12
II.2.2. Membrane érythrocytaire.....	13
II.2.2.1. Lipides.....	14
II.2.2.2. Protéines membranaires	14
II.2.2.3. Mouvements de la membrane.....	19
II.2.2.4. Charge électrique de la surface de l'hématie.....	21
I - 2 RAPPELS SUR LA RHEOLOGIE DU SANG	24
I. INTRODUCTION.....	24
II. RAPPELS THEORIQUES SUR LES ECOULEMENTS ET LES PARAMETRES D'INTERET	25
II.1. Contrainte de cisaillement.....	25
II.2. Vitesse de cisaillement.....	26
II.3. Nombre de Reynolds.....	27
II.4. Viscosité	28
II.4.1. Viscosité dynamique.....	29
II.4.2. Viscosité cinématique.....	29
II.4.3. Viscosité relative.....	30
III. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU PLASMA.....	30
IV. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU SANG.....	31
IV.1. Déformation des hématies	31
IV.2. Agrégation érythrocytaire	32
IV.3. Propriétés rhéologiques en régime stationnaire.....	32
IV.4. Propriétés rhéologiques en régime instationnaire	34
IV.5. Lois rhéologiques	35
V. COMPARTIMENTS DE LA CIRCULATION SANGUINE.....	37
VI. MICROCIRCULATION.....	38
I - 3 RAPPELS SUR LE PHENOMENE D'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE	41
I. DESCRIPTION DU PHENOMENE	41
II. MODELISATION DE L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE.....	41
II.1. Théorie du pontage macromoléculaire	42
II.2. Théorie de la déplétion.....	49

III. FACTEURS PRINCIPAUX INFLUENCANT L'AGREGATION DES HEMATIES.....	51
III.1. Vitesse de cisaillement	52
III.2. Protéines plasmatiques et macromolécules.....	55
III.2.1. Protéines plasmatiques	55
III.2.2. Macromolécules.....	56
III.2.3. Mécanismes d'action des facteurs plasmatiques et des macromolécules	56
III.3. Propriétés intrinsèques des hématies.....	62
III.3.1. Hématocrite.....	62
III.3.2. Propriétés de la membrane érythrocytaire.....	62
III.3.3. Charge électrique de surface de l'hématie	64
IV. METHODES D'ETUDE DE L'AGREGATION DES HEMATIES	66
IV.1. Vitesse de sédimentation.....	66
IV.2. Techniques viscosimétriques	67
IV.2.1. Mode stationnaire	68
IV.2.2. Mode instationnaire	68
IV.3. Observations microscopiques.....	70
IV.3.1. Observations microscopiques statique et dynamique.....	70
IV.3.2. Observations microscopiques couplées à une technique viscosimétrique.....	71
IV.3.3. Observations microscopiques et analyse d'images.....	71
IV.4. Mesure des variations d'intensité lumineuse.....	73
IV.4.1. Lumière transmise.....	74
IV.4.2. Lumière rétrodiffusée laser.....	75
IV.5. Méthodes encore au stade du laboratoire	81
IV.6. Méthodes in vivo	81

DEUXIEME PARTIE

APPROCHES *in vitro* DE L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE EN REGIME PULSE ET PAR ANALYSE D'IMAGES

II - 1 AGREGATION ERYTHROCYTAIRE ET CISAILLEMENT PULSE.....	84
I. INTRODUCTION.....	84
II. DETERMINATION DE L'AGREGATION EN REGIME PULSE.....	85
III. RESULTATS	87
III.1. Régime pulsé d'amplitude 30%.....	87
III.1.1. Description des conditions qui ont été employées.....	87
III.1.2. Effet d'un cisaillement pulsé sur la cinétique d'agrégation d'un sang normal	88
III.2. Régime pulsé d'amplitude 75 %.....	98
III.2.1. Effet de l'amplitude du régime pulsé.....	98
III.2.2. Influence de la fréquence du régime pulsé	100
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	105
 II - 2 QUANTIFICATION DE L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE PAR ANALYSE D'IMAGES.....	 111
I. INTRODUCTION.....	111
II. SYSTEME MICROSCOPIQUE ET ANALYSE D'IMAGES.....	111
II.1. Rhéoscope et microscope.....	112
II.2. Le logiciel JAVA.....	114

II.3. Paramètre d'agrégation érythrocytaire.....	123
III. RESULTATS	124
III.1. Définition des conditions optimales	124
III.1.1 Sélection de la méthodes de traitement d'images.....	124
III.1.2. Grossissement du microscope	126
III.1.3. Hématocrite.....	126
III.1.4. Intervalle de temps entre deux images.....	126
III.2. Influence du nombre de cisaillement sur la valeur de l'indice K	127
III.3. Reproductibilité	127
III.3.1. Influence du nombre d'objets traités sur la valeur de l'indice K.....	127
III.3.2. Reproductibilité	129
III.4. Mise en évidence de la cinétique de l'agrégation érythrocytaire.....	130
III.5. Relations de l'indice K avec les paramètres de l'analyse par rétrodiffusion laser.....	133
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	133

TROISIEME PARTIE
ETUDE DES INTERACTIONS DES PRODUITS DE
CONTRASTE IODES AVEC LES HEMATIES

III - 1 INTRODUCTION	138
III - 2 GENERALITES SUR LES PRODUITS DE CONTRASTE IONIQUES ET NON IONIQUES.....	140
I. INTRODUCTION.....	140
II. RESUME DE L'HISTORIQUE DES PRODUITS DE CONTRASTE.....	140
III. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES.....	144
III.1. Osmolalité.....	145
III.2. Viscosité.....	146
III.3. Neutralité électrique.....	147
III.4. Hydrophilie-Lipophilie	147
III - 3 EFFETS IN VITRO DES PRODUITS DE CONTRASTE IODES SUR L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE.....	148
I. INTRODUCTION.....	148
II. MATERIELS ET METHODES	150
II.1. Produits de contraste	150
II.2. Détermination de la viscosité.....	150
II.3. Préparation des échantillons - Mesures de l'agrégation érythrocytaire	151
II.4. Analyse statistique.....	152
III. RESULTATS	153
III.1 Adaptation des échantillons témoins à la molécule étudiée.....	153
III.2. Agrégation érythrocytaire par rétrodiffusion laser.....	154
III.3. Agrégation érythrocytaire par analyse d'images	159
IV. DISCUSSION	164
III - 4 INTERACTIONS DES PRODUITS DE CONTRASTE AVEC LA MEMBRANE DES ERYTHROCYTES	169
I. INTRODUCTION.....	169

II. FLUORESCENCE ET INHIBITION DE FLUORESCENCE	169
II.1. Origine du Phénomène de Fluorescence.....	169
II.2 Absorption	170
II.3. Emission de fluorescence.....	170
II.4. Inhibition de fluorescence.....	170
III. MATERIELS ET METHODES.....	171
III.1. Prélèvement des échantillons.....	171
III.2. Préparation des membranes d'hématies.....	172
III.3. Sondes fluorescentes.....	172
III.4. Préparation des échantillons pour les mesures de fluorescence.....	173
III.5. Déterminations de fluorescence.....	174
IV. ANALYSE STATISTIQUE.....	174
V. RESULTATS.....	174
VI. DISCUSSION	176
III - 5 EFFETS DES PRODUITS DE CONTRASTE SUR LA CHARGE ELECTRIQUE DE LA SURFACE CELLULAIRE	180
I. INTRODUCTION.....	180
II. MATERIELS ET METHODES	181
II.1. Approche Expérimentale de la Charge Electrique de Surface	181
II.2. Préparation des échantillons	183
III. RESULTATS	183
IV. DISCUSSION	186
III - 6 CONCLUSIONS SUR LES EFFETS DES PRODUITS DE CONTRASTE SUR L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE	189
CONCLUSION	192
BIBLIOGRAPHIE.....	196
ANNEXE	214
I. INTRODUCTION.....	215
II. ORIGINE ET PRELEVEMENT DU SANG.....	215
III. DETERMINATION ET AJUSTEMENT DE L'HEMATOCRITE	216
IV. DETERMINATION DE LA VISCOSITE DU SANG TOTAL.....	216
V. DETERMINATION D'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE	216
V 1. Erythroagrégamètre	216
V.2. Analyse par lumière transmise	217
VI. PARAMETRES FIXES DES DETERMINATIONS D'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE ET DE VISCOSITE SANGUINE	218
VI.1. Hématocrite.....	218
VI.2. Température de mesure.....	218
VII. INFLUENCE DE L'ACCELERATION LORS D'UNE CENTRIFUGATION D'UNE SUSPENSION ERYTHROCYTAIRE	219
VIII. INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DE L'ECHANTILLON SUR LA VISCOSITE SANGUINE ET LES PARAMETRES D'AGREGATION	219
IX. INFLUENCE DU TRAITEMENT D'HEMATIES PAR LA CHALEUR ...	224
X. DISCUSSION.....	227

LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Discocyte normal (hématie de forme biconcave) (d'après BESSIS M.1972) (14) 11
- Figure 2:** Géométrie d'une hématie humaine normale (d'après FUNG Y.C. et coll. 1981)(79). 11
- Figure 3:** Hématies normales suspendues dans du sérum (microscopie électronique à balayage) (d'après BESSIS M.1972) (14). 11
- Figure 4:** Le tétramère d'hémoglobine et ses différentes zones de contact (d'après WAJCMAN H.et coll.1992)(223). 13
- Figure 5:** Représentation schématique d'un tracé électrophorétique des protéines membranaires. [G3PDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; PAS : periodic acid Schiff (coloration spécifique des esters d'acide sialique)] (d'après WAJCMAN H.et coll 1992) (223). 15
- Figure 6:** Schéma de l'organisation des protéines de l'hématie (d'après CHIEN S. et SUNG L.A.,1990) (47). 16
- Figure 7:** Marquage de la monocouche externe suivie d'une diffusion transversale des lipides. Les points blancs et noirs schématisent respectivement les lipides non marqués et marqués (d'après SHECHTER E. 1990) (198). 20
- Figure 8:** Les divers mouvements des constituants membranaires. (1) Rotation des protéines; (2) rotation des lipides; (3) diffusion latérale des lipides; (4) mouvement de balancier des chaînes hydrocarbonées; (5) diffusion latérale des protéines (d'après SHECHTER E. 1990) (198). 21
- Figure 9:** Représentation schématique d'un écoulement laminaire et du écoulement laminaire et d'un écoulement turbulent (d'après G.PONTRON et coll. 1993) (167). 28
- Figure 10:** Variations de la viscosité relative (η_r) d'une suspension des hématies dans du plasma et en milieu Ringer ($H = 45\%$) (d'après CHIEN S. et coll.1978)(43). 33
- Figure 11:** Variations comparées de la viscosité relative (η_r) d'une suspension d'hématies rigidifiées et d'hématies normales ($H = 0,45/l$) (d'après CHIEN S. et coll.1978) (43). 33
- Figure 12:** Comportement viscoélastique du sang (d'après LACOMBE C.1980) (116). 34
- Figure 13:** Comportement thixotropique du sang (d'après LACOMBE C.1980) (116). 35
- Figure 14:** Schéma simplifié du mécanisme d'agrégation érythrocytaire par pontage macromoléculaire (d'après BAUMLER H. et coll. 1989) (11). 43
- Figure 15:** Variation de la distance intercellulaire en fonction de la masse moléculaire du dextran (d'après CHIEN S. et JAN K.M., 1973) (39). 44

- Figure 16:** Les deux cellules adjacentes ont leurs membranes déformées selon deux surfaces parallèles. Les molécules de dextran sont présentes dans l'espace intercellulaire sous forme d'une couche monomoléculaire et sont adsorbées sur les surfaces cellulaires adjacentes (d'après CHIEN S. et JAN K.M., 1973) (39). 45
- Figure 17:** Diagramme schématique représentant la dynamique du processus de formation des rouleaux. La partie inférieure de la figure représente l'agrandissement de la section intervenant dans le pontage. Il faut noter la rotation de la membrane des hématies, qui rend possible la formation des pontages parallèles multiples (d'après CHIEN S. et JAN K.M. ,1973) (39). 45
- Figure 18:** Isothermes d'adsorption de deux dextrans sur la membrane érythrocytaire ($T = 21^{\circ}\text{C}$) (d'après BROOKS D.E. et coll. 1980) (24). 46
- Figure 19:** Isotherme d'adsorption d'un dextran 36,5 kDa sur des hématies. Les résultats expérimentaux sont obtenus à partir des équilibres de désorption (d'après BROOKS D.E. et coll.1980) (24). 47
- Figure 20:** Modèle de la déplétion de l'agrégation érythrocytaire. Les macromolécules ne s'adsorbent pas sur les membranes des hématies. L'approche de deux cellules induit un recouvrement des zones de la déplétion, qui entraîne l'attraction des cellules et provoque des agrégats. (d'après BÄUMLER H. et coll.1989) (11). 49
- Figure 21:** Profil de concentration $\phi(x)$ en polymère dans une couche déplétée à la distance x de la surface particulaire. (ϕ désigne la concentration en polymère dans la solution) (d'après GAST A.P. et LEIBLER L. 1986) (80). 50
- Figure 22:** Relation logarithmique entre la viscosité sanguine et le taux de cisaillement dans le sang normal à hémocrite 0,45 l/l (Phénomène de fluidification) (d'après CHIEN S. et SUNG L.A.,1986) (46). 52
- Figure 23:** Variation de $4v/r$, où v représente la vitesse moyenne et r le rayon du vaisseau, dans différentes parties de la circulation. A: artères; Cap: capillaires; V: veines. Le paramètre $4v/r$ donne une estimation grossière du taux de cisaillement dans ces vaisseaux. (d'après CHIEN S. et SUNG L.A., 1986)(46). 54
- Figure 24:** Variations expérimentales de l'énergie de surface γ des hématies avec la concentration ϕ en dextran ($I=150\text{mM}$, $H=0,45$, $T=20^{\circ}\text{C}$) (d'après SNABRE P.1988) (203). (résultats obtenus à partir de la mesure de la contrainte critique τ_c de désagrégation de la suspension des hématies par une technique de réflectométrie optique). 59
- Figure 25:** Variations expérimentales de l'index d'agrégation RAI (reflectometric aggregation index) des hématies avec la concentration en dextran 80 et la force ionique I du milieu de suspension. (d'après CHIEN S. et JAN K.M. 1973) (39). 60
- Figure 26:** Effets des dextrans sur l'agrégation des hématies d'un sang normal (pointillé) et traitées par la neuraminidase (traits pleins). On remarque que les hématies traitées par la neuraminidase agrègent plus fortement que les hématies normales et qu'elles ne présentent plus les phases de la désagrégation pour les fortes concentrations en dextran (d'après CHIEN S. et JAN K.M. 1973) (39). 61

- Figure 27:** Variation de Index d'agrégation en fonction du taux d'hématocrite (d'après DENG et coll. 1994) (56). 63
- Figure 28:** Schéma de principe d'un viscosimètre à cylindres coaxiaux rotatifs de type Couette. (1) dispositif de mesure du couple mécanique; (2) fil de torsion; (3) cuve thermostatée à 25°C; (4) plongeur; (5) sang à hématocrite 45%; (6) moteur tournant à la vitesse de rotation Ω réglable. Les caractéristiques du viscosimètre du laboratoire sont: L=7mm, R=4mm, e=1mm. Les cylindres intérieur et extérieur sont réalisés en acier inoxydable (D'après LACOMBE C. et LELIEVRE J.C. 1986°(117) . 69
- Figure 29:** (a) Schéma de l'appareil et (b) agrégation des hématies en fonction du temps (d'après SHIGA T. et MAEDA N. 1989) (199). 72
- Figure 30:** Syllectogramme : diminution de la lumière transmise (passage à l'état "random cell flow", puis augmentation de la transmission due à la formation des rouleaux (d'après KLOSE H.J. et coll.1972) (111). 76
- Figure 31:** Agrégamètre automatique (Myrenne GmbH). 76
- Figure 32:** Représentation schématique de l'Erythroagrégamètre. 78
- Figure 33:** Cinématique d'agrégation : enregistrement du flux lumineux rétrodiffusé en fonction du temps après arrêt du moteur au temps zéro. 79
- Figure 34:** Exemples d'enregistrement des variations de R_{DO} et R_{DD} en fonction de la vitesse de cisaillement (de 480 à 5 s^{-1}) pour différents échantillons du sang. 80
- Figure 35:** Variations de R_{DD} (réflexion maximum) en fonction de la vitesse de cisaillement. 80
- Figure 36:** Représentation schématique d'un cisaillement continu ou pulsé (l'amplitude de 30%.) appliquée à une suspension sanguine. 86
- Figure 37 A:** Comparaison entre tA continu et tA pulsé dans le sang normal à une amplitude de cisaillement 30% aux vitesses de cisaillement de 150 sec^{-1} à 25 sec^{-1} (décroissantes ou croissantes). (Délai entre chaque cisaillement : 5sec., 10sec. ou 15sec. Délai entre les modes continu et pulsé : 20 sec. Fréquence : 1 Hz. n = 2). 89
- Figure 37 B:** Comparaison entre tA continu et tA pulsé dans le sang normal à une amplitude de cisaillement 30% aux vitesses de cisaillement de 50 sec^{-1} à 10 sec^{-1} (décroissantes ou croissantes). (Délai entre chaque cisaillement : 5sec., 10sec. ou 15sec. Délai entre les modes continu ou pulsé : 20 sec. Fréquence : 1 Hz. n = 2). 90
- Figure 38:** Comparaison entre tA continu et tA pulsé dans le sang normal à une amplitude de cisaillement 30% avec les fréquences de 1 Hz, 2Hz ou 4 Hz. (vitesses de cisaillement de 150 sec^{-1} à 25 sec^{-1} ou de 50 sec^{-1} à 10 sec^{-1} dans le sens décroissants, 20 sec. du délai entre les modes continu ou pulsé, n = 3). 91
- Figure 39:** Effet du fibrinogène (2,5 g/l) sur tA continu et tA pulsé à une amplitude de cisaillement 30% en comparaison avec le sang normal. (vitesses de cisaillement de 150 sec^{-1} à 25 sec^{-1} ou de 50 sec^{-1} à 10 sec^{-1} dans le sens décroissant ou croissant, délai entre les deux modes : 20sec., fréquence : 1 Hz, n = 5). 94

<i>Figure 40: Effet de IgG (12 g/l ajouté) sur tA continu et tA pulsé à l'amplitude de cisaillement 30% en comparaison avec le sang normal. (vitesses de cisaillement de 150 sec⁻¹ à 25 sec⁻¹ ou de 50 sec⁻¹ à 10 sec⁻¹ dans le sens décroissant ou croissant, délai entre les deux modes : 20sec., fréquence : 1 Hz, n = 1).</i>	95
<i>Figure 41: Influence du régime d'écoulement pulsé à une amplitude de cisaillement de 30% sur tA continu et tA pulsé dans le cas d'un sang de diabétique. (vitesses de cisaillement de 150 sec⁻¹ à 25 sec⁻¹ ou de 50 sec⁻¹ à 10 sec⁻¹ dans le sens décroissant ou croissant, délai entre les deux modes : 20sec., fréquence : 1 Hz, n = 1).</i>	96
<i>Figure 42: Effet de la substitution du plasma par l'albumine (5g/l) sur tA continu et tA pulsé à une amplitude de cisaillement 30% en comparaison avec le sang normal. (vitesses de cisaillement de 150 sec⁻¹ à 25 sec⁻¹ ou de 50 sec⁻¹ à 10 sec⁻¹ dans le sens décroissant, fréquence : 0,5 Hz et 1 Hz, n = 1).</i>	97
<i>Figure 43: Evolutions de tA continu et tA pulsé en fonction du cisaillement dans le cas d'un sang normal. En régime pulsé, l'amplitude de pulsation est égale à 75% et les fréquence de pulsation ont été fixées à 0,5, 1 et 2 Hz.</i>	99
<i>Figure 44: Etude comparative de tA continu et tA pulsé en fonction de la vitesse de cisaillement avec une fréquence de pulsation variant entre 0,5 et 3 Hz et une amplitude de pulsation de 75% (sang normal).</i>	101
<i>Figure 45: Effet du fibrinogène (2,5 g/l) sur tA pulsé (amplitude de pulsation 75%, fréquence variant entre 0,5 et 3 Hz) et tA continu.</i>	102
<i>Figure 46: Effet des IgG (12 g/l) sur tA pulsé (amplitude de pulsation : 75%, fréquence variant entre 0,5 et 3 Hz) et tA continu.</i>	103
<i>Figure 47: Effet de l'albumine (5 g/l) sur tA pulsé (amplitude de pulsation : 75%, fréquence variant entre 0,5 et 3 Hz) et tA continu.</i>	104
<i>Figure 48: Comparaison entre tA pulsé (amplitude de pulsation : 75%, fréquence variant entre 0,5 et 3 Hz) et tA continu dans le cas d'un choc septique.</i>	106
<i>Figure 49: Système d'analyse d'images.</i>	112
<i>Figure 50: Coupe schématique de la chambre rhéoscope proprement dite. (d'après SCHMID-SCHONBEIN H. et coll;)(187).</i>	113
<i>Figure 51: Schéma des mouvements secondaires créés dans le cône-plan du rhéoscope aux grandes vitesses de cisaillement (d'après HEUSER G. 1977) (93).</i>	114
<i>Figure 52: Schéma général du système d'analyse d'images.</i>	115
<i>Figure 53: Représentation schématique des relations entre les différents menu et tableaux.</i>	117
<i>Figure 54: Représentation d'une zone d'intérêt.</i>	119
<i>Figure 55: Etablissement d'un contraste sur une zone d'intérêt définie.</i>	120
<i>Figure 56: Agrandissement d'image (x2).</i>	120

<i>Figure 57: Représentation des objets dont le contour a été défini.</i>	123
<i>Figure 58: Influence de deux cisaillements successifs sur la valeur de l'indices K (n=5).</i>	127
<i>Figure 59: Influence du nombre d'objets sur la valeur de l'indice K en fonction du temps (n = 6).</i>	128
<i>Figure 60: Variation de l'indice K en fonction du nombre d'objets traités (n = 6).</i>	129
<i>Figure 61: Variations de la valeurs de l'indice K dans différentes situations d'agrégation érythrocytaire.</i>	131
<i>Figure 62: Image de la suspension d'hématies normales dans du plasma autologue à l'hématocrite à 0,2 l/l.</i>	131
<i>Figure 63: Image de la suspension d'hématies comportant de l'albumine 30 g/l à hématocrite final 0,2 l/l.</i>	132
<i>Figure 64 Image de la suspension d'hématies comportant de fibrinogène 2,5 g/l à l'hématocrite final 0,2 l/l.</i>	132
<i>Figure 65: Relations de l'indice K avec les paramètres de la rétrodiffusion laser. (n = 10).</i>	134
<i>Figure 66: Dérivés du 2, 4, 6 triiodobenzène substitué par les groupements R1,R2,R3.</i>	141
<i>Figure 67: Les quatre types de molécules iodées (1) "monomères" ioniques; (2) "monomères" nonioniques;. (3) "dimères" monoioniques; (4) "dimères" nonioniques. Les groupements sont des groupements carbamoyles ou carboxamides.</i>	143
<i>Figure 68: Effet de différentes proportions de NaCl et de Saccharose hyperosmolaire sur les paramètres de l'agrégation érythrocytaire (n = 5).</i>	155
<i>Figure 69: Effet de l'loxaglate sur la cinétique de formation des rouleaux d'hématies.</i>	156
<i>Figure 70: Effet de l'loxaglate sur l'indice d'agrégation S10 et sur l'indice de structure IS.</i>	157
<i>Figure 71: Effet de l'loxaglate sur la cohésion des rouleaux d'hématies.</i>	158
<i>Figure 72: Effet de l'lohexol et de l'lopamidol sur la cinétique de formation des rouleaux d'hématies.</i>	160
<i>Figure 73: Effet de l'lohexol et de l'lopamidol sur la l'indice d'agrégation S10 et sur l'indice de structure IS.</i>	161
<i>Figure 74: Effet de l'lohexol et de l'lopamidol sur la cohésion des rouleaux d'hématies.</i>	162
<i>Figure 75: Effets des produits de contraste ionique et non ioniques sur l'indice d'agrégation K en fonction du temps.</i>	163
<i>Figure 76: Echninocytes dans l'échantillon comportant 20% V/V d'lohexol .</i>	165
<i>Figure 77: Nombreux échninocytes dans l'échantillon comportant 20% V/V d'lopamidol.</i>	165
<i>Figure 78: Formation des rouleaux et des réseaux dans l'échantillon comportant 20 % V/V d'loxaglate</i>	166

Figure 79: Représentation de la localisation des sondes fluorescentes DHP et TMA-DPH dans la membrane.	173
Figure 80: Inhibition de la fluorescence émise par le TMA-DPH et le DPH par les produits de contraste (25% V/V) (n = 6).	175
Figure 81: Inhibition de la fluorescence émise par le TMA-DPH et le DPH en fonction de la concentration en produits de contraste. F0 correspond à l'intensité de fluorescence observée du NaCl isotonique (n = 3).	177
Figure 82: Représentation des droites de Stern-Volmer pour TMA-DPH et DPH en fonction de la concentration en iode présent dans les différents produits de contraste. (n = 3).	178
Figure 83: Représentation schématique de la cellule d'électrophorèse cellulaire.	182
Figure 84: Effet des produits de contraste sur la mobilité électrophorétique des hématies à 25°C. (n=5)	184
Figure 85: Variation de η_{sp}/c en fonction de la force ionique du milieu suspendant.	187
Figure 86: Influence du vieillissement de l'échantillon sur la viscosité sanguine en fonction de la vitesse de cisaillement.	221
Figure 87: Influence du vieillissement de l'échantillon sur l'indice d'agrégation (Myrenne).	222
Figure 88: Influence du vieillissement de l'échantillon sur la cinétique et la cohésion des rouleaux d'hématies (Erythroagregamètre).	223
Figure 89: Influence du traitement des hématies par la chaleur sur les paramètres d'agrégation (Erythroagregamètre).	226

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	<i>Numération des éléments figurés du sang (nombre par mm³) (d'après BESSIS M.1972) (14).</i>	7
Tableau II.	<i>Hématocrite normal (II) (d'après BESSIS M. 1972) (14).</i>	8
Tableau III.	<i>Principaux constituants protéiques et ioniques du plasma humain (8).</i>	9
Tableau IV.	<i>Unités de paramètres rhéologiques.</i>	30
Tableau V.	<i>Constituants de la microcirculation (d'après BOISSEAU M.R.) (15).</i>	38
Tableau VI.	<i>Reproductibilité de la détermination de tA continu et tA pulsé</i>	88
Tableau VII.	<i>Reproductibilité de l'indice K (x10⁻²).</i>	130
Tableau VIII.	<i>Evolution des produits de contraste.</i>	141
Tableau IX.	<i>Osmolalité des produits de contraste.</i>	150
Tableau X.	<i>Viscosité (mPa.sec) des milieux utilisés pour la détermination des paramètres d'agrégation des hématies.</i>	151
Tableau XI.	<i>Effet des produits de contraste sur la mobilité électrophorétique des hématies à 25°C.(n=5).</i>	184
Tableau XII.	<i>Densité et viscosité des milieux suspendants.</i>	185
Tableau XIII.	<i>Influence de l'accélération lors d'une centrifugation (n=10).</i>	220
Tableau XIV.	<i>Effet du traitement des hématies par la chaleur sur l'agrégation et sur la viscosité sanguine (n = 5).</i>	225

INTRODUCTION GENERALE

Des milliers de gestes diagnostiques exigeant l'utilisation de produits de contraste pour permettre la visualisation et augmenter le contraste des tissus sont effectués dans une journée à travers le monde. Avant la dernière décade, les seuls produits de contraste disponibles étaient des composés ioniques. Ils ont provoqué dans certains cas, des réactions hémodynamiques qui ont parfois entraîné la mort.

Au début des années 1980, des produits de contraste non ioniques de faible osmolalité ont été introduits et développés très largement car leur utilisation apparaissait sans danger. De fait, les réactions secondaires de type hémodynamique étaient diminuées. Toutefois, l'intérêt de produits de contraste non ioniques a été remis en cause. En effet, un risque thrombogénique potentiel pour les agents non ioniques a été découvert, dans certains groupes de patients (personnes âgées, diabétiques, fumeurs).

Ces observations ont entraîné une extension des recherches sur les produits de contraste et la revue *Science Watch* en mars 1991 identifiait les produits de contraste ioniques et non ioniques "as one of the 10 hottest research areas of 1990".

Il est clair que dans ce contexte, des études de type rhéologique sur les produits de contraste peuvent contribuer à élucider leur mécanisme d'action.

Notre travail de thèse s'est inscrit dans cette démarche. Il a consisté en l'étude de l'action de produits de contraste ioniques et non ioniques sur le paramètre rhéologique microscopique qu'est l'agrégation érythrocytaire.

L'agrégation des hématies est un paramètre essentiel du comportement rhéologique non-newtonien du sang et a fait l'objet d'un grand nombre de recherches méthodologiques, expérimentales et cliniques. Toutefois, les mécanismes de formation des rouleaux et des agrégats en présence de macromolécules endogènes ou exogènes sont très complexes et de

nombreux points restent encore à élucider tant sur le plan des aspects fondamentaux que des approches méthodologiques.

Notre travail de thèse a comporté plusieurs types d'action qui ont été menées parallèlement :

- Des actions méthodologiques visant à améliorer la quantification de l'agrégation érythrocytaire et à approcher lors d'investigations "*in vitro*" les conditions d'agrégation qui pourraient être observées "*in vivo*".

C'est ainsi que nous avons été amené à étudier le rôle d'un cisaillement pulsé sur la cinétique de formation des rouleaux dans des conditions d'amplitude et de fréquence de pulsation, ainsi qu'avec des vitesses de cisaillement variables.

La sensibilité du système expérimental mis en jeu a permis de mettre en évidence des modifications discrètes de la cinétique d'agrégation dans des conditions de cisaillement bien précises.

Par ailleurs, les méthodes optiques telles que la rétrodiffusion laser ne permettent pas d'apprécier la morphologie des rouleaux et agrégats d'hématies, paramètre qui peut avoir une importance fondamentale au niveau de l'écoulement sanguin dans la microcirculation. Aussi, nous avons entrepris l'adaptation et la validation d'un logiciel d'analyse d'images pour la quantification de l'agrégation en termes de structure des rouleaux et agrégats et l'étude des relations possibles entre le paramètre donné par l'analyse d'images et ceux obtenus avec l'analyse de la rétrodiffusion laser.

- Le deuxième type d'action a été consacré à l'étude du rôle des produits de contraste ionique et non ioniques sur l'agrégation érythrocytaire en utilisant la rétrodiffusion laser et l'analyse d'images. L'interaction des produits de contraste ioniques et non ioniques apparaissant différentes, nous avons complété notre étude par des approches au moyen de méthodes spectroscopiques au niveau microscopique et moléculaire afin de préciser leur rôle

respectif. C'est ainsi que nous avons été amené à entreprendre des investigations en fluorescence en utilisant l'inhibition de l'iode contenu dans les produits de contraste. Par ailleurs, nous avons étudié le rôle des produits de contraste ioniques et non ioniques sur la charge électrique de la surface cellulaire.

La présentation de notre mémoire se fera de la façon suivante :

La première partie est consacrée à des rappels sur les constituants du sang, en particulier l'hématie, sur des notions élémentaires de rhéologie et sur les théories de l'agrégation érythrocytaire, les facteurs influençant ce phénomène et les méthodes d'étude.

La deuxième partie porte sur les résultats obtenus à la suite des actions méthodologiques :

- l'approche de l'agrégation des hématies soumises à un cisaillement pulsé d'amplitude et de fréquence variables.
- la détermination de l'agrégation érythrocytaire par analyse d'image à l'aide d'un rhéoscope couplé à un système d'analyse d'images (logiciel JAVA, Jandel Scientific).

La troisième partie rassemble l'ensemble des investigations réalisées avec les produits de contraste aussi bien les études rhéologiques que les études spectroscopiques et électrocinétiques.

Enfin, dans une **Annexe**, nous avons présenté les méthodes utilisées dans ce travail, des expériences préliminaires ayant été effectuées pour tester la sensibilité de l'Erythroagrégamètre qui a été l'équipement de référence utilisé pour déterminer l'agrégation érythrocytaire.

PREMIERE PARTIE

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

I - 1

**CARACTERISTIQUES ELEMENTAIRES DU
SANG HUMAIN**

I. INTRODUCTION

Au XVII^{ème} siècle, la circulation sanguine et les hématies ont été découvertes par l'anatomiste italien MALPIGHI (137) et le naturaliste hollandais LEEUWENHOEK (119). Depuis, malgré les progrès accomplis dans le domaine de l'hématologie, le fluide complexe qu'est le sang est toujours l'objet de recherches dans des disciplines variées : Biophysique, Rhéologie, Immunologie, Physiologie. Ceci est lié aux nombreuses fonctions assurées par le sang qui comprennent en particulier des activités de transport (oxygène et dioxyde de carbone) et une rôle immunologique de première importance.

Ce chapitre est consacré à des rappels sur le sang humain, les différents compartiments du sang avec une attention particulière sur les hématies qui ont fait l'objet de notre travail de recherche.

II. CONSTITUANTS DU SANG

Le sang est une suspension de cellules dans le plasma. Les cellules sanguines sont les hématies (ou érythrocytes), les leucocytes et les plaquettes (ou thrombocytes) (**Tableau I**).

Tableau I. Numération des éléments figurés du sang (nombre par mm³)
(d'après BESSIS M. 1972) (14)*

hématies	4,5-6 X 10 ⁶
leucocytes	4000-11000
plaquettes	15-30 X 10 ⁴

* sang normal

Les leucocytes comportent principalement les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les lymphocytes et les monocytes. Les leucocytes n'ont pas une taille identique. Le polynucléaire neutrophile est une cellule de 12 à 14 µm dont le noyau est segmenté en plusieurs lobes. Le monocyte a une taille plus importante que le polynucléaire. On distingue les lymphocytes selon leur taille : petit et grand lymphocyte. Le petit lymphocyte mesure 6 à 9 µm de diamètre avec un noyau très volumineux. Le grand lymphocyte a un diamètre de 9 à 15 µm avec un noyau moins volumineux (8). Les fonctions de chaque type de leucocyte sont différentes. Principalement, les leucocytes interviennent dans les réactions immunologiques et inflammatoires.

Les plaquettes sont des petites cellules (diamètre moyen de 2 à 5 µm) sans noyau. Les plaquettes tendent à s'agglutiner et à constituer des petits amas. Leur durée de vie moyenne dans le sang est de 8 à 10 jours. Les plaquettes jouent un rôle fondamental dans l'hémostase en intervenant dans la protection des endothéliums vasculaires, la formation de l'agrégation plaquettaire, la coagulation plasmatique par libération du facteur 3 plasmatique et la rétraction du caillot (8).

Le poids total du sang représente 8% du poids d'un adulte de 70 kg. Un kilo de sang occupant un volume d'un litre, le volume sanguin total sera, en termes statistiques de 5,6 litres, réparti en 2,5 litres pour les cellules sanguines et 3,1 litres pour le plasma (122).

L'hématocrite est un paramètre permettant de définir la proportion des hématies par rapport au sang total (cellules + plasma). Il s'obtient par centrifugation à grande vitesse d'un microtube. Il permet avec le dosage de la masse sanguine de connaître le volume globulaire total et, par soustraction, le volume plasmatique total (les leucocytes et les plaquettes ne sont pas pris en compte car normalement ils représentent un volume négligeable). Le **Tableau II** représente les valeurs normales de l'hématocrite.

*Tableau II Hématocrite normal (l/l)
(d'après BESSIS M. 1972.) (14)*

homme	0,40-0,50
femme	0,35-0,47
enfant	0,36-0,44
nouveau-né	0,44-0,62

II.1. Protéines du plasma

Le plasma, outre 90% d'eau, contient des sels minéraux, des protéines, des lipides et des glucides. Parmi ces éléments, les protéines du plasma sont les plus importantes notamment les γ -globulines, les α -globulines, l'albumine et le fibrinogène (8, 66).

L'albumine est une protéine globulaire ayant la forme d'un ellipsoïde dont le grand axe aurait 150Å de long et le petit 38Å. La masse moléculaire de l'albumine est de 68 kDa. L'albumine a une concentration élevée dans le plasma (45g/l) qui intervient de façon importante dans la pression oncotique. En revanche, le fibrinogène a une masse moléculaire élevée de l'ordre de 340 kDa et une concentration plasmatique physiologique de 2 à 4 g/l. Il joue un rôle essentiel au cours de la coagulation (processus irréversible).

Les globulines du plasma et du sérum sanguin peuvent être séparées par l'électrophorèse en plusieurs fractions: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 et γ . Leurs masses moléculaires sont élevées, en particulier l' α_2 lipoprotéine ($M = 5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ Da), la β lipoprotéine ($M = 32 \times 10^5$ Da) et les globulines γ ($M = 15 - 90 \times 10^4$ Da) (Tableau III).

Tableau III. Principaux constituants protéiques et ioniques du plasma humain (8)

	constituants protéiques		constituants ioniques (mEq/l)	
	concentration (g/l)	masse moléculaire (Dalton)		
albumine	45	68×10^3	Na^+	142
α_1 globulines	3	$40-55 \times 10^3$	K^+	5
α_2 globulines	6	150×10^3	Ca^{+2}	5
α_2 lipoprotéine		$5-20 \times 10^6$	Cl^-	103
β_1 lipoprotéine	4,5	32×10^5	HPO_4^-	2
γ globulines	12	$15-90 \times 10^4$		
fibrinogène	2-4	340×10^3		

Les γ globulines ou immunoglobulines (Ig) sont les supports des anticorps. Chaque groupe d'Ig comporte deux paires de chaînes polypeptidiques : une paire de chaînes légères commune à tous les groupes d'Ig et une paire de chaînes lourdes, propres à chaque groupe d'Ig permettant de distinguer les IgG ($M = 15 \times 10^4$ Da), IgA ($M = 16 \times 10^4$ Da), IgM ($M = 90 \times 10^4$ Da), IgD ($M = 185 \times 10^3$ Da) et IgE ($M = 20 \times 10^4$ Da).

Par ailleurs, au cours d'une réaction inflammatoire, les macrophages et les phagocytes mononuclés sécrètent des polypeptides : l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) qui participent aux réactions de défense contre l'infection.

Il est bien admis actuellement qu'au cours de la phase aiguë d'une réaction inflammatoire l'IL-6, l'IL-1 et TNF contrôlent la synthèse protéique au niveau des hépatocytes en augmentant les protéines inflammatoires (113,192) et en diminuant les concentrations d'albumine et de préalbumine (57,192).

Chez l'homme, les protéines inflammatoires sont (82) :

- l' α_1 -glycoprotéine acide ou orosomucoïde
- l' α_1 -protéinase inhibiteur ou α_1 -antitrypsine
- l' α_1 -antichymotrypsine
- l'haptoglobine
- la protéine C réactive
- la sérum amyloïde A protéine
- la céruléoplasmine
- le fibrinogène

Les fragments du complément C3a, C5a, C3b jouent aussi des rôles importants dans la réaction inflammatoire (193, 219).

II.2. Hématie

Les hématies naissent dans la moëlle osseuse, vivent en moyenne 120 jours dans la circulation et sont détruites dans le système réticuloendothélial.

L'hématie se caractérise par une absence de noyau et d'organistes cytoplasmiques. A l'état physiologique, les hématies ont la forme de disques biconcaves (discocytes). La partie centrale est plus mince que le bord. Leur diamètre moyen est de 7 à 8 μ m (81). (Figures 1 , 2 et 3)

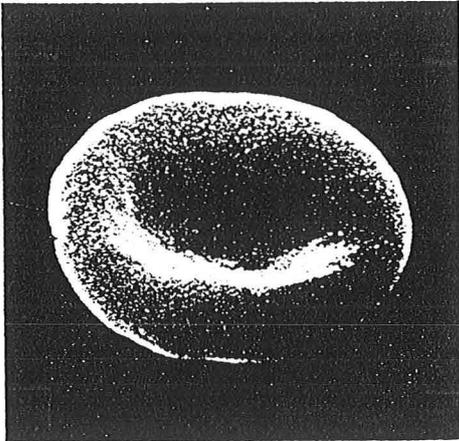
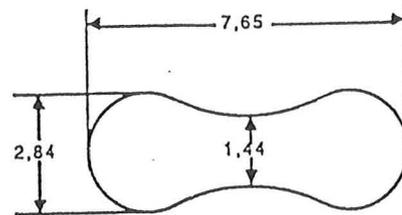


Figure 1: Discocyte normal (hématie de forme biconcave) (d'après BESSIS M.1972) (14).



Surface: $129,95 \mu\text{m}^2$
 Volume: $97,91 \mu\text{m}^3$

Figure 2: Géométrie d'une hématie humaine normale (d'après FUNG Y.C. et coll. 1981)(79).

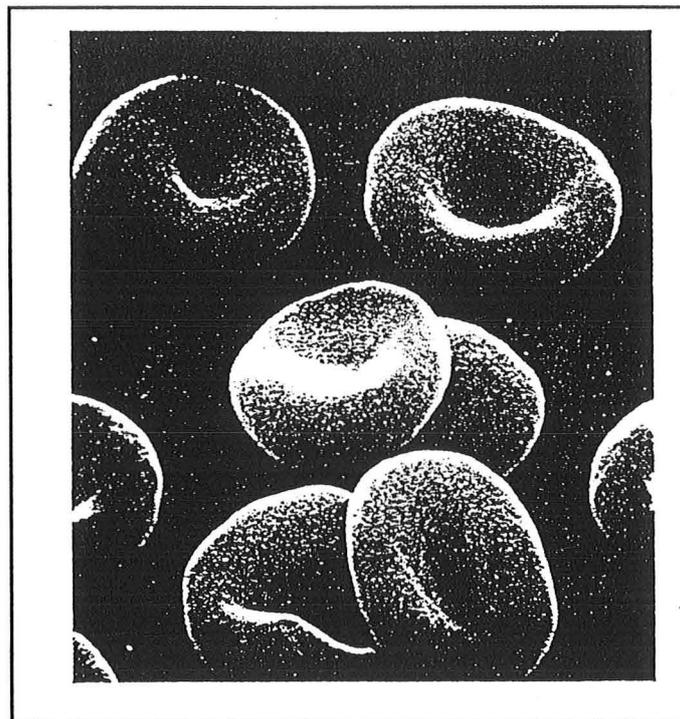


Figure 3: Hématies normales suspendues dans du sérum (microscopie électronique à balayage) (d'après BESSIS M.1972) (14).

Une hématie est en fait une membrane contenant de l'hémoglobine qui transporte l'oxygène vers les tissus et le dioxyde de carbone vers les poumons.

II.2.1. Hémoglobine

Le profil électrophorétique de l'hémoglobine caractéristique de l'adulte présente deux différentes formes d'hémoglobines (Hb) : l'hémoglobine A, et l'hémoglobine A₂. Elles se distinguent par la nature des sous-unités α , β et δ qui sont les diverses chaînes polypeptidiques des hémoglobines. L'hémoglobine A, correspondant à la formule $\alpha_2\beta_2$, représente plus de 95% de la totalité des hémoglobines. L'hémoglobine A₂ ($\alpha_2\delta_2$) est exprimée à un taux d'environ 2,5% (25, 223).

Le poids moléculaire de l'hémoglobine a été déterminé : d'après le contenu en fer (0,33%), il ne pouvait être qu'un multiple de 16,6 kDa. La valeur de 67 kDa, obtenue par mesure de la pression osmotique, imposait une structure tétramérique (1).

A la concentration intra-érythrocytaire (5mM), l'hémoglobine est essentiellement sous forme de tétramères. En effet, quatre sous-unités s'associent dans une symétrie tétraédrique pour former la molécule d'hémoglobine, structure globulaire de 6,5 x 5 x 5,5 nm. Il existe trois zones de contact entre sous-unités identiques (223) (Figure 4). Différentes zones de contact jouent des rôles importants lors de la transition entre les configurations oxygénée et désoxygénée de la molécule d'hémoglobine.

Le rôle principal de l'hémoglobine est le transport de l'oxygène des poumons aux tissus. Il ne faut cependant pas négliger son implication dans l'élimination du gaz carbonique et le maintien du pH intra-érythrocytaire.

Par ailleurs, l'hémoglobine est un fluide newtonien de viscosité 6 à 7 mPa.sec pour une concentration en hémoglobine comprise entre 31 - 34 g/l (32, 55).

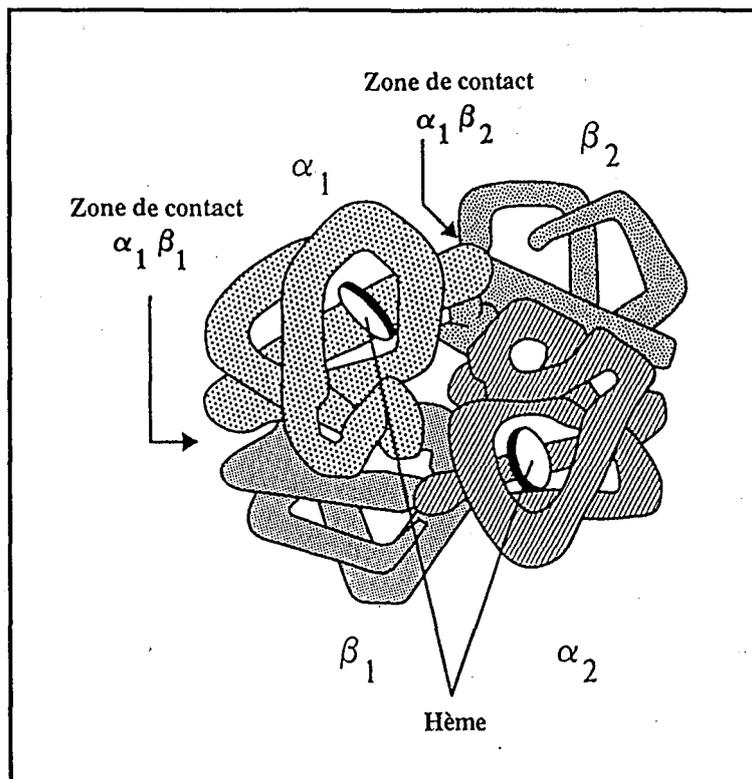


Figure 4: Le tétramère d'hémoglobine et ses différentes zones de contact (d'après WAJCMAN H. et coll. 1992)(223).

II.2.2. Membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire, à l'image de celle des autres cellules de l'organisme, est essentiellement constituée de lipides et de protéines. Les lipides représentent environ 50% du poids sec membranaire et sont organisés en une bicouche de composition asymétrique. Les protéines de la membrane se classent en trois catégories : les protéines transmembranaires (ou protéines intégrales); les protéines du cytosquelette et les protéines de liaison. Les lipides et les protéines sont les deux espèces moléculaires présentes dans les membranes. Les carbohydrates ne sont pas des constituants indépendants. On les trouve toujours associés aux lipides et aux protéines sous forme de glycolipides et de glycoprotéines (198).

II.2.2.1. Lipides

Trois familles de lipides entrent dans la constitution de la bicouche lipidique : les phospholipides (63%), les sphingolipides (11%) et le cholestérol (26%).

Les phospholipides (sphingomyéline SM, phosphatidylcholine PC, phosphatidylsérine PS et phosphatidyléthanolamine PE) se répartissent asymétriquement entre la couche interne et la couche externe. Les phospholipides à tête choline, SM et PC, sont principalement localisés sur le feuillet externe de la membrane. La majorité de la PE et la quasi totalité de la PS sont situées à l'inverse dans le feuillet interne (157,228). Les PS se différencient des autres phospholipides par leur charge négative qui tapissent la face interne de la membrane. Les glycosphingolipides sont exclusivement localisés dans le feuillet externe de la membrane où ils constituent des récepteurs ou des antigènes (207).

La distribution asymétrique lipidique de la membrane est maintenue par deux mécanismes indépendants :

- Un processus actif, ATP - dépendant, de translocation des PE et des PS vers le feuillet interne (196).
- Une interaction avec les protéines du squelette membranaire, essentiellement avec la spectrine, stabilisant ces phospholipides (2).

Le cholestérol est intercalé entre les molécules de phospholipides.

II.2.2.2. Protéines membranaires

Les protéines membranaires de l'hématie sont généralement identifiées par le traitement de membranes isolées d'hématies avec du sodium-dodécylsulfate (SDS) et sont parfaitement individualisées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (76). La mobilité des protéines dans un champ électrophorétique dépend de leur taille moléculaire. La Figure

5 représente les bandes des protéines qui sont détectées à partir du haut du gel, où les espèces de masse moléculaire élevées sont localisées.

Les protéines de la membrane de l'hématie sont constituées des protéines du cytosquelette qui forment un réseau protéique situé à la face interne de la membrane, des protéines de liaison qui connectent les protéines du cytosquelette et les protéines intégrales transmembranaires qui sont insérées dans la bicouche lipidique perpendiculairement au plan de la membrane,

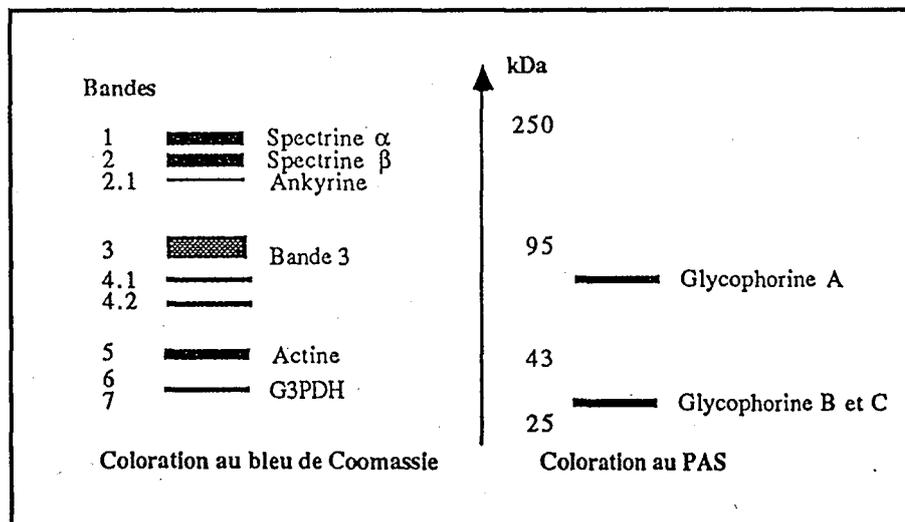


Figure 5 : Représentation schématique d'un tracé électrophorétique des protéines membranaires. [G3PDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; PAS : periodic acid Schiff (coloration spécifique des esters d'acide sialique)] (d'après WAJCMAN H. et coll 1992) (223).

A) Protéines du cytosquelette

Le cytosquelette est responsable de la forme, normale ou anormale des hématies, et représente environ 60% de la masse protéique de la membrane. Trois protéines constituent un réseau : spectrine, actine et tropomyosine (Figure 6) (47).

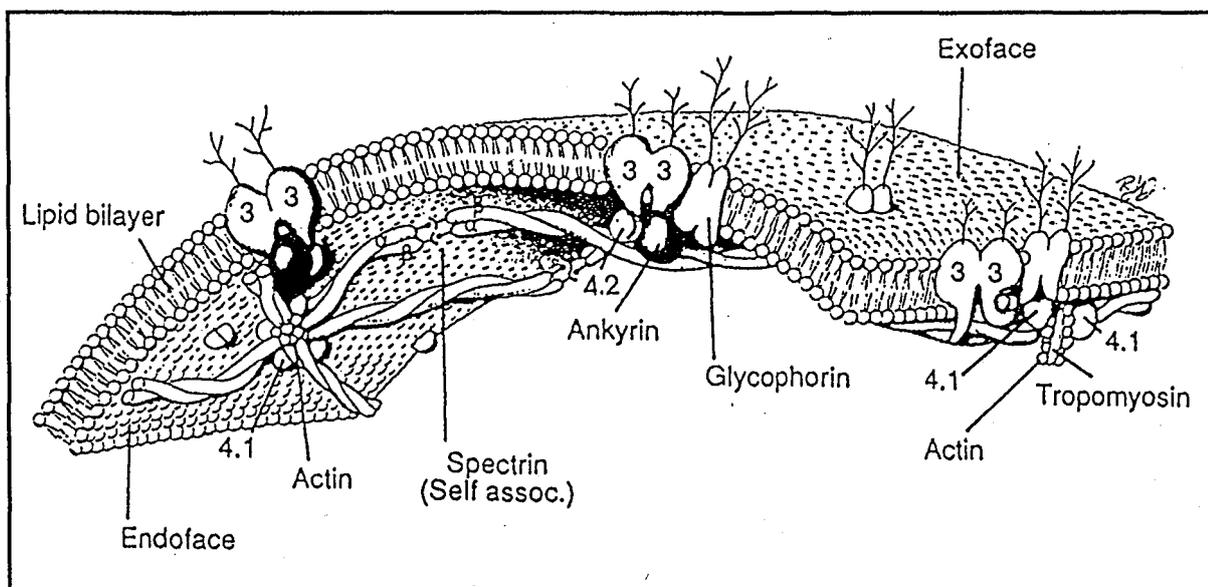


Figure 6 : Schéma de l'organisation des protéines de l'hématie (d'après CHIEN S. et SUNG L.A. 1990) (47).

1) Spectrine

La spectrine, composant majeur du cytosquelette, est une longue protéine fibrillaire de masse moléculaire 460 kDa, constituée de chaînes polypeptidiques α et β de masse moléculaire 240 kDa et 220 kDa, correspondant respectivement aux bandes 1 et 2 de l'électrophorèse. Cette protéine fait partie d'une famille de protéines dimériques, interagissant avec l'actine. Les dimères de spectrine s'associent in vitro en tétramères selon un équilibre régi par les conditions de température et de force ionique (173). Le tétramère est la forme physiologique (105). Les tétramères de spectrine s'unissent à d'autres molécules de spectrine à leur extrémité distale par l'intermédiaire de courts filaments d'actine formant les noeuds de la maille du squelette membranaire de l'hématie.

2) Actine

L'actine constitue un composant majeur du cytosquelette de toutes les cellules. L'actine érythrocytaire est organisée en doubles filaments hélicoïdaux (F-actine), et s'associe étroitement avec la tropomyosine (77). Le rôle essentiel de l'actine de la membrane érythrocytaire est d'interagir avec la protéine 4.1 et la spectrine pour former un complexe ternaire qui permet la formation du réseau squelettique.

3) *Tropomyosine*

La tropomyosine a été identifiée dans la membrane de l'hématie humaine comme un dimère avec deux polypeptides de 29 et 27 kDa (77). La tropomyosine se lie à la F-actine à raison d'un dimère de tropomyosine pour 7-8 monomères de l'actine. La tropomyosine de l'hématie stabilise les filaments de l'actine et régularise l'interaction entre la spectrine et l'actine.

B) Protéines de liaison érythrocytaires

Ces protéines lient les protéines squelettiques qui forment un réseau parallèle à la membrane et les protéines transmembranaires intégrales qui sont ancrées dans la bicouche lipidique perpendiculaire au plan membranaire. Les protéines de liaison offrent ainsi des liaisons pour la formation d'un réseau protéique membranaire tridimensionnel. Les protéines de bande 2.1 (ankyrine), 4.1 et 4.2 sont la majorité des protéines de liaison.

1) *Protéine 4.1*

C'est une phosphoprotéine présentant une masse moléculaire de 80 kDa environ. Un domaine central de 10 kDa de la protéine 4.1 lie l'extrémité de la spectrine, conduisant à une augmentation marquée de l'affinité de la spectrine avec l'actine dans la membrane de l'hématie (127), alors qu'un autre domaine de 30 kDa de la protéine 4.1 lie les protéines transmembranaires. L'importance de la protéine 4.1 comme protéine de liaison est renforcée par ses liaisons entre plusieurs glycoprotéines transmembranaires telles que la glycophorine A, la glycophorine C et la protéine du bande 3 couplant ainsi le réseau horizontal avec les protéines insérées verticalement dans la membrane.

2) *Ankyrine*

L'ankyrine érythrocytaire (protéine 2.1) est une protéine globulaire de 210 kDa qui attache la spectrine à la protéine 3. Elle lie également les autres protéines intégrales transmembranaires.

3) Protéine 4.2

La protéine 4.2 qui représente 5% environ de la masse protéique membranaire de l'hématie, interagit avec la protéine 3, l'ankyrine et la protéine 4.1. Elle permet probablement la stabilisation de l'ankyrine dans la membrane. Deux isoformes de 77 et 80 kDa différenciées par 30 aminoacides ont été obtenues.

C) Protéines transmembranaires

Des protéines intégrales de la membrane érythrocytaire pénètrent partiellement dans la bicouche lipidique au niveau des faces externes ou internes, mais la majorité des protéines intégrales sont des protéines transmembranaires qui traversent la bicouche entière, par exemple les glycophorines et la protéine de bande 3. Ces glycoprotéines ont un domaine extracellulaire avec leurs groupements carbohydrates saillant dans le milieu environnant, un domaine intramembranaire consistant en segments de peptides avec des aminoacides hydrophobiques et un domaine cytoplasmique qui interagit avec le réseau du cytosquelette (47).

1) Bande 3

La bande 3 (encore appelée la protéine de bande 3 ou l'échangeur d'anions érythrocytaire), dont la masse moléculaire est d'environ 95 kDa, est la principale protéine intrinsèque de la membrane. Elle représente à elle seule 25% des protéines membranaires. Elle peut schématiquement se diviser en deux parties : un domaine transmembranaire de 52 kDa, et un domaine cytoplasmique d'environ 40 kDa (69, 115). Par son domaine transmembranaire, la protéine de bande 3 joue un rôle majeur dans le transport des anions (échange de Cl^- - HCO_3^-). Par son domaine cytoplasmique, où existe une forte concentration de résidus négativement chargés, la bande 3 occupe une position-clé dans les interactions entre protéines, en fixant les protéines membranaires 4.1, 4.2 et l'ankyrine. Le segment cytoplasmique possède également des sites à forte affinité pour certaines protéines cytoplasmiques telles que l'hémoglobine, l'aldolase, la glycéraldéhyde-3-phosphate

déshydrogénase (G3PDH) et la phosphofructokinase (PFK). Ces sites, observés *in vitro*, pourraient avoir une signification physiologique dans la régulation de la glycolyse, en aidant à la formation de complexes multi-enzymatiques (138).

2) *Glycophorines*

Les glycophorines sont les sialoglycoprotéines transmembranaires qui consistent en un segment glycosylé extracellulaire ayant probablement une fonction de récepteur, un segment hydrophobique intramembranaire traversant la bicouche membranaire et un segment cytoplasmique qui interagit avec la membrane interne ou les protéines cellulaires (132). Quatre bandes de glycophorines ont été obtenues : glycophorine A, B, C et D (47) ayant une masse moléculaire de 36, 20 32 et 23 kDa, respectivement. La glycophorine A représente une fraction importante (85%) des glycophorines. Il y a une liaison phosphatidylinositol-dépendant entre la protéine 4.1 et la glycophorine A. Cette interaction offre un site d'attache pour le réseau squelettique à la bicouche membranaire.

II.2.2.3. Mouvements de la membrane

La membrane n'est pas une entité statique, mais les mouvements dans le plan de la membrane affectent en permanence les lipides et les protéines. Les mouvements principaux sont de plusieurs types (3) :

A) Mouvements des lipides

- Diffusion latérale : des mouvements dans le plan de la membrane affectant des phospholipides peuvent survenir, liés à la formation de lacunes dans la bicouche ou d'échanges directs entre molécules identiques;
- Flexibilité des phospholipides : des mouvements locaux, plus ou moins importants, fonction de la température et de la nature des chaînes hydrocarbonées, affectent ces dernières et traduisent une certaine flexibilité des chaînes;

- Diffusion transversale : la diffusion transversale des lipides ou phénomène de "flip-flop" est le procédé par lequel des lipides peuvent passer d'une partie de la bicouche à l'autre (Figure 7).

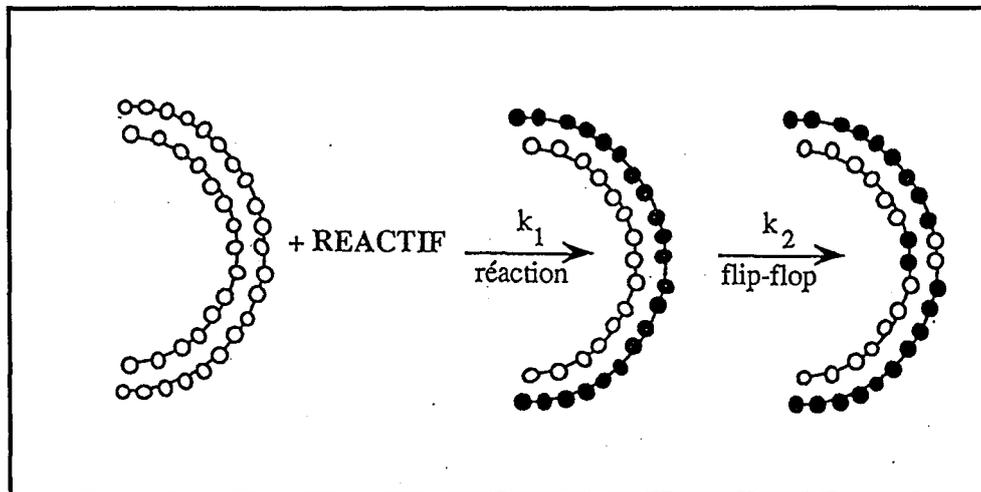


Figure 7 : Marquage de la monocouche externe suivie d'une diffusion transversale des lipides. Les points blancs et noirs schématisent respectivement les lipides non marqués et marqués (d'après SHECHTER E. 1990) (198).

B) Mouvements des protéines

- Diffusion latérale des protéines : la rapidité de la diffusion latérale de la protéine dépend du taux de déplacement des lipides et de l'apparition de volumes vides dans le périmètre de la protéine. Par conséquent, elle est fonction de la fluidité de la bicouche lipidique et, à un moindre degré, de la taille de la protéine ou de l'agrégation;
- Diffusion de rotation des protéines : certaines protéines membranaires peuvent tourner rapidement autour d'un axe normal au plan de la membrane. La protéine peut tourner seulement lorsqu'un volume vide de lipides se produit au voisinage de l'excroissance (Figure 8). Les protéines, comme les lipides, peuvent être animées de différents mouvements de rotation autour de leur axe de symétrie, mouvements de diffusion latérale, parallèlement au plan de la membrane. L'ordre

de grandeur des temps définissant ces mouvements de diffusion et de rotation est environ 10^4 fois plus faible que celui des phospholipides.

Les interactions entre lipides et entre lipides et protéines sont de nature hydrophobe au centre de la membrane, polaire aux interfaces. Elles se font et se défont continuellement. De ce fait, la membrane a un caractère dynamique, les lipides et les protéines étant animés de mouvements divers conférant à la membrane une certaine fluidité (cohésion). La fluidité de la membrane joue un rôle important dans le fonctionnement cellulaire. Elle régule la mobilité des récepteurs et vraisemblablement leur capacité à transmettre des signaux spécifiques à l'intérieur de la cellule.

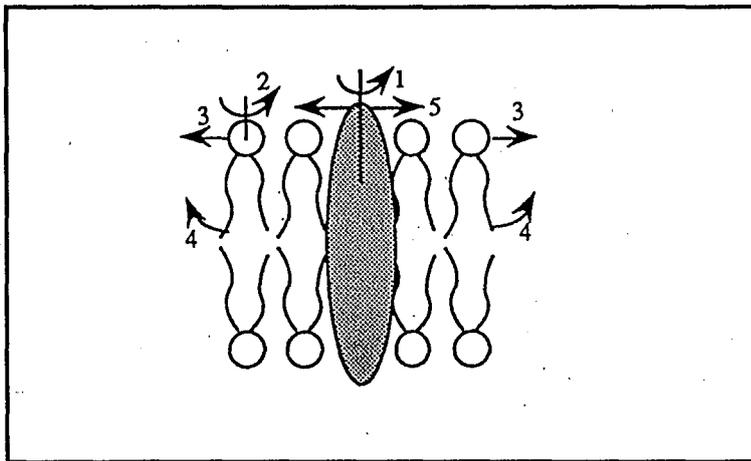
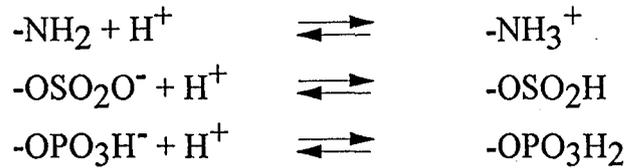


Figure 8 : Les divers mouvements des constituants membranaires. (1) Rotation des protéines; (2) rotation des lipides; (3) diffusion latérale des lipides; (4) mouvement de balancier des chaînes hydrocarbonées; (5) diffusion latérale des protéines (d'après SHECHTER E. 1990) (198).

II.2.2.4. Charge électrique de la surface de l'hématies

La surface cellulaire comporte des groupements chimiques ionisés présents sur les protéines, les lipides etc.





Les acides aminés acide et basique sont ionisés en milieu aqueux. La charge des groupements carboxyles et des groupements amines disparaît lors de la formation de liaisons peptidiques. Les protéines sont de nature amphotère, et à pH physiologique, les groupements acides sur les chaînes latérales des résidus glutamine et aspartate sont dissociés et portent une charge négative tandis que les groupements basiques de la lysine et de l'arginine portent des charge positives.

Les groupements COO^- de l'acide sialique (acide N-acétylneuraminique) constituent une grande partie du revêtement glycoprotéique extracellulaire (glycocalyx) des hématies. Ils sont responsables de la charge négative de surface.

A) Phénomène électrocinétique

Des particules ou des cellules en suspension dans un milieu électrolytique (NaCl isotonique par exemple) acquièrent une charge électrique soit par l'ionisation des groupes présents sur la surface cellulaire, soit par la redistribution des ions à l'interface particule/milieu. Lorsque les cellules sont en suspension, des ions opposés en signe aux charges présentes sur la surface cellulaire, appelés les contre ions, entourent la surface cellulaire et forment la double couche électrique. La concentration de ces contre ions décroît exponentiellement dans le milieu.

Une cellule, avec les contre ions de la double couche, forme une unité cinétique globale et si les cellules sont libres de se mouvoir, elles migreront sous l'influence d'un champ électrique. Le phénomène est appelé électrophorèse. Le potentiel créé par la charge de surface est appelé potentiel électrocinétique ou potentiel zêta.

B) Résolution mathématique du phénomène d'électrophorèse

Le calcul du potentiel zêta à partir de mesures de mobilité électrophorétique peut être effectué suivant de l'équation de Von-Smoluchowski avec:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{D} \mu$$

ou η et D sont la viscosité et la constante diélectrique du milieu suspendant et μ la mobilité électrophorétique exprimée en $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{cm}$ (142).

La valeur moyenne du potentiel zêta des hématies dans du NaCl isotonique est de -15mV à 25°C (41).

Parmi les facteurs jouant un rôle sur le potentiel zêta, on peut citer le pH et la force ionique.

RAPPELS SUR LA RHEOLOGIE DU SANG**I. INTRODUCTION**

La rhéologie se propose d'étudier, sous l'effet de contraintes, les régimes d'écoulement d'un fluide dont les propriétés peuvent être relativement simples (fluide newtonien) ou très complexes (fluide non newtonien).

Il est connu que les écoulements sanguins manifestent des propriétés non-newtoniennes (89). Un grand nombre de paramètres : physicochimiques, mécaniques, physiologiques et pathologiques interviennent dans ces écoulements. Les caractéristiques des écoulements sanguins sont très variables : unidirectionnelles, en régime stationnaire, pulsé, transitoire, intermittent, quelque fois instable voire turbulent (133). D'autres phénomènes entrent en ligne de compte : la déformabilité des hématies, l'effet Fåhræus, l'effet Fåhræus-Linqvist et les interactions entre les cellules du sang et la paroi vasculaire.

Dans ce chapitre, nous avons résumé quelques éléments théoriques sur les écoulements newtoniens et non-newtoniens. Par ailleurs, il nous a paru nécessaire de rappeler les propriétés rhéologiques du sang tant au niveau de la macrocirculation, que de la microcirculation.

II. RAPPELS THEORIQUES SUR LES ECOULEMENTS ET LES PARAMETRES D'INTERET

II. 1. Contrainte de cisaillement

Dans le cas d'un écoulement laminaire, les couches de fluides s'écoulent sans se mélanger. La déformation du fluide s'effectue par un glissement relatif de différentes couches les unes sur les autres. La distribution des vitesses dans un tube cylindrique affecte une forme parabolique, de telle sorte que la vitesse maximale se trouve au niveau de l'axe du tube, tandis qu'à proximité de la paroi la vitesse est plus lente (**Figure 9**) (122,167). Les couches de fluides glissent les unes sur les autres faisant apparaître ainsi des forces de frottement qui s'exercent tangentiellement à la surface de la couche. La force tangentielle de frottement (forces de cisaillement) s'exerçant sur une unité de surface est appelée la contrainte de cisaillement (170). Cette contrainte de cisaillement est un paramètre fondamental en rhéologie. On définit la contrainte de cisaillement comme le rapport de forces de cisaillement (F) par unité de surface (S) sur laquelle elles s'exercent :

$$\tau = \frac{F}{S}$$

τ , étant équivalent à une pression, s'exprime en dynes/cm² dans le système C.G.S. ou en Pascal dans le système S.I.

Un écoulement de type Poiseuille est un phénomène linéaire et il existe une proportionnalité entre le gradient de pression appliqué et le débit. Le taux de cisaillement est maximal à la paroi et proportionnel à la vitesse moyenne.

La contrainte de cisaillement d'un fluide newtonien est fréquemment étudiée dans un écoulement de type Poiseuille où seule la contrainte τ_{rZ} est non nulle pour des raisons de symétrie.

La contrainte moyenne $\langle \tau \rangle$ est donnée par la formule :

$$\langle \tau \rangle = \frac{1}{\pi R^2} \int_0^R \tau_{rz} \cdot 2\pi r dr$$

où R représente le rayon du tube cylindrique

or $\tau_{rz} = \frac{K}{2} r$ avec $K = \frac{dp}{dz}$ le gradient de pression

$$\Rightarrow \langle \tau \rangle = \frac{\pi}{\pi R^2} \int_0^R K r^2 dr = \frac{KR^3}{3R^2}$$

$$\langle \tau \rangle = \frac{KR}{3}$$

La contrainte pariétale $\tau_p = \tau_{rz}|_{r=R} = \frac{KR}{2}$

Ce qui donne :

$$\boxed{\langle \tau \rangle = \frac{2}{3} \tau_p}$$

La contrainte moyenne est plus faible que la contrainte pariétale et varie comme la vitesse moyenne ($\bar{v} = 2/3 V$; $V =$ vitesse maximale)

II.2. Vitesse de cisaillement

La vitesse relative de déplacement d'un fluide dans un tuyau s'appelle la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) qui est la dérivée par rapport au temps de la déformation $[\epsilon(x,t)]$:

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial}{\partial t} \epsilon(x,t) = \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial u}{\partial t} \right) = \frac{\partial v}{\partial x}$$

avec : v = vitesse

u = distance parcourue

$\dot{\gamma}$ exprimé en seconde inverse (sec^{-1}) qui décrit le mouvement du matériau dans l'espace au cours de temps, indépendamment des contraintes qui lui ont donné naissance.

II. 3. Nombre de Reynolds

Les écoulements sont fréquemment caractérisés par le nombre de Reynolds (Re)

$$Re = \frac{\rho \nabla d}{\eta}$$

∇ = vitesse moyenne du fluide

d = diamètre du tube

ρ = masse volumique

η = viscosité dynamique

Lorsqu'un fluide se déplace, deux types différents d'écoulement (laminaire et turbulent) peuvent se produire. Pour les nombres de Reynolds faibles, l'écoulement est laminaire. Pour des valeurs élevées, le régime devient turbulent. La transition entre écoulement laminaire et écoulement turbulent est considérée s'effectuer pour un nombre de Reynolds d'environ 2000. En effet, une viscosité réduite ou une vitesse trop élevée peut entraîner un écoulement turbulent. (Figure 9) (163, 167). Entre ces deux régimes, il peut se constituer des régimes intermédiaires, soit que l'écoulement présente un mode oscillant ou pulsé, soit que dans un écoulement stable, il se forme des tourbillons du fait d'accidents, de courbures ou d'inflexion (122).

Dans la formule du nombre de Reynolds, l'écoulement dans les vaisseaux est caractérisé par une vitesse moyenne qui est calculée comme le rapport du débit sur la section du vaisseau :

$$v = \frac{Q}{\pi R^2}$$

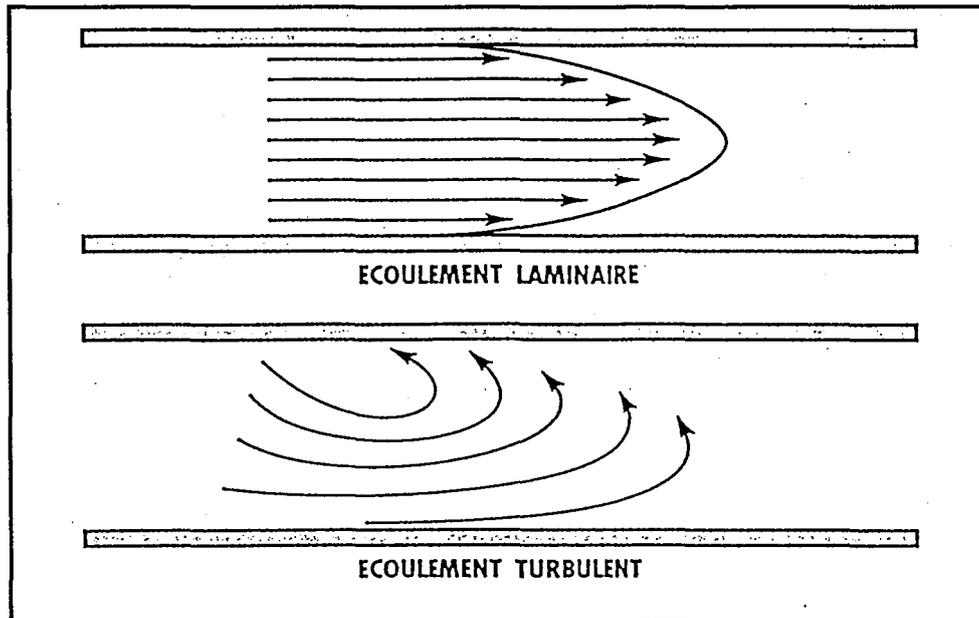


Figure 9 : Représentation schématique d'un écoulement laminaire et d'un écoulement turbulent (d'après G.POTRON et coll. 1993) (167).

II.4. Viscosité

La viscosité est une des propriétés physiques du fluide qui traduit le frottement entre les couches adjacentes provoqué par l'écoulement de ce fluide. C'est une grandeur physique fondamentale qui joue un rôle essentiel en rhéologie. On peut définir différents coefficients de viscosité.

II.4.1. Viscosité dynamique

Dans un écoulement simple, la viscosité dynamique est définie par le rapport de la contrainte τ sur la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

avec : η exprimée en Pascal seconde (Pa.sec).

Si la viscosité ne dépend pas de la contrainte de cisaillement et reste constante quand $\dot{\gamma}$ varie, le fluide est newtonien. L'eau, l'alcool sont des exemples de fluides newtoniens. Le coefficient de viscosité est appelé viscosité absolue.

Pour des fluides non-newtoniens comme les polymères en solution, le sang, η peut dépendre de nombreux facteurs en particulier de la vitesse de cisaillement. Dans ce cas là, on définit la viscosité apparente.

II.4.2. Viscosité cinématique

La viscosité cinématique est définie par l'équation :

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}$$

où ρ est la masse volumique du fluide et η sa viscosité dynamique.

L'unité de la viscosité cinématique est le cm^2/sec encore appelé Stokes (St) dans le système C.G.S. et le m^2/sec dans le système S.I.

II.4.3. Viscosité relative

Dans l'étude des solutions complexes, afin de déterminer les influences respectives du soluté et du solvant dans le comportement rhéologique, on utilise souvent la viscosité relative :

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_s}$$

où η_s est la viscosité du solvant.

Le **Tableau IV** résume les unités utilisées pour la détermination des paramètres définis ci-dessus.

Tableau IV : Unités des paramètres rhéologiques

Systèmes	C G S	S.I.
Contrainte de cisaillement (τ)	dyne sec./cm ²	Pascal
Vitesse de cisaillement ($\dot{\gamma}$)	seconde inverse (sec ⁻¹)	seconde inverse (sec ⁻¹)
Viscosité apparente (η)	poise	Pascal.seconde (Pa.sec)
Viscosité cinématique (ν)	cm ² /sec (Stokes)	m ² /sec

III. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU PLASMA

Le plasma contient 90% d'eau, des protéines et des substituts plasmatiques. Le plasma est généralement considéré comme un fluide newtonien. La viscosité du plasma est indépendante du cisaillement et de l'ordre de 1,2 mPa.sec à 37°C dans le cas d'un plasma physiologique. La viscosité du plasma (η_p) est influencée par :

- La concentration et la nature des protéines plasmatiques notamment l'albumine, les immunoglobulines et le fibrinogène. L'augmentation de la concentration des protéines entraîne une élévation de la viscosité du plasma;
- La température : l'élévation de la température jusqu'à 55°C induit une diminution de la viscosité du plasma. Au-dessus de 55°C, la plupart des protéines sont dénaturées et perdent leurs structures natives.

Au cours de nombreux processus pathologiques par exemple : les thromboses veineuses, artérielles et le syndrome d'hyperviscosité, la maladie de Waldenström, la viscosité du plasma peut être plus élevée que la normale (118).

IV. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DU SANG

IV.1. Déformation des hématies

La faculté de déformation des hématies joue un rôle important dans les propriétés rhéologiques du sang, en particulier aux vitesses de cisaillement élevés. Dans la circulation capillaire, la vitesse de cisaillement élevée et l'hématocrite faible favorisent la déformation des hématies. Les hématies ayant un diamètre moyen de 7 à 8µm sont très flexibles et peuvent traverser un capillaire de diamètre de 2-3µm sans dommage. La déformabilité des hématies dépend de :

- La déformabilité intrinsèque de l'hématie qui dépend de la viscosité interne influencée par l'état physicochimique et la teneur de l'hémoglobine, de l'élasticité de la membrane et du rapport surface/volume;
- La vitesse de cisaillement : si la vitesse de cisaillement augmente, la déformation des hématies croît;

- La viscosité du milieu suspensif : l'augmentation de la viscosité entraîne l'élévation de la contrainte de cisaillement, et par conséquent, l'augmentation de la déformation des hématies;
- L'osmolalité du milieu suspensif: une variation de l'osmolalité du milieu suspensif provoque un changement de forme du globule rouge, donc, une diminution de la déformabilité;
- Un faible pH induit la rigidité de la membrane des hématies, donc, une diminution de la déformation.

IV.2. Agrégation érythrocytaire

L'agrégation des hématies est certainement le plus important des facteurs entraînant un comportement non-newtonien du sang humain. Les hématies empilées forment des rouleaux. Cette agrégation est un phénomène réversible à l'état physiologique. La formation des rouleaux dépend des protéines plasmatiques, des macromolécules et aussi des conditions d'écoulement.

Comme le sujet de ce travail est consacré à l'agrégation érythrocytaire, cette caractéristique rhéologique du sang sera développée en détail dans le chapitre suivant.

IV.3. Propriétés rhéologiques en régime stationnaire

En régime stationnaire, le sang présente un comportement rhéofluidifiant. C'est-à-dire que la viscosité est fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ (142). La viscosité décroît lorsque la vitesse de cisaillement augmente. Il apparaît alors qu'à fort cisaillement ($\dot{\gamma} \approx 10^2 \text{ sec}^{-1}$) les phénomènes de déformation et d'orientation des hématies sont prédominants, par contre, à faible cisaillement ($\dot{\gamma} \approx 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$) les effets d'agrégation l'emportent. (Figures 10, 11) (33, 43, 177, 185, 211).

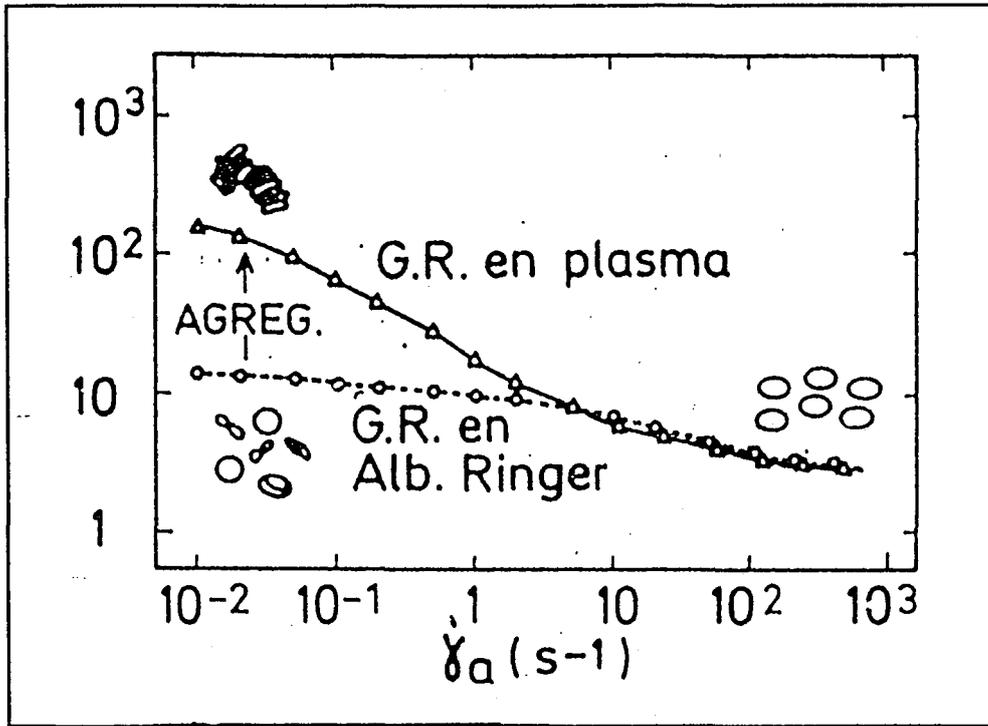


Figure 10 : Variations de la viscosité relative (η_r) d'une suspension des hématies dans du plasma et en milieu Ringer ($H = 0,45$ l/l (d'après CHIEN S. et coll. 1978)(43).

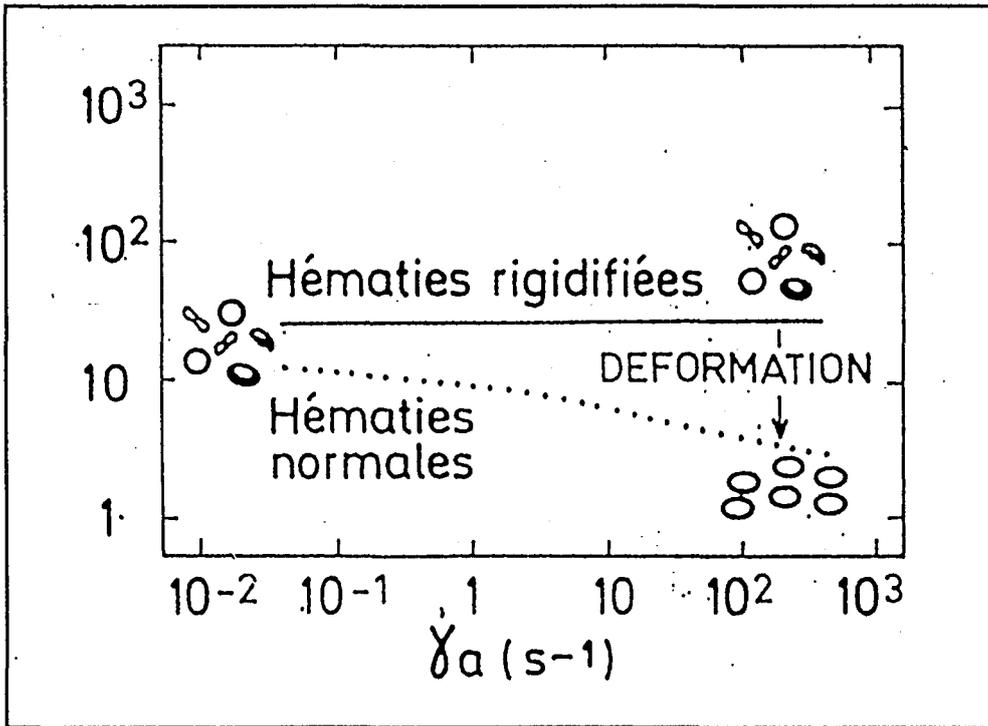


Figure 11 : Variations comparées de la viscosité relative (η_r) d'une suspension d'hématies rigidifiées et d'hématies normales ($H = 0,45$ l/l) (d'après CHIEN S. et coll. 1978) (43).

IV.4. Propriétés rhéologiques en régime instationnaire

Le sang est un fluide non-newtonien, d'où l'existence d'une relation comportement-structure non linéaire. C'est-à-dire que il existe des comportements thixotropiques et viscoélastiques non linéaires qui peuvent être mis en évidence en régimes transitoires de type impulsif ou oscillatoire. Viscoélasticité et thixotropie, termes utilisés par les rhéologues, caractérisent les propriétés rhéologiques du sang sous un cisaillement dépendant du temps (116).

La viscoélasticité est prédominante pour des cisaillements appliqués très faibles ($\dot{\gamma} \leq 0,05 \text{ sec}^{-1}$) où se produit une réorganisation de la structure tridimensionnelle, et la thixotropie est prépondérante pour des cisaillements d'amplitude modérée ($\dot{\gamma} \approx 1 \text{ sec}^{-1}$). A ces cisaillements, la formation de structures compactes puis la désagrégation des rouleaux entraîne une diminution de la viscosité de la suspension. Ces changements de structure induits par un écoulement sont appelés "comportement thixotropique du sang. (Figures 12 et 13) (116).

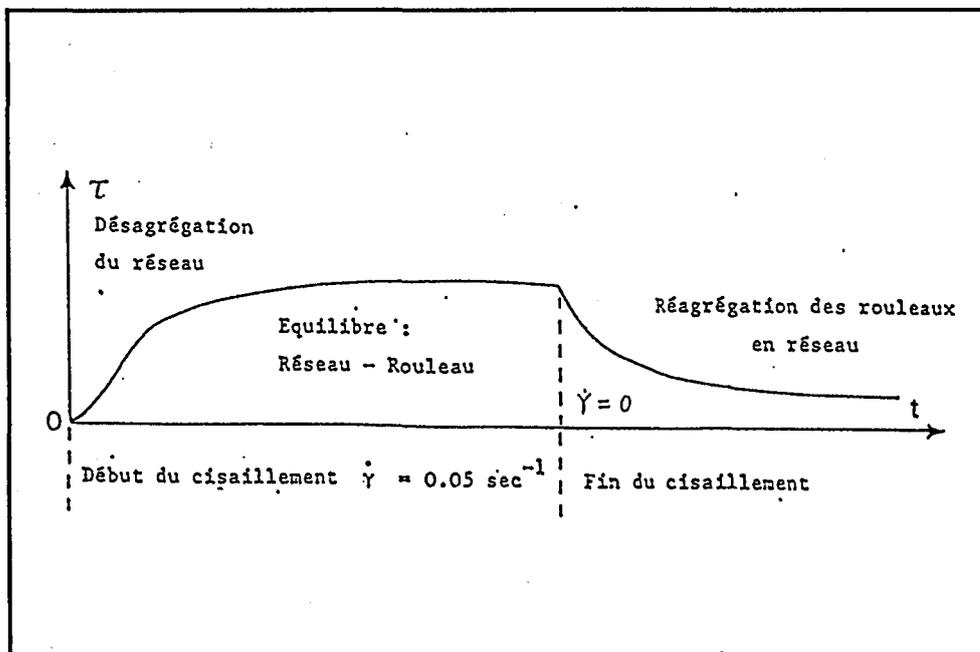


Figure 12 : Comportement viscoélastique du sang (d'après LACOMBE C.1980) (116)

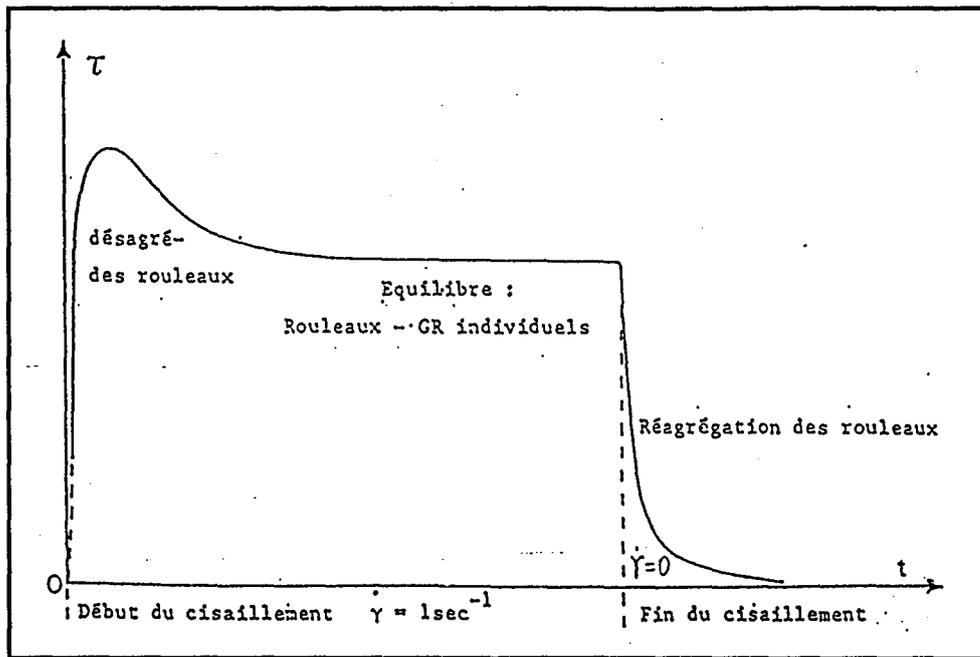


Figure 13 : Comportement thixotropique du sang (d'après LACOMBE C.1980) (116).

IV.5. Lois rhéologiques

Dans un viscosimètre de type Couette qui est un écoulement entre deux cylindres coaxiaux, la viscosité relative de la suspension décroît régulièrement avec la vitesse de cisaillement. La faible viscosité du sang dans un écoulement rapide renseigne sur une désagrégation complète et une orientation des hématies déformées dans les champs de cisaillement. Mais c'est une expression empirique. Afin d'étudier le comportement rhéologique d'une suspension sanguine, de nombreux modèles ont été développés. Parmi ces modèles, nous citerons quelques lois rhéologiques :

(1) Loi de CASSON (27)

$$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + (\eta_\infty \dot{\gamma})^{1/2}$$

où τ_0 est lié à l'hématocrite et à l'état d'agrégation des hématies. η_∞ représente la viscosité de la suspension à fort taux de cisaillement.

La loi de CASSON décrit correctement le comportement rhéologique de la suspension sanguine.

(2) Loi de DINTENFASS (170)

$$\eta_r = (1 - \tau H)^{-2,5}$$

Cette loi n'est pas acceptable de par la présence de $n = 2,5$, et du facteur τ de Taylor pour les émulsions. Pour le sang on aurait :

$$\tau = \frac{\eta_i + 0,4 \eta_p}{\eta_i + \eta_p}$$

Où η_r est la viscosité relative, η_i la viscosité interne de l'hématie, et η_p la viscosité plasmatique.

(3) Loi de QUEMADA :

Plus récemment, QUEMADA (168) a proposé une relation viscosité-vitesse de cisaillement pour le sang.

$$\eta_r = [1 - 1/2 \cdot k(\phi, \dot{\gamma})]^{-2}$$

$$\text{avec } k(\dot{\gamma}, \phi) = \frac{k_0(\phi) + k_\infty(\phi)\theta(\dot{\gamma}, \phi)}{1 + \theta(\dot{\gamma}, \phi)}$$

$$\theta = \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^{1/2} \quad \text{avec } \dot{\gamma}_c = \dot{\gamma}_c(\phi)$$

où $k_0 = k (\dot{\gamma}=0)$ et $k_\infty = k (\dot{\gamma} \rightarrow \infty)$ sont des paramètres qui décrivent respectivement l'agrégation et la déformation des hématies, $\dot{\gamma}_c$ représente un taux de cisaillement critique. ϕ est la fraction volumique en hématies. Les trois paramètres de structure (k_0 , k_∞ , $\dot{\gamma}_c$) varient avec l'hématocrite H et restent empiriques.

Il y a de nombreuses autres lois proposées pour des applications dans des conditions expérimentales différentes : Loi de Bingham, Loi en puissance, Loi de Mooney, Loi de Brinkman, Loi de Krieger-Dougherty, Loi de Landel par exemple (170, 224).

V. COMPARTIMENTS DE LA CIRCULATION SANGUINE

Par rapport à un fluide simple qui s'écoule dans un conduit, la nature de l'écoulement sanguin est beaucoup plus complexe. Les propriétés rhéologiques du sang n'interviennent pas de la même manière suivant la dimension des vaisseaux. On peut distinguer en effet trois niveaux (fixés par le rapport ρ du rayon du vaisseau au "rayon" de l'hématie (170) :

- La circulation capillaire ($\rho \leq 1$), où l'hématie subit de très grandes déformations, est dominée par les propriétés rhéologiques de l'hématie tels que la viscoélasticité de sa membrane et la viscosité interne;
- La circulation dans les artères et les veines ($\rho \geq 50$), où l'écoulement pulsé est accompagné d'importantes déformations des parois vasculaires. A cette échelle, la circulation dépend donc surtout des propriétés de ces parois (viscoélasticité, caractéristiques géométriques ...);
- La microcirculation importante ($1 \leq \rho \leq 50$) dans les artérioles et les veinules, où se font sentir principalement les propriétés rhéologiques (non-Newtoniens) du sang, associées à la formation près des parois d'une couche plasmatique et à la concentration des hématies dans la région axiale du vaisseaux. Cet écoulement

diphasique entraîne plusieurs effets caractéristiques de la microcirculation tels que l'aplatissement du profil de vitesse, la réduction de l'hématocrite dans le tube, la diminution de la viscosité apparente lorsque le rayon du tube décroît.

VI. MICROCIRCULATION

La microcirculation est le lieu privilégié de l'expression du comportement rhéologique du sang . Elle contient les artérioles dont le diamètre du vaisseau est de 100 à 40 μ m, les artérioles pré-capillaires (30-20 μ m), les capillaires (10-5 μ m), les veinules post-capillaires (20-30 μ m) et les veinules (40 à 100 μ m) (Tableau V). L'unité microcirculatoire s'ouvre ou se ferme selon les conditions de perfusion dans les vaisseaux (15). Ces microvaisseaux constituent le lit vrai capillaire, le lieu principal des échanges (liquide et gaz) entre le sang et les tissus.

Tableau V: Constituants de la microcirculation (d'après BOISSEAU M.R. 1992) (15)

Constituants	Diamètre (μ)	Débit (cm/sec.)	Fonction
Artérioles	100-40	0,5	Perfusion de tissus
Artérioles pré-capillaires	30-20	0,5	Pression systémique du sang
Capillaires	10-5	0,005	Echanges interstitiel de tissus (gaz et liquide)
Veinules post-capillaires	20-30	0,01	Transit des cellules sanguines vers tissus
Veinules	40-100	0,2-0,5	Réservoir du sang veineux Pression veineux

Dans la microcirculation, les propriétés rhéologiques du sang sont modifiées par rapport à celles des vaisseaux plus importants.

L'effet Fåhræus (74) est une caractéristique de la microcirculation. Lorsque le flux sanguin passe d'un tube de grand diamètre au tube capillaire (diamètre inférieur à $100\mu\text{m}$), l'hématocrite moyen dans le tube capillaire est plus faible que celui dans un tube de grand diamètre car il existe une couche plasmatique près de la paroi qui entraîne plus de plasma dans les branches capillaires. Ce phénomène est appelé l'écémage plasmatique (plasma skimming) (195). Cependant, dans les veinules post-capillaires l'hématocrite est restitué et peut être plus important que la normale en raison de la sédimentation et de l'accumulation des hématies. La couche plasmatique près des parois se déplace plus lentement que le flux au niveau de l'axe des vaisseaux ce qui favorise également l'augmentation de l'hématocrite dans les veinules post-capillaires (15).

L'effet Fåhræus-Linqvist (75) a été décrit pour des tubes de diamètre inférieurs à $300\mu\text{m}$ environ. La viscosité baisse nettement avec la diminution du diamètre capillaire due à une chute de l'hématocrite dans le capillaire.

Ultérieurement, DINTENFASS a également observé, *in vitro*, l'existence d'un rayon critique où la viscosité apparente est minimale. Si le rayon du capillaire est inférieur à ce rayon critique, la viscosité apparente ne dépend plus de l'effet Fåhræus- Linqvist, mais augmente brusquement (58). Le rayon critique dépend sensiblement de la viscosité interne des hématies (déformation des hématies), de l'agrégation des hématies.

Afin de passer dans les capillaires, les cellules sanguines doivent se déformer. La déformation des hématies est favorisée par la chute de l'hématocrite, la diminution de la viscosité interne de l'hématie et l'augmentation de la contrainte de cisaillement dans la microcirculation.

Au niveau des veinules post-capillaires, l'hématocrite et la viscosité augmentent. le taux de cisaillement diminue et par conséquent, l'agrégation érythrocytaire a tendance à augmenter dans ces conditions.

Enfin, les mouvements des leucocytes et les propriétés de l'endothélium jouent des rôles importants dans les caractéristiques de la microcirculation.

I - 3

RAPPELS SUR LE PHENOMENE D'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE

I. DESCRIPTION DU PHENOMENE

Lors de mouvements lents ou à l'état stationnaire, les hématies normales humaines adhèrent face-à-face en agrégats linéaires que l'on a nommé "rouleaux". L'association de rouleaux forme des réseaux. Dans le sang normal, la formation des rouleaux est un processus réversible. Sous l'action d'une force externe telle qu'une contrainte de cisaillement, un équilibre dynamique existe entre la taille des agrégats et la force appliquée (84). De plus, les rouleaux sont facilement détruits lorsque la force externe est suffisante et se reforment dès que l'action de cette force cesse (212). A l'opposé, dans certains cas pathologiques, de véritables agrégats d'hématies peuvent se former et constituer des structures complexes peu dissociables. COPLEY a proposé en 1958 que le terme "agrégation" décrive le phénomène d'une prise en masse réversible et l'agglutination, une prise en masse irréversible (49,50).

Par conséquent, l'agrégation érythrocytaire est un des principaux facteurs intervenant dans les propriétés rhéologiques du sang, en particulier, à faible taux de cisaillement.

II. MODELISATION DE L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE

L'agrégation des hématies en rouleaux et la formation de réseaux ou agrégats a fait l'objet depuis plusieurs années d'un grand nombre de travaux. Différents modèles théoriques ont été proposés pour expliquer les mécanismes complexes de l'agrégation érythrocytaire

(22,23,24,36,37,38,39,59,80,102,107,109). Parmi ceux ci, on peut citer deux modèles majeurs (214) :

- (1) Pontage intercellulaire basé sur une adsorption de macromolécules à la surface des hématies.
- (2) Déplétion macromoléculaire dans la région de la surface cellulaire.

II.1. Théorie du pontage macromoléculaire

Le modèle de pontage macromoléculaire est le plus connu pour décrire la formation des rouleaux. En 1970, CHIEN et coll. ont suggéré que l'agrégation des hématies provoquée par du fibrinogène et du dextran est due à la formation d'un pontage macromoléculaire à la surface cellulaire (33).

L'adsorption et la désorption macromoléculaires à la surface cellulaire sont des processus dynamiques. A l'état d'équilibre, la vitesse d'adsorption est égale à la vitesse de désorption.

Les macromolécules en s'adsorbant sur la surface cellulaire induiraient une force attractive supérieure à la force de répulsion due aux charges électriques de surface (**Figure 14**) (11, 40).

Les résultats de CHIEN en 1973 ont démontré que le degré d'agrégation des hématies en présence des dextrans croît avec la masse moléculaire des dextrans. Des observations en microscopie électronique à transmission ont révélé que la distance entre deux cellules adjacentes est en relation directe avec la masse moléculaire de la macromolécule (**Figure 15**) (39). L'augmentation de l'agrégation avec la masse moléculaire du dextran peut être expliquée par une augmentation de l'aire d'adsorption, ainsi que par une diminution de la force électrostatique répulsive en raison de la distance intercellulaire plus grande. En effet,

cette approche propose que la force du pontage superficiel est fonction du nombre de pontages et de la force d'adsorption de chaque pontage moléculaire à la surface cellulaire. Par ailleurs, la diminution de la charge superficielle des hématies à la suite d'un traitement par la neuraminidase entraîne l'augmentation de l'agrégation des hématies par les dextrans, en particulier les fractions de faible masse moléculaire qui sont associées à une faible distance intercellulaire (101).

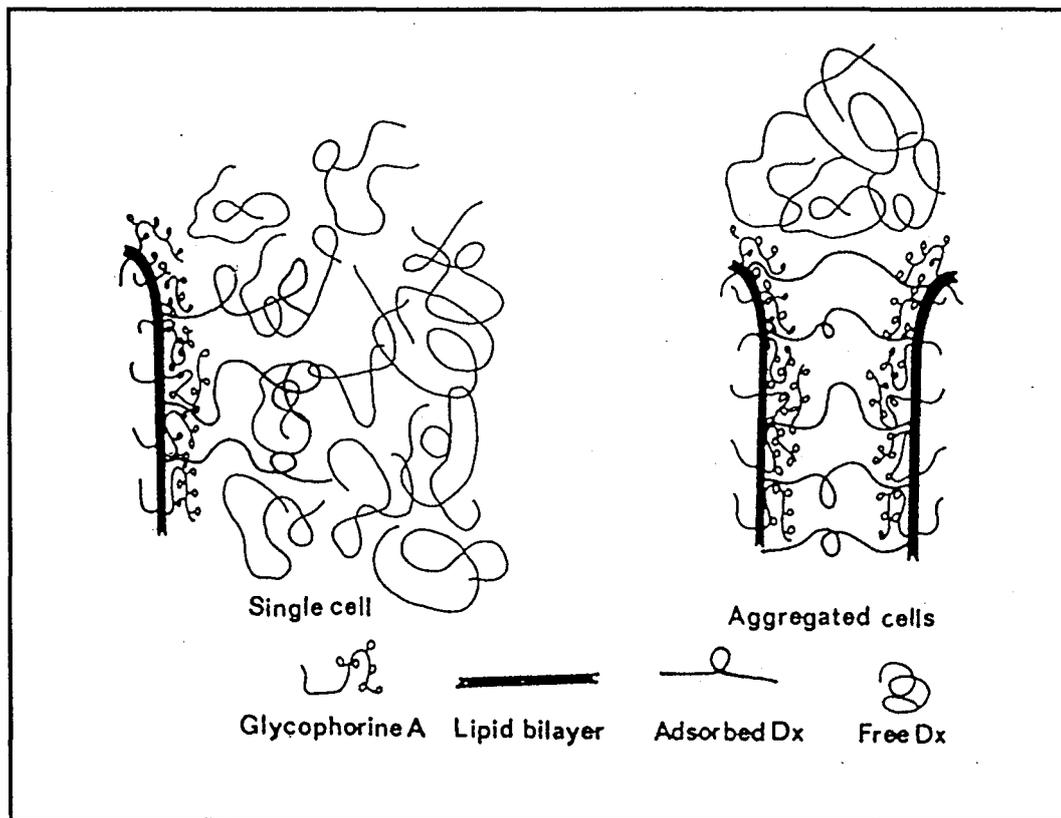


Figure 14 : Schéma simplifié du mécanisme d'agrégation érythrocytaire par pontage macromoléculaire (d'après BAUMLER H. et coll. 1989) (11).

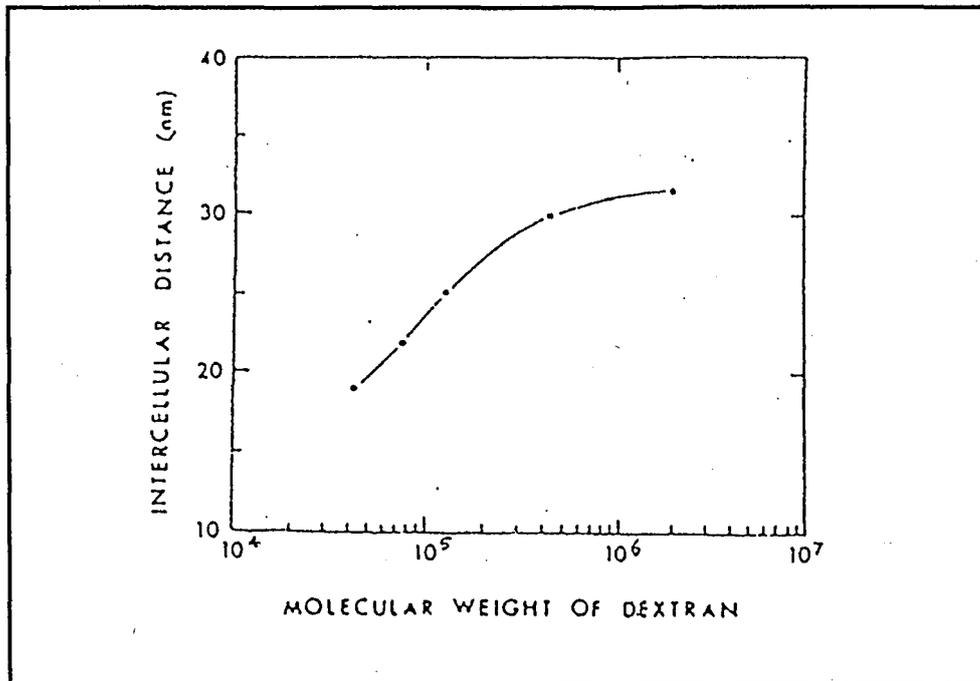


Figure 15 : Variation de la distance intercellulaire en fonction de la masse moléculaire du dextran (d'après CHIEN S. et JAN K.M. 1973) (39).

Par ailleurs, CHIEN et JANL. ont également montré qu'au cours de la formation des rouleaux, il existait une déformation des hématies qui perdent leur forme biconcave (39). Les deux cellules adjacentes ont leurs membranes déformées selon deux surfaces parallèles, en vue de faciliter le pontage (Figures 16, 17). A l'état d'équilibre, la majorité de l'énergie d'agrégation totale est stockée dans la membrane de l'hématie sous forme de tension membranaire (46). On comprend donc facilement que la déformabilité des hématies intervient dans la formation des surfaces du pontage et une déformabilité réduite sera associée à une diminution de l'agrégation (40, 45).

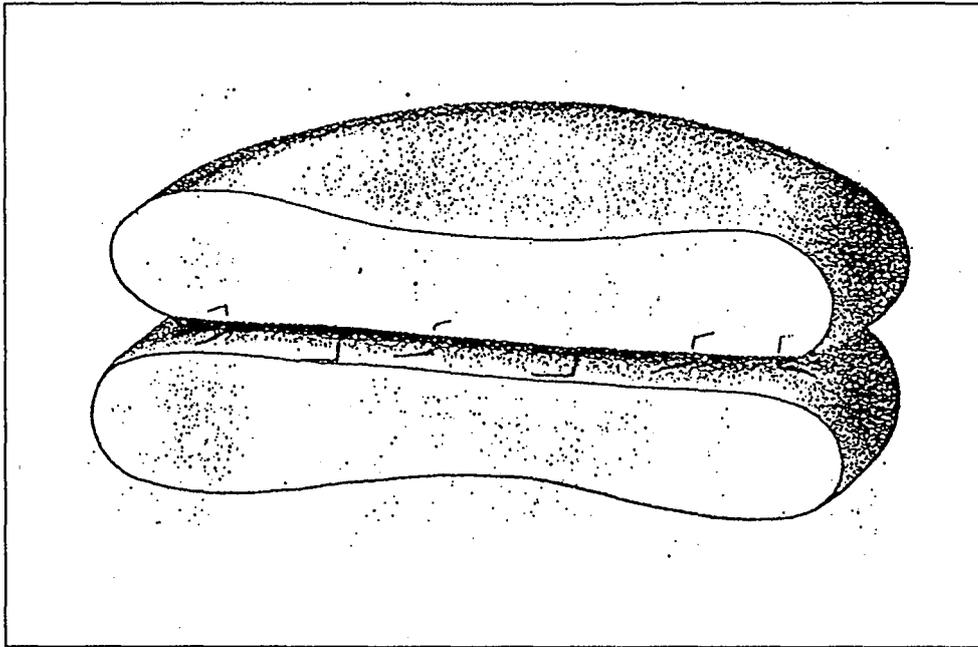


Figure 16 : Les deux cellules adjacentes ont leurs membranes déformées selon deux surfaces parallèles. Les molécules de dextran sont présentes dans l'espace intercellulaire sous forme d'une couche monomoléculaire et sont adsorbées sur les surfaces cellulaires adjacentes (d'après CHIEN S. et JAN K. M.1973) (39).

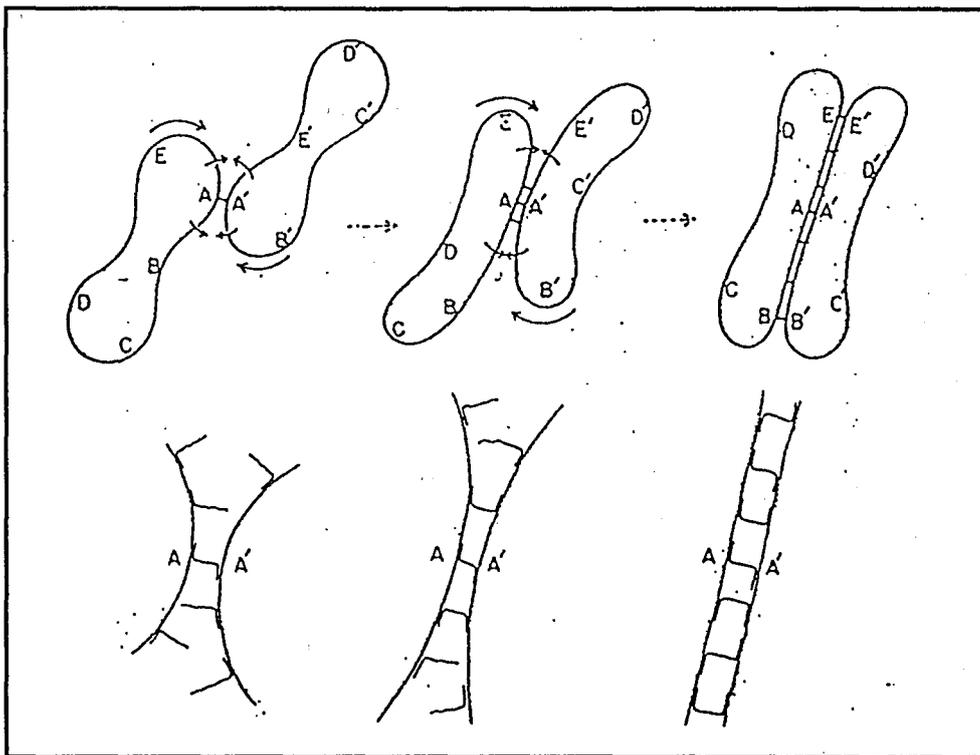


Figure 17 : Diagramme schématique représentant la dynamique du processus de formation des rouleaux. La partie inférieure de la figure représente l'agrandissement de la section intervenant dans le pontage. Il faut noter la rotation de la membrane des hématies, qui rend possible la formation des pontages parallèles multiples (d'après CHIEN S. et JAN K.M.1973) (39).

Les travaux de BROOKS et coll. (22, 24) sont également en faveur de la théorie du pontage macromoléculaire et en précisent le mécanisme. Ils concernent les isothermes d'adsorption des polymères sur la membrane érythrocytaire et ont été effectués avec du dextran radioactif (Figure 18). Ils font apparaître deux zones en relation avec la concentration des macromolécules. Il s'agirait de l'existence de deux sites (ou types de liaison) sur la membrane érythrocytaire. Le site qui permet la désorption la plus rapide serait en liaison directe avec le phénomène d'agrégation (Figure 19). Quant au fibrinogène, il semble que, comme pour les dextrans, les études de désorption de fibrinogène marqué mettent en évidence l'existence de deux types de liaison. Les études de compétition avec des dextrans, ont montré d'ailleurs que le fibrinogène et ces macromolécules agissaient indépendamment et n'étaient pas en compétition pour leur fixation sur la membrane des hématies (24).

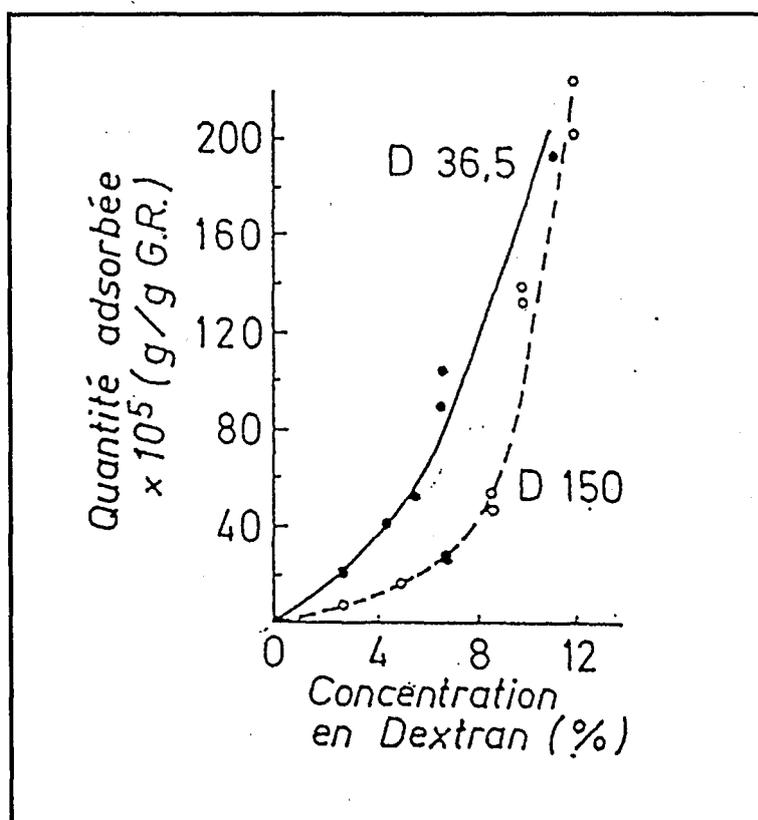


Figure 18 : Isothermes d'adsorption de deux dextrans sur la membrane érythrocytaire ($T = 21^{\circ}\text{C}$) (d'après BROOKS D.E. et coll. 1980) (24)

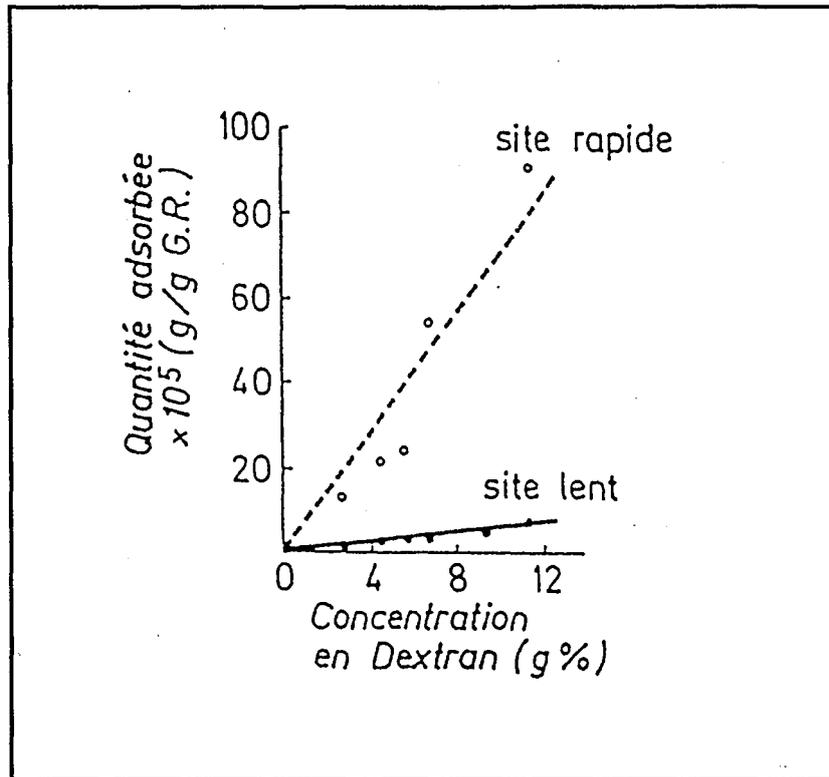


Figure 19 : Isotherme d'adsorption d'un dextran 36,5 kDa sur des hématies. Les résultats expérimentaux sont obtenus à partir des équilibres de désorption (d'après BROOKS D.E. et coll. 1980)(24)

RAMPLING (177) a également observé une fixation du fibrinogène et de ses produits de dégradation sur la membrane des hématies.

L'agrégation par les dextrans offre un modèle expérimental du pontage macromoléculaire en relation avec la glycocalix recouvrant la membrane de l'hématie (148). BAUMLER et coll. (11) et SCHACHTER (183) ont montré que le dextran modifie la structure du revêtement glycoprotéique extracellulaire (glycocalix) et inhibe le transport actif du D-glucose à travers la membrane érythrocytaire. Cette observation traduit une adsorption du dextran sur la membrane de l'hématie et une pénétration des macromolécules à l'intérieur du revêtement glycoprotéique extracellulaire. Par contre, le fibrinogène est vraisemblablement adsorbé à la surface du glycocalix et ne modifie pas sa structure (149). Il

n'en reste pas moins que dans les deux cas, l'adsorption est faible puisqu'un simple lavage des cellules entraîne une désorption des macromolécules (22,24,42).

D'un point de vue énergétique, l'agrégation peut être considérée comme un équilibre énergétique entre des forces d'agrégation et des forces de répulsion. Schématiquement, l'énergie d'agrégation (ou de pontage) entre deux cellules adjacentes (W_a) est proportionnelle au nombre de molécules agrégeantes présentes à la surface (N_a) et à l'énergie de pontage élémentaire correspondante (W_i) :

$$W_a = N_a W_i$$

La stabilité de l'agrégation érythrocytaire dépend de l'équilibre entre les forces qui conduisent à l'agrégation et la désagrégation. Les énergies qui s'opposent à l'agrégation sont :

- L'énergie électrostatique répulsive (W_e) due aux charges superficielles (principalement l'acide sialique pour des hématies) (194).
- L'énergie mécanique (W_m) due à l'augmentation de surface de la membrane au moment du pontage (énergie liée à la déformation de la membrane).
- L'énergie mécanique (W_c) due au cisaillement dans l'écoulement.

Le processus de la formation des rouleaux concerne donc un équilibre des énergies à la surface cellulaire telles que l'énergie du pontage entre deux cellules adjacentes (W_a) soit suffisante pour compenser l'énergie électrostatique répulsive (W_e), l'énergie de cisaillement mécanique (W_c) et l'énergie stockée dans la membrane et permettant la déformation (W_m). On aura l'énergie totale d'agrégation (W_t):

$$W_t = W_a - (W_e + W_m + W_c)$$

II. 2. Théorie de la déplétion

Outre la théorie du pontage macromoléculaire, il existe un autre modèle dit de déplétion qui est basé sur l'absence d'adsorption de macromolécules sur les membranes d'hématies (4,106) (Figure 20). C'est en fait l'exclusion des macromolécules de la région intercellulaire qui provoquerait une attraction entre les surfaces.

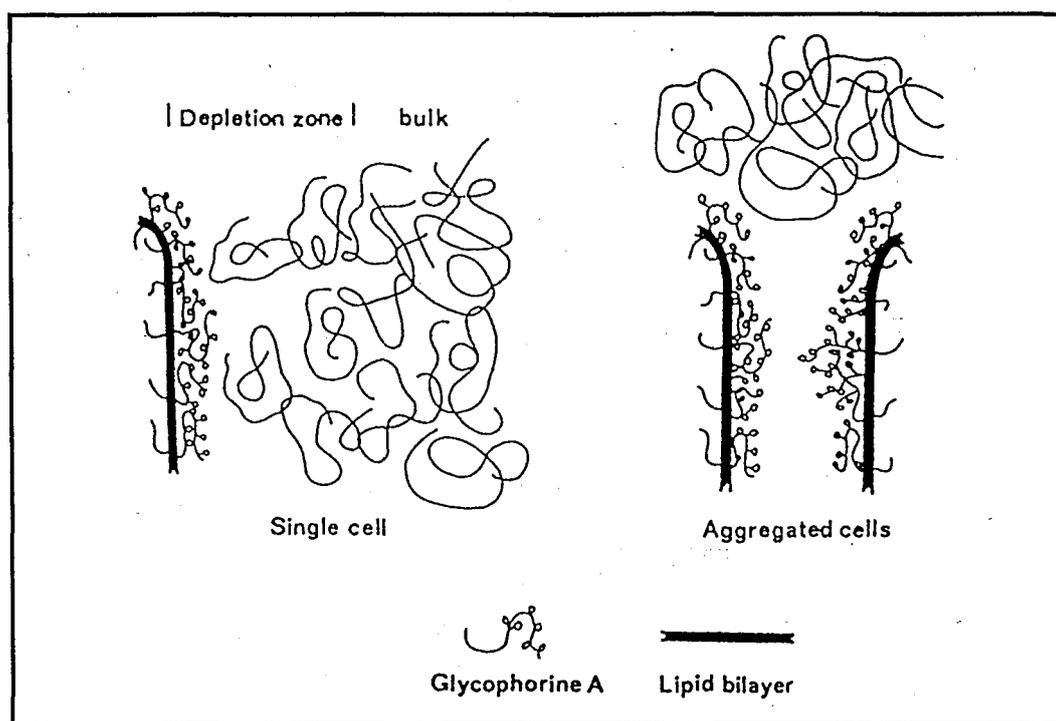


Figure 20 : Modèle de la déplétion de l'agrégation érythrocytaire. Les macromolécules ne s'adsorbent pas sur les membranes des hématies. L'approche de deux cellules induit un recouvrement des zones de la déplétion, qui entraîne l'attraction des cellules et provoque des agrégats. (d'après BÄUMLER H. et coll. 1989) (11).

En effet, les glycoprotéines membranaires des hématies portent des groupements glucosidiques hydrophiles et peuvent exclure les polymères hydrosolubles comme les dextrans. Une interaction répulsive entre la surface cellulaire et les chaînes macromoléculaires favoriserait la formation de la couche de déplétion.

Le profil de concentration $\phi(x)$ des macromolécules au voisinage de la surface présenterait dans ces conditions un gradient $\frac{\partial\phi}{\partial x} \geq 0$, et engendrerait une énergie de surface (γ) positive; ($\gamma \approx \pi\xi$ où π désigne la pression osmotique de la solution macromoléculaire et ξ la taille moyenne de la couche de déplétion) (Figure 21) (80).

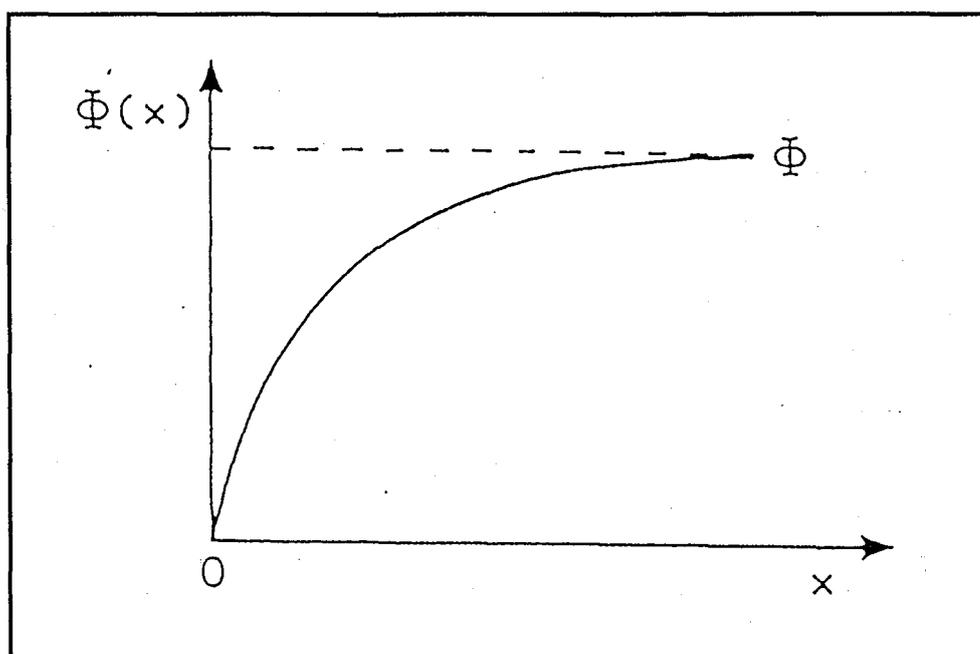


Figure 21 : Profil de concentration $\phi(x)$ en polymère dans une couche déplétée à la distance x de la surface particulaire. (ϕ désigne la concentration en polymère dans la solution) (d'après GAST A.P. et LEIBLER L. 1986) (80).

Un système de deux particules isolées (surface particulaire S) présente ainsi une énergie de surface initiale $E_i \approx 2\gamma S > 0$. Une floculation des particules avec une zone interparticulaire exempte de polymère conduirait à une énergie de surface $E_f \approx 2\gamma(S-A) < E_i \approx 2\gamma S$ où A désigne la surface agrégée.

La variation d'énergie de surface $E_f - E_i < 0$ conduit à une interaction attractive et une agrégation réversible des particules avec une zone interparticulaire d'exclusion des macromolécules.

$$E_f - E_i = -2\gamma A = -2\pi\xi A$$

La différence $E_f - E_i$ est par conséquent une fonction de la pression osmotique π et de l'épaisseur ξ de la couche de déplétion. Une exclusion des polymères induit une différence de pression osmotique ($\pi - \pi'$) entre la solution et la zone interparticulaire et entraîne des interactions adhésives entre les particules, donc une agrégation des particules. On peut déterminer alors, la variation d'énergie libre :

$$E_f - E_i \approx -2 (\pi - \pi')\xi A$$

Cependant, la déplétion a des limites en tant que mécanisme responsable de la floculation des hématies en présence de polymère car les fortes concentrations en dextran favorisent la pénétration des chaînes libres dans le revêtement glycoprotéique et la suppression de la couche de déplétion.

III. FACTEURS PRINCIPAUX INFLUENCANT L'AGREGATION DES HEMATIES

De nombreux facteurs participent à l'agrégation érythrocytaire :

- Les conditions physiques (vitesse de cisaillement);
- Depuis FAHRAEUS (74), il est connu que les propriétés physico-chimiques et les concentrations des macromolécules présentes au sein du milieu suspendant peuvent intervenir dans l'agrégation des hématies. Les concentrations des protéines du plasma (fibrinogène et immunoglobulines) et de certaines macromolécules (dextran) affectent la formation des rouleaux.
- les propriétés des hématies (concentration, déformation, charge électrique de surface).

III.1. Vitesse de cisaillement

Il est bien connu aujourd'hui que la viscosité apparente du sang varie avec la vitesse de cisaillement. Lorsque la contrainte de cisaillement agissant sur les hématies est insuffisante, la viscosité sanguine augmente essentiellement en raison de l'agrégation réversible érythrocytaire. Par contre, lorsque la vitesse de cisaillement est élevée, la viscosité du sang diminue grâce à la dispersion des agrégats des hématies et à la déformation des hématies non agrégées (46) (Figure 22).

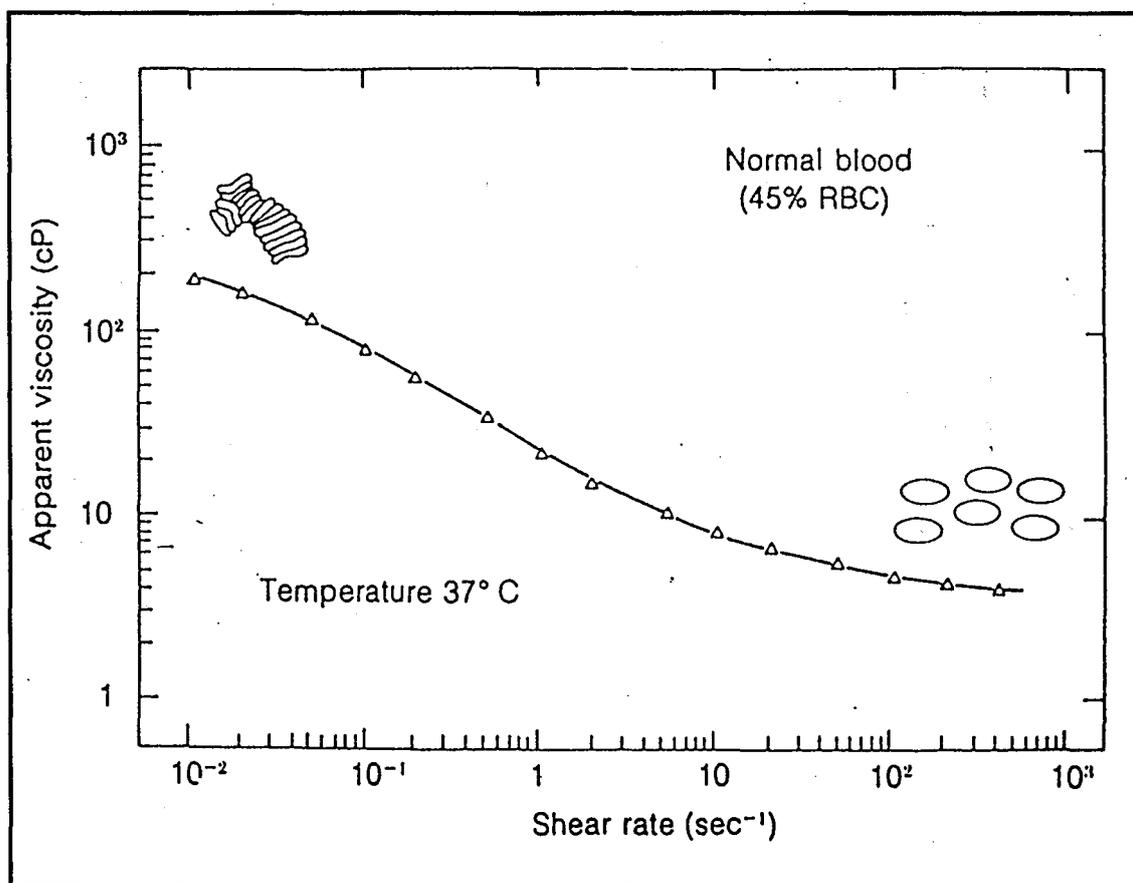


Figure 22 : Relation logarithmique entre la viscosité sanguine et le taux de cisaillement dans le sang normal à hémocrite 0,45 l/l (Phénomène de fluidification) (d'après CHIEN S. et SUNG L.A. 1986) (46).

Les différents rhéogrammes correspondant aux trois différents comportements viscosimétriques observés (viscoélasticité, thixotropie et fluidification) s'interprètent en

considérant les changements que subit, sous l'action des contraintes de cisaillement, la structure tridimensionnelle du sang qui résulte du phénomène réversible d'agrégation/désagrégation érythrocytaire.

En diminuant doucement la vitesse de cisaillement, les rhéogrammes peuvent répondre aux trois comportements viscosimétriques suivant (117,121) :

- Pour $\dot{\gamma}$ supérieure à $100-150 \text{ sec}^{-1}$, les hématies sont dispersées, s'orientent dans l'écoulement et peuvent être déformées. La viscosité relative faible est principalement influencée par les propriétés mécaniques individuelles de l'hématie, notamment sa déformation.
- Pour $\dot{\gamma}$ comprise entre 100 sec^{-1} et 20 sec^{-1} , il existe une phase que SCHMID-SCHÖNBEIN appelée "Random cell flow" (111, 200), où les cellules toujours isolées ne sont plus ni orientées ni déformées. Juste avant la phase suivante on peut déterminer la vitesse de cisaillement d'agrégation. Il s'établit un équilibre entre les deux mécanismes compétitifs de l'agrégation et de la désagrégation expliquant le comportement thixotrope du sang. La viscosité relative est essentiellement gouvernée par ces phénomènes complexes.
- Pour $\dot{\gamma}$ inférieure à 20 sec^{-1} , les hématies sont associées en réseaux de rouleaux et/ou en rouleaux individuels. La viscosité relative élevée est provoquée par certains facteurs plasmatiques, fibrinogène et globulines notamment, mais aussi par des facteurs membranaires, charge électrique par exemple. La déformation élastique du réseau de rouleaux confère au sang un comportement viscoélastique sensible à ces facteurs.

Puisque l'agrégation des hématies est un phénomène dépendant du cisaillement, il est intéressant de connaître les conditions de cisaillement dans les différentes parties de la circulation (167) :

- Dans les gros vaisseaux (artères et veines), les vitesses de cisaillement sont faibles. Les hématies sont en rouleaux et la viscosité sanguine est élevée;
- Au niveau des artérioles, les vitesses de cisaillement augmentent et les rouleaux d'hématies se dissocient. La viscosité sanguine diminue rapidement et permet un déplacement sanguin favorable au niveau des vaisseaux de plus petit diamètre.
- Dans les capillaires, apparaissent différents phénomènes :
 - Il existe une hémodilution physiologique. l'hématocrite capillaire étant nettement plus faible;
 - Cette hémodilution entraîne un moindre résistance à l'écoulement;
 - La contrainte de cisaillement est la plus forte.

Par conséquent, la possibilité de l'agrégation des hématies est minimisée dans les capillaires.

- Au niveau des veinules post-capillaire et des petites veines, on enregistre le taux de cisaillement et la contrainte de cisaillement les plus faibles de la circulation. Elles représentent par conséquent les sites les plus probables pour une agrégation des hématies (Figure 23).

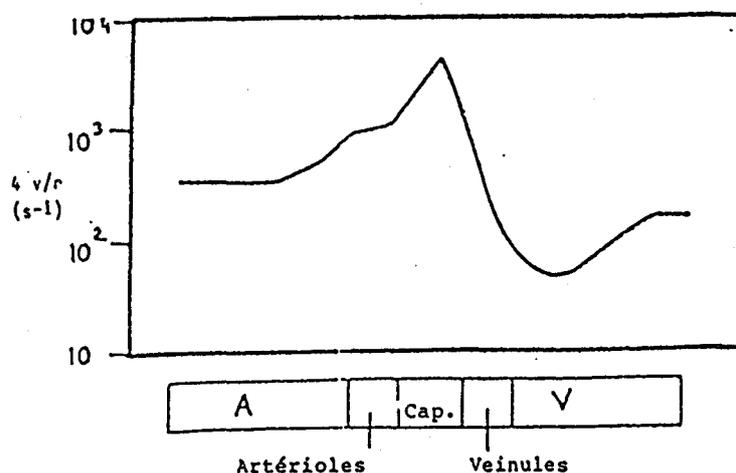


Figure 23 : Variation de $4v/r$, où v représente la vitesse moyenne et r le rayon du vaisseau, dans différentes parties de la circulation. A: artères; Cap: capillaires; V: veines. Le paramètre $4v/r$ donne une estimation grossière du taux de cisaillement dans ces vaisseaux. (d'après CHIEN S. et SUNG L.A.1986)(46).

III.2. Protéines plasmatiques et macromolécules

III.2.1. Protéines plasmatiques

Les hématies s'agrègent pour former les rouleaux seulement en présence d'un milieu contenant soit du fibrinogène, des immunoglobulines ou des macromolécules (40,74,103). FAHRAEUS a mis en évidence dès 1929 une corrélation positive entre le taux de protéines plasmatiques et le degré d'agrégation des hématies dans le plasma humain (74). Une augmentation des γ -globulines plasmatiques accélère l'agrégation érythrocytaire in vitro et in vivo (40,59,74,112,188). Par contre, l'albumine est connue comme un inhibiteur de l'agrégation érythrocytaire (66).

IMAIZUMI et SHAGA ont montré que les immunoglobulines favorisent l'agrégation érythrocytaire, l'augmentation étant corrélée avec les masses moléculaires : IgG < IgA < IgM (100).

COPLEY a proposé en 1965 le phénomène de "stase d'entassement" ("compaction stasis") dans le processus inflammatoire. La formation d'amas d'hématies dans l'inflammation est induite par une augmentation de la perméabilité capillaire ou vasculaire et également par une augmentation de certaines protéines macromoléculaires inflammatoires (51).

DACIE et LEWIS ont montré en 1991 (54) que des protéines plasmatiques inflammatoires telles que : l'haptoglobine, la céruléoplasmine, l' α_1 -glycoprotéine acide, l' α_1 -antitrypsine, la protéine C réactive, les immunoglobulines et le fibrinogène favorisent la formation des rouleaux cylindriques arborisés et des réseaux complexes tridimensionnels. MCMILLAN a aussi constaté qu'il existe une augmentation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation comme l' α_1 -glycoprotéine acide, l' α_1 -antitrypsine, l'haptoglobine et la céruléoplasmine chez les diabétiques, associée à l'augmentation de la viscosité du sérum (141).

III.2.2. Macromolécules

Depuis des années, albumine humaine, gélatines, dextrans et amidons ont été utilisés pour l'hémodilution isovolémique (85, 191). Ces substituts plasmatiques peuvent également contribuer à améliorer les propriétés rhéologiques du sang par diminution de la viscosité sanguine (215, 216).

Le travail récent de DONNER et coll. (68), concerne une étude comparative in vivo des effets rhéologiques de 4 substituts du plasma: gélatine fluide modifiée, dextran-40, dextran-60, hydroxyéthylamidon. Les produits de référence utilisés sont le Ringer-Lactate et l'albumine humaine à 4%. Ils ont démontré que le Ringer-Lactate, l'albumine et le dextran-40 conduisent à une diminution de l'agrégation des hématies alors que le dextran-60 et la gélatine provoquent une augmentation de l'agrégation des hématies. L'hydroxyéthylamidon par contre semble peu modifier l'agrégation érythrocytaire.

III.2.3. Mécanismes d'action des facteurs plasmatiques et des macromolécules

L'action des macromolécules est définie en fonction de leur masse moléculaire, de leur conformation (en hélice ou étendue), de leur concentration dans le milieu étudié, de leur charge, et de la force ionique du milieu suspendant. (31,35).

Bien que la masse moléculaire (68 kDa) de l'albumine pourrait favoriser l'agrégation, la conformation globulaire et la petite taille de la molécule (ayant un grand axe de 150Å de long et un petit de 38Å) ne représentent pas des conditions favorables pour entraîner un pontage macromoléculaire entre les hématies. Elle favorise au contraire la dissociation des hématies dans le plasma humain (66).

Le fibrinogène ayant un haut poids moléculaire (340 kDa) et une structure en hélice ou désordonnée est un stimulant très puissant de la formation de rouleaux d'hématies (134, 176, 189). Certains produits de dégradation du fibrinogène (fragments X et Y) provoquent également l'agrégation des hématies (103,136,144,174,175,218). Par ailleurs, un fibrinogène "multimodulaire" de poids moléculaire 680 kDa de structure globulaire ne provoque pas d'agrégation érythrocytaire (197). Les sites d'adsorption du fibrinogène seraient les glycoprotéines extracellulaires et non les phospholipides membranaires (72). Cependant, cette adsorption représente un processus réversible. En effet, une fraction importante du fibrinogène (environ 90%) se désorbe dès le premier lavage des hématies dans une solution saline (24).

En ce qui concerne les dextrans, dont la configuration est en pelote, de nombreux travaux (22,36,39,103,143,201) ont mis en évidence dans les conditions physiologiques ($I = 150\text{mM}$, $\text{pH} = 7,4$), une agrégation réversible des hématies en présence de dextrans, pour les échantillons de masse moléculaire supérieur à 40 kDa. MAEDA et SHIGA (135) ont également montré que les dextrans de masse moléculaires élevée [Dextran-50 (49,4 kDa), Dextran-70 (70,4 kDa)] forment des rouleaux d'hématies. Par contre, les dextrans de masse moléculaire faible [Dextran-10 (10,3 kDa), Dextran-40 (42,5 kDa)] n'induisent pas la formation de rouleaux. Les dextrans de masse moléculaire ≤ 40 kDa favorisent au contraire la désagrégation (104). CHIEN a proposé que les dextrans de masse moléculaire élevé sont plus efficaces pour induire l'agrégation érythrocytaire en raison d'une diminution de la répulsion électrique due à la longue distance intercellulaire et d'une augmentation de la force du pontage due à la grande aire d'adsorption sur la surface cellulaire.

En fait, l'étude de l'influence des concentrations en dextrans a démontré qu'il existait une concentration critique de floculation ($A\phi$) qui décroît avec le poids moléculaire du dextran ($\phi_A \approx 1\text{g}\%$ pour $M = 40$ kDa, $\phi_A \approx 0,4\%$ pour $M = 80$ kDa) (Figure 24). Il s'agirait donc de deux domaines :

- Un domaine de faibles concentrations en dextrans ($\phi \approx 3-6g\%$) : L'énergie de surface γ des hématies augmente avec la concentration ϕ et la masse moléculaire (Mm) du dextran, lorsque seules les pressions d'adsorption et les pressions stériques interviennent.
- Un domaine des fortes concentrations en dextrans ($\phi > 5g\%$ pour $M = 40$ kDa, $\phi > 8g\%$ pour $M = 80$ kDa) où les interactions électrostatiques répulsives deviennent très supérieures aux autres et provoquent ainsi la désagrégation progressive des surfaces pontées (21, 147).

La diminution de la force ionique du milieu de suspension qui détermine la taille de la double couche ionique, conduit à une extension de la portée des forces électrostatiques répulsives et restreint le domaine d'agrégation des hématies en présence de dextrans (Figure 25) (22, 39,203).

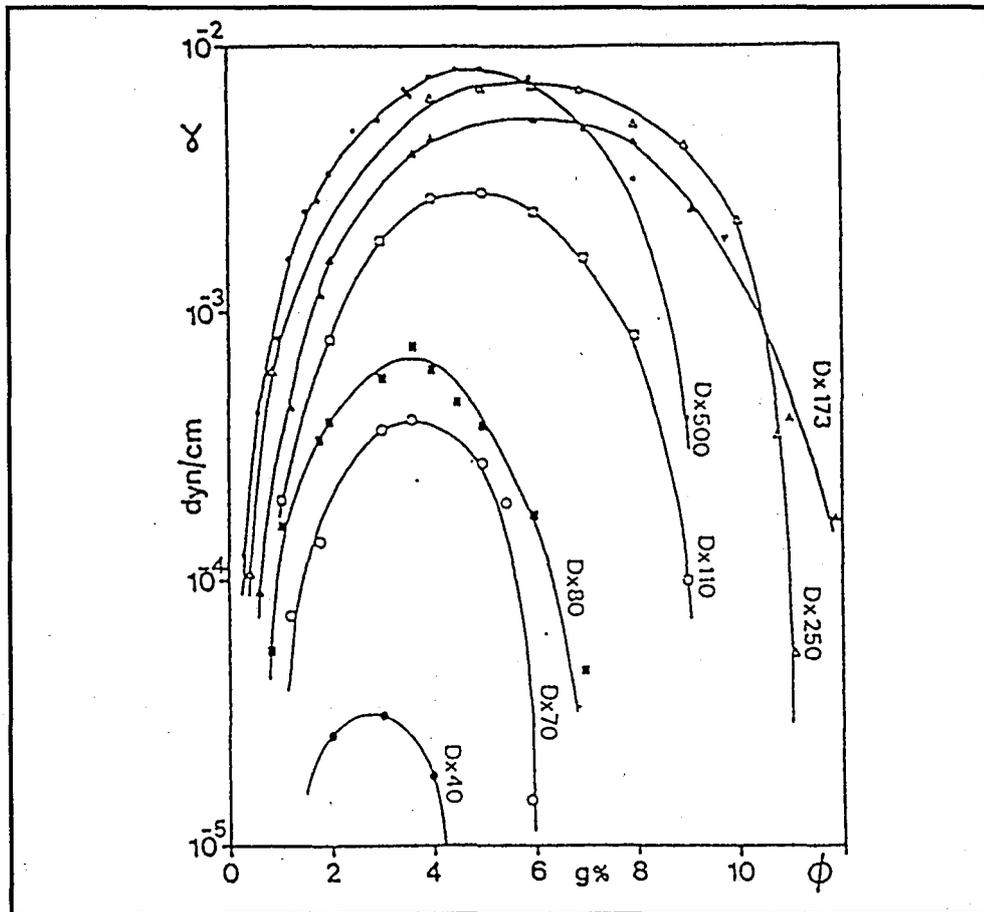


Figure 24: Variations expérimentales de l'énergie de surface γ des hématies avec la concentration ϕ en dextran ($I=150mM$, $H=0,45$, $T=20^\circ C$) (d'après SNABRE P.1988) (203). (résultats obtenus à partir de la mesure de la contrainte critique τ_c de désagrégation de la suspension des hématies par une technique de réflectométrie optique).

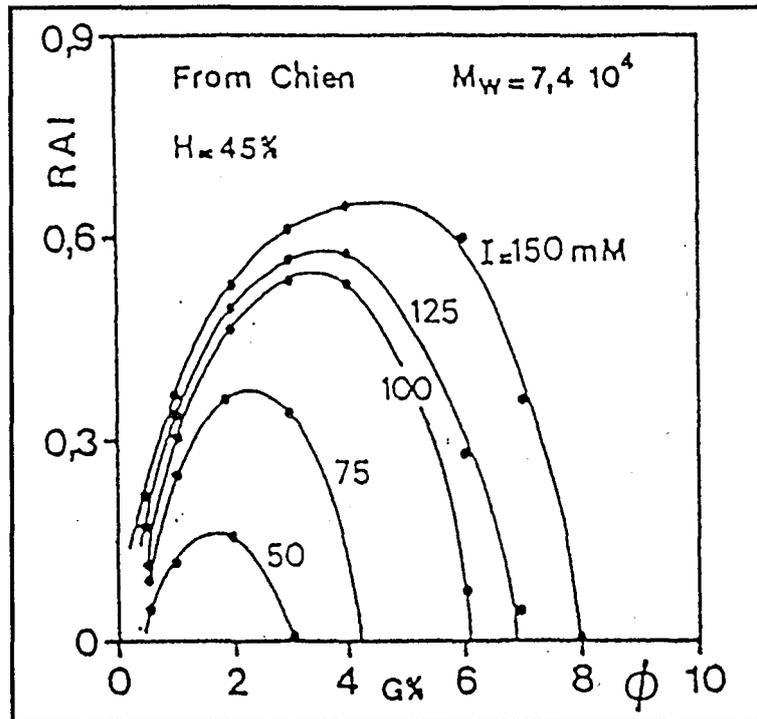


Figure 25: Variations expérimentales de l'index d'agrégation RAI (reflectometric aggregation index) des hématies avec la concentration en dextran 80 et la force ionique I du milieu de suspension. (d'après CHIEN S. et JAN K.M. 1973) (39).

Par ailleurs, après avoir diminué la charge de surface des hématies par un traitement à la neuraminidase, l'agrégation des hématies due à la formation de ponts macromoléculaires ne trouve pas d'opposition due à la répulsion électrostatique et il apparaît donc un plus fort degré d'agrégation des hématies. Dans ce cas, la phase de désagrégation à forte concentration en dextran ou à faible force ionique est supprimée (Figure 26) (38, 39, 103).

Par ailleurs, si les conditions d'agrégation sont réalisées, l'agrégation attribuée à l'adsorption de molécules sur les surfaces des hématies et au pontage entre celles-ci est également fonction de la charge de la macromolécule :

- Pour les protéines plasmatiques (chargées négativement au pH physiologique) et pour les dextrans (polymères neutres), l'adsorption est due probablement à des forces attractives de Van Der Waals et des liaisons hydrogènes (111, 160).

- Pour les macromolécules chargées positivement comme les polylysines, la protamine, l'acide polyglutamique, l'adsorption est due à des forces électrostatiques attractives, la surface des hématies étant chargée négativement. Ces forces sont beaucoup plus importantes que les précédentes et provoquent l'agglutination, phénomène irréversible (40,135).

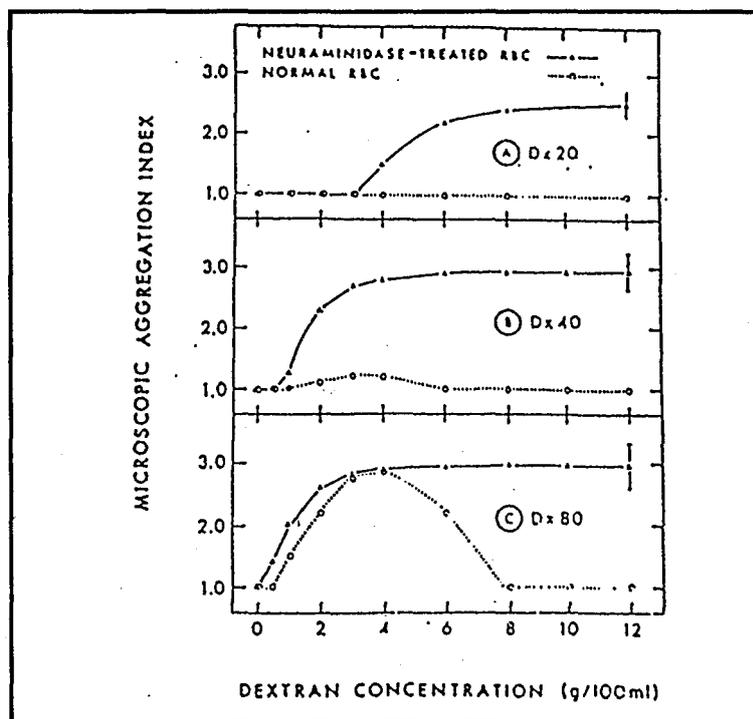


Figure 26 : Effets des dextrans sur l'agrégation des hématies d'un sang normal (pointillé) et traitées par la neuraminidase (traits pleins). On remarque que les hématies traitées par la neuraminidase agrègent plus fortement que les hématies normales et qu'elles ne présentent plus les phases de la désagrégation pour les fortes concentrations en dextran (d'après CHIEN S. et JAN K.M. 1973) (39).

III.3. Propriétés intrinsèques des hématies

Les propriétés des hématies influençant l'agrégation érythrocytaire sont principalement l'hématocrite, la déformabilité et comme on vient de le voir (Figure 26), la charge électrique de surface..

III.3.1. Hématocrite

De nombreux travaux ont mis en évidence le fait que l'augmentation de l'hématocrite entraîne une élévation de la viscosité apparente notamment aux faibles taux de cisaillement (31,169,208,224). La relation n'est pas linéaire et on note une augmentation très importante de la viscosité quand l'hématocrite est égal ou supérieur à 0,50 l/l. Dans le réseau capillaire, la chute de la viscosité sanguine est due à une modification des forces de cisaillement et à la formation d'un manchon plasmatique autour des hématies. Il apparaît une diminution de l'hématocrite dans les capillaires jusqu'à une valeur allant de 0,10 à 0,20 l/l (167).

En ce qui concerne le rôle de l'hématocrite sur l'agrégation, il est clair que ce paramètre joue un rôle important. Dans la gamme normale d'hématocrite (0,35-0,55 l/l), une augmentation de l'hématocrite provoque dans des investigations in vitro, une augmentation de la cinétique d'agrégation et une diminution de la cohésion des rouleaux (165). Toutefois, pour des hématocrites anormalement faibles (<0,35 l/l) ou élevés (>0,55 l/l), il semble que des artefacts dus aux principes physiques des mesures ne permettent pas la description de relations simples entre l'hématocrite et les paramètres de l'agrégation (Figure 27) (56)

III.3.2. Propriétés de la membrane érythrocytaire

Des études en microscopie électronique (39) ont montré que la formation des ponts multiples intercellulaires nécessite une déformation membranaire en vue d'offrir des

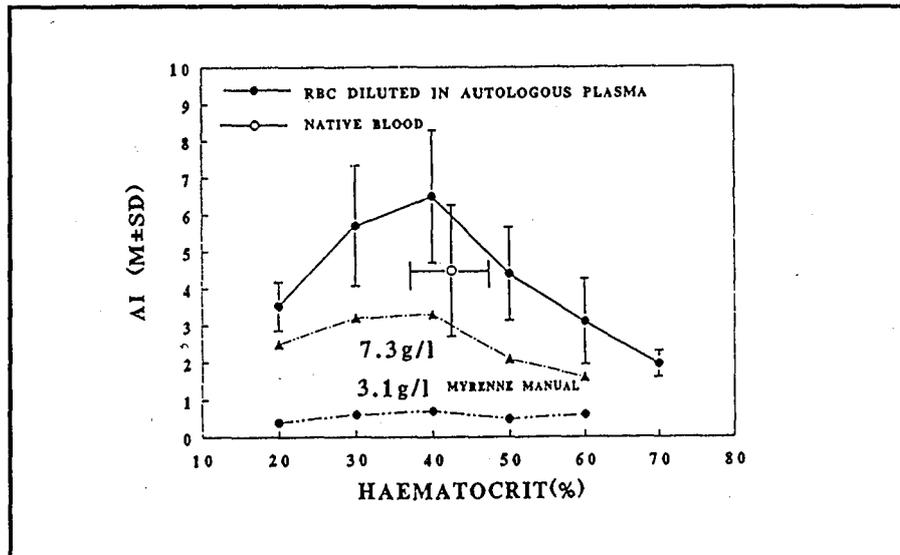


Figure 27 : Variation de Index d'agrégation en fonction du taux d'hématocrite (d'après DENG et coll. 1994) (56).

surfaces cellulaires parallèles. La déformabilité de la membrane favorise ainsi la progression de la formation du pontage en offrant une aire maximale de surface cellulaire pour les pontages macromoléculaires. Les forces mécaniques liées à la courbure membranaire doivent être surmontées pendant le processus de la formation des rouleaux. En effet, la majeure partie de l'énergie totale d'agrégation est stockée dans la membrane comme changement dans l'énergie de tension. La libération de cette énergie stockée pendant la désagrégation aide probablement au processus de séparation (44,46).

Les données de la dernière décade ont montré que le réseau squelettique membranaire composé essentiellement de : spectrine, actine et tropomyosine contrôle la déformabilité et la stabilité mécanique de la membrane érythrocytaire (150). En effet, l'organisation des molécules de spectrine érythrocytaire confère leur flexibilité mécanique qui joue un rôle significatif dans la déformabilité des hématies (47,132). Une augmentation des associations des protéines du cytosquelette ou une augmentation de l'association des protéines intégrales membranaires telle que la glycophorine A avec le réseau du cytosquelette conduit à une diminution importante de la déformabilité membranaire (150).

III.3.3. Charge électrique de surface de l'hématie

Les acides sialiques (acides N-acétylneuraminique) portés par les sialoglycoprotéines qui forment le revêtement glycoprotéique extracellulaire (glycocalix) sont responsables de la charge négative de la surface de l'hématie (21, 123, 202).

En effet, les forces électrostatiques répulsives dus aux charges électriques surfacielles de l'hématie représentent un paramètre essentiel au niveau des énergies de désagrégation. Les forces de répulsion électrostatiques par unité de surface (P_e) peuvent être calculées en supposant les surfaces membranaires planes, et en connaissant le potentiel de membrane, la force ionique et la distance entre les membranes.

$$P_e = 0,064 IRT \tanh^2 (ZE\zeta/4KT) \exp (\chi d)$$

avec : E : charge de l'électron; N: nombre d'Avogadro; Z: valence de l'ion;
I : force ionique; T: température absolue; K: constante de Boltzmann;
d : distance intercellulaire; R: constante des gaz parfaits;
 ζ : potentiel zêta;
 χ : épaisseur de la double couche.

La distance intercellulaire d est très variable selon le type de molécule utilisée. Selon MILLS, la distance intercellulaire ne dépend pas uniquement de l'équilibre entre forces d'adsorption et forces électrostatique mais également des interactions de type stérique entre les macromolécules (149).

Un remplacement de 2,5-10 mM de Na^+ dans une solution de NaCl de 150 mM par une quantité équimolaire de Mg^{2+} , Ca^{2+} ou Ba^{2+} entraîne une diminution du potentiel zêta des hématies normales et également une augmentation de l'agrégation érythrocytaire en

présence de Dextran 40 et Dextran 80. De plus, quand la force ionique du milieu suspendant est abaissée par un remplacement équiolaire de NaCl par du Saccharose, la mobilité électrophorétique des hématies est accélérée. Or une baisse de la force ionique du milieu suspendant conduit à une diminution de l'efficacité du dextran 80 sur l'agrégation des hématies (38).

Par ailleurs, si l'agrégation est induite par des polymères chargés positivement, les charges négatives servent de sites de liaison avec les groupements positifs des polymères. L'enlèvement de la charge de la surface de l'hématie par traitement des certaines enzymes (la neuraminidase ou la trypsine par exemple) provoque une augmentation de l'agrégation et une diminution de la désagrégation des hématies en raison de la suppression des forces électrostatiques répulsives (46).

De plus, BABACAR, a observé que la mobilité effective des hématies humaines dans un sérum physiologique diminue avec la concentration de trypsine dans le domaine des concentrations inférieures à $\phi_m = 30\text{mg \%}$ puis se stabilise au-delà. Toutefois, l'agrégation des hématies dans une solution de Dextran 70 ($\phi = 3\text{g\%}$, $\text{pH} = 7,5$, $I = 150\text{ mM}$) augmente avec la concentration en trypsine sans phase de stabilisation, dans la gamme des fortes concentrations en polymère (9).

IV. METHODES D'ETUDE DE L'AGREGATION DES HEMATIES

IV.1. Vitesse de sédimentation

La mesure de la vitesse de sédimentation a été développée en premier lieu et considérée comme un critère de l'agrégation des hématies en clinique médicale. C'est une des méthodes les plus anciennes et les plus couramment utilisées pour estimer indirectement l'agrégation érythrocytaire.

En effet, la vitesse de sédimentation dépend du degré de formation des rouleaux présents dans le sang total. Toutefois, il existe un grand nombre de facteurs tels que l'hématocrite du sang, la viscosité du plasma, la densité du milieu suspendant et la déformabilité des hématies (99), qui affectent la vitesse de sédimentation. Si l'hématocrite est toujours ajusté à valeur constante (par exemple: 0,45l/l), il est toutefois difficile de corriger les autres facteurs. Bien que très grossière, la mesure de la vitesse de sédimentation du sang total a l'avantage d'être simple et rapide, ce qui est intéressant en routine.

Depuis 1926, la méthode clinique de WESTERGREN sert toujours de référence (225). En hémorhéologie, une augmentation de la vitesse de sédimentation du sang total est associée à un état d'hyperagrégation érythrocytaire. En effet, la vitesse de sédimentation augmente avec la taille des agrégats et varie comme l'énergie de surface γ des cellules (énergie adhésive par unité de surface) (203).

D'autres techniques basées sur les caractéristiques physiques du sang ont été proposées :

- La mesure de l'énergie ultrasonore rétrodiffusée par les hématies et les rouleaux pendant la sédimentation a été utilisée pour la détermination de la taille des rouleaux et agrégats des hématies (28, 88).
- Plus spécifique est l'équation de CHIEN (39) qui a proposé d'obtenir une vitesse de sédimentation (ESR : Erythrocyte Sedimentation Rate) corrigée en compensant les différences dues à la viscosité et à la densité du milieu suspendant :

$$ESR = ESR_{\max} \times \frac{\eta / \eta_0}{\Delta\rho / \Delta\rho_0}$$

où ESR_{max} désigne le maximum de ESR calculé selon la méthode de LUNDGREN (131), ROURKE et ERNSTENE (181). η et η_0 sont les viscosités d'une solution de dextran et d'une solution de Ringer respectivement. $\Delta\rho$ est la différence de densité entre la solution d'hématies et la solution de dextran. $\Delta\rho_0$ est la différence de densité entre la suspension d'hématies et la solution de Ringer.

- POTRON et coll. (229) en utilisant un système équipé de deux caméras vidéos et une analyse d'image (automate Sédiscan) ont trouvé une bonne corrélation entre la vitesse de sédimentation et les paramètres cinétiques d'agrégation déterminés par rétrodiffusion laser.
- ANTONIOW et coll. (230) ont utilisé la radiométrie photothermique sous excitation aléatoire et ont montré que cette méthode pourrait permettre de caractériser la sédimentation sanguine, les résultats préliminaires sur sang total étant en accord avec les modèles théoriques.
- Récemment ZHAO et LOCKNER (227) ont comparé la méthode de mesure de l'impédance électrique du sang en déterminant la résistance du plasma (R_p), la résistance intérieure cellulaire (R_i), la capacitance de la membrane cellulaire (C_m) et la méthode de détermination de la vitesse de sédimentation (ESR). ESR est corrélé significativement avec R_p et C_m . Ils ont conclu que la mesure de l'impédance peut être une méthode alternative de détermination rapide de la vitesse de sédimentation.

IV.2. Techniques viscosimétriques

Il est bien connu que de la viscosité apparente du sang aux faibles vitesses de cisaillement reflète le degré d'agrégation érythrocytaire. Par contre, la faible viscosité du sang dans un écoulement rapide se manifeste par une désagrégation complète et une orientation des hématies déformables dans le champ de cisaillement.

En viscosimétrie sanguine, deux modes de mesure sont généralement proposés: les modes stationnaire et instationnaire (117).

IV.2.1. Mode stationnaire

Dans le mode stationnaire, la viscosité η est étudiée en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$.

Les dispositifs utilisés pour les mesures de la viscosité sanguine en régime stationnaire sont essentiellement des viscosimètres rotatifs de type plan-cône, cône-cône ou à cylindre coaxiaux.

Le dispositif employé dans notre étude est un rhéomètre rotatif, basé sur le principe de Couette (Low-Shear 30 Contraves, Zürich, Suisse). Les deux cylindres ont des diamètres de 11mm et 12mm respectivement. Dans ce dispositif, le cisaillement stationnaire du fluide est effectué par le mouvement imposé au cylindre extérieur. On peut faire varier les vitesses de rotation pour appliquer huit taux de cisaillement fixes dans la gamme 0,2 à 128 sec^{-1} . Le cylindre intérieur est suspendu à un dispositif de mesure mécanique (fil de torsion). Lorsque le cylindre extérieur tourne à la vitesse de rotation Ω , le liquide est mis en rotation et exerce un couple de frottement visqueux sur le cylindre intérieur qui est maintenu fixe par un moyen approprié.

IV.2.2. Mode instationnaire

Dans le mode instationnaire, la réponse en contrainte de cisaillement τ est étudiée lorsque la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ est variable avec le temps t .

Les principales mesures de viscosimétriques en mode instationnaire sont : l'écoulement oscillant en tubes (53,221), l'écoulement oscillant ou transitoire en régime de

Couette (90,98,126, 209). Un Viscosimètre à Palier Fluide permet d'effectuer des mesures sous différents régimes d'écoulements: mise en mouvement, relaxation, étude pulsée et étude stationnaire (224). Un viscosimètre de type Couette a été développé pour travailler en mode stationnaire et instationnaire (Figure 28)

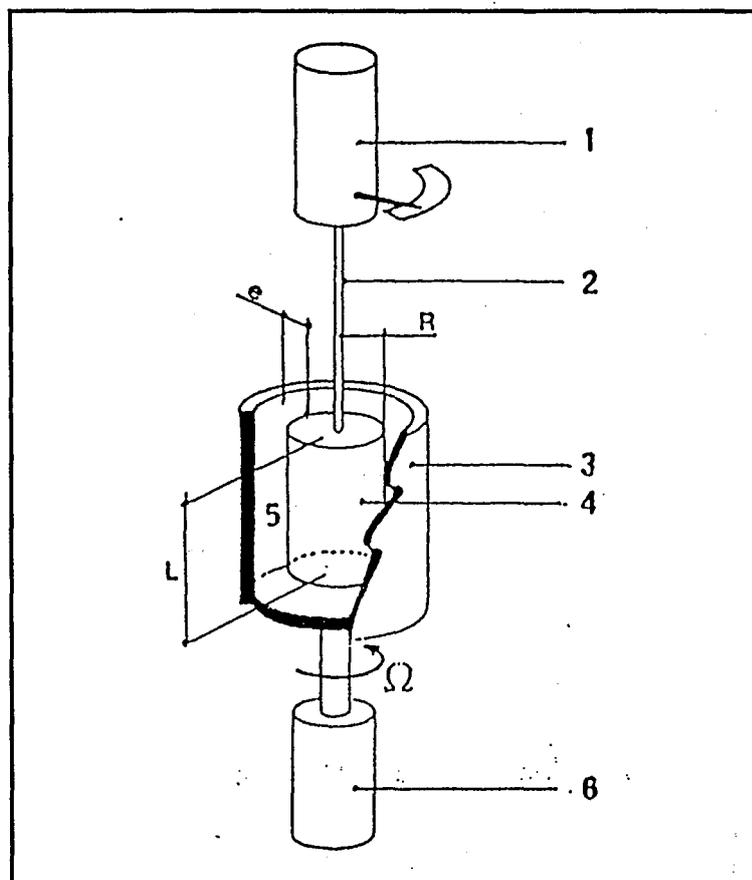


Figure 28 : Schéma de principe d'un viscosimètre à cylindres coaxiaux rotatifs de type Couette. (1) dispositif de mesure du couple mécanique; (2) fil de torsion; (3) cuve thermostatée à 25°C; (4) plongeur; (5) sang à hémocrite 45%; (6) moteur tournant à la vitesse de rotation Ω réglable. Les caractéristiques du viscosimètre du laboratoire sont: $L=7\text{mm}$, $R=4\text{mm}$, $e=1\text{mm}$. Les cylindres intérieur et extérieur sont réalisés en acier inoxydable (d'après LACOMBE C. et LELIEVRE J.C. 1986) (117).

IV.3. Observations microscopiques

De nombreuses équipes ont développé des méthodes optiques (60, 61), en particulier, des essais de quantification de l'agrégation érythrocytaire à partir d'observations directes au microscope (213).

IV.3.1. Observations microscopiques statique et dynamique

CHIEN et JAN ont observé directement au microscope une suspension diluée à l'hématocrite de 0,01 l/l. La comparaison entre la suspension d'hématies dans du plasma (ou des solutions macromoléculaires) et celle des mêmes hématies suspendues dans un milieu Ringer-Albumine (0,5%) permet de calculer un index d'agrégation MAI (index d'agrégation microscopique) (39) :

$$\text{MAI} = \frac{\text{Nombre d'unités dans la solution macromoléculaire}}{\text{Nombre de cellules dans la solution Ringer - Albumine}}$$

Une unité peut être soit une hématie isolée, soit un agrégat.

Par ailleurs, la méthode du microscope électronique a été introduite par CHIEN et JAN (39) pour étudier la structure des rouleaux formés dans des solutions de dextrans de différentes masses moléculaires. Ils ont observé que les surfaces adjacentes cellulaires dans les rouleaux sont parallèles les unes aux autres du fait que, au moment du pontage, les membranes des hématies sont déformées. De plus, la distance intercellulaire ne varie pas significativement pour des concentrations en dextran inférieures à 4g/100ml.

GOLDSMITH (83) a également observé au microscope les mouvements de cellules individuelles et de rouleaux en écoulement stabilisé.

IV.3.2. Observations microscopiques couplées à une technique viscosimétrique

SCHMID-SCHÖNBEIN et coll. (184, 187) ont décrit le rhéoscope (microscope associé à un viscosimètre cône-plan) qui permet d'observer directement le comportement du sang soumis à une contrainte de cisaillement définie.

IV.3.3. Observations microscopiques et analyse d'images

En 1986, STOLTZ et PAULUS. en utilisant un rhéoscope et un dispositif de prise d'image avec un équipement photographique ont proposé un traitement numérique de photos afin de définir un paramètre sans dimension K ($K = 4\pi S/P^2$ où S désigne la surface de l'agrégat et P le périmètre) (161, 162, 212).

SATHO et coll. (182), en utilisant un rhéoscope associé à un analyseur d'image, ont déterminé le nombre moyen et la surface moyenne des agrégats dans une suspension d'hématies à l'hématocrite de 0,26% soumise à un cisaillement de $7,6 \text{ sec.}^{-1}$, ainsi qu'un paramètre définissant la cinétique d'agrégation exprimée en $\mu\text{m}^2/\text{mn}$.

SHIGA et MAEDA (199) ont analysé l'agrégation érythrocytaire à une vitesse de cisaillement constante avec un rhéoscope couplé une caméra vidéo, un analyseur d'image et un ordinateur. L'agrégation des hématies a été simulée par un modèle cinétique de polymérisation linéaire (Figure 29). Les images vidéo des mouvements des particules des hématies isolées et des agrégats sont digitalisées. Le nombre et l'aire des particules sont déterminés par l'analyseur d'images.

MCHEDLISHVILI et coll. (140) ont déterminé le degré de l'agrégation érythrocytaire à l'aide d'un système d'analyse d'images comportant un microscope et un caméscope combinés à un ordinateur. Le système fonctionne sur la base des différences marquées entre la densité optique des hématies (et leurs agrégats) et celle du plasma. L'index de l'agrégation

érythrocytaire proposé a montré une relation entre l'aire totale des agrégats d'hématie et celle des hématies isolées. Il semble que cet index soit une représentation des différentes tailles et formes des rouleaux et des agrégats des hématies.

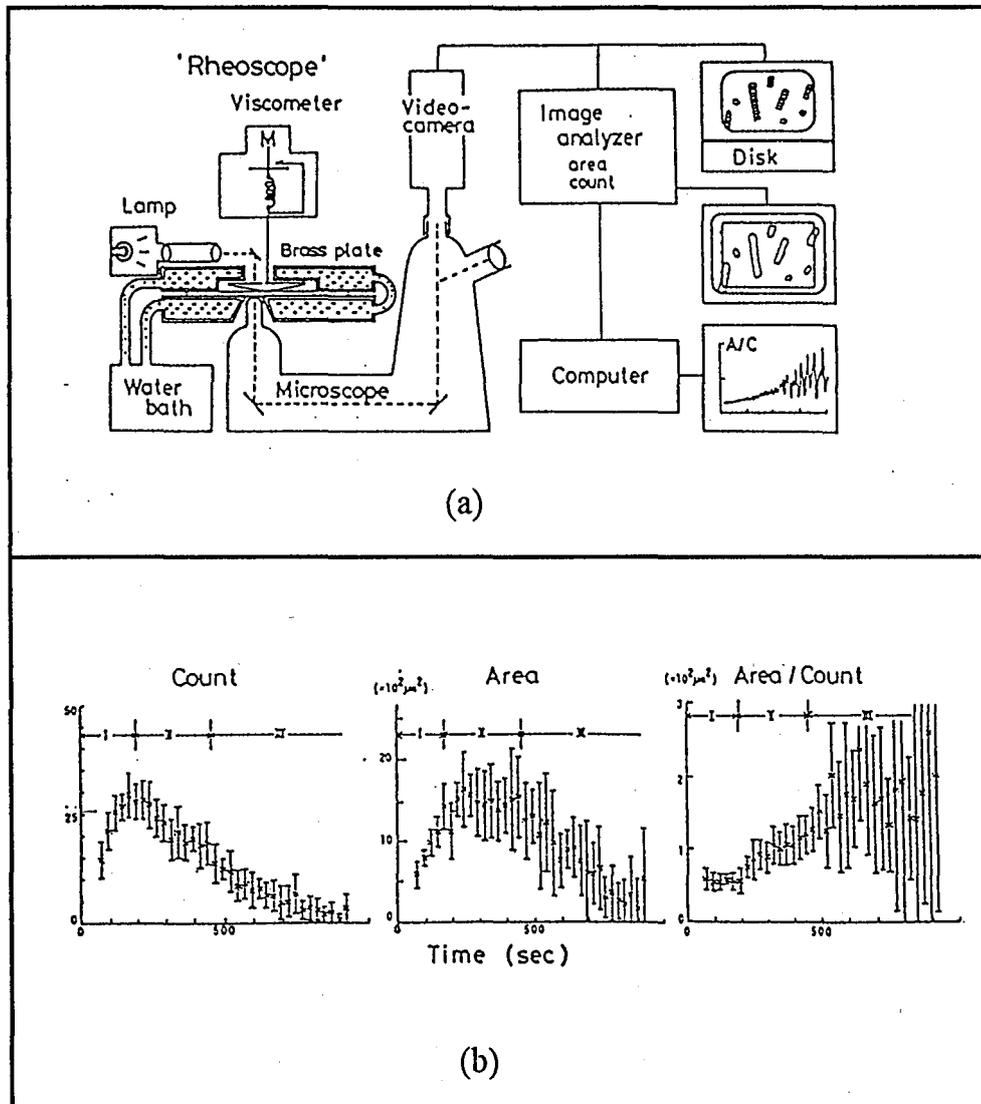


Figure 29 : (a) Schéma de l'appareil et (b) agrégation des hématies en fonction du temps (d'après SHIGA T. et MAEDA N. 1989) (199).

Récemment MUNN et coll. ont publié (152) un essai quantitatif de la fonction lymphocytaire en se basant sur l'agrégation intercellulaire. Un microscope couplé à une station vidéo sont utilisés pour suivre au cours du temps l'agrégation lymphocytaire. Tous les

processus sont automatiques. Une analyse des structures d'agrégats en deux ou trois dimensions est utilisée pour définir un facteur de forme qui permet de comparer les forces mécaniques de la liaison et l'activité cytosquelettique. Le facteur de forme bidimensionnel σ_i est calculé pour chaque objet avec la formule :

$$\sigma_i = \frac{P_i^2}{4\pi A_i}$$

où P_i est périmètre et A_i l'aire de chaque agrégat projeté. Ce facteur de forme bidimensionnel prend une valeur de 1 pour un rond parfait et augmente quand la forme est "tortueuse". Cette formule est exacte pour un agrégat contenant 2 à 3 cellules. Pour décrire la forme tridimensionnelle de l'agrégat, les auteurs ont également proposé un facteur d'empilement β et une formule :

$$n_i = \frac{\beta}{\sqrt{\sigma_i}} \left(\frac{A_i}{a_i} \right)^{1/3}$$

où A_i est l'aire de l'agrégat, a_i est l'aire d'une cellule isolée, et n_i le nombre de cellules dans l'agrégat.

IV.4. Mesure des variations d'intensité lumineuse

Depuis 1949, DOGNON et coll. ont mis en évidence l'influence de l'agrégation érythrocytaire sur l'intensité de la lumière transmise ou réfléchiée par un échantillon de sang (61, 62). De nombreux chercheurs ont alors mis au point des mesures des variations d'intensité lumineuse pour approcher et quantifier l'agrégation érythrocytaire.

Parmi les travaux les plus récents, il faut signaler les mesures de la lumière transmise et rétrodiffusée.

IV.4.1. Lumière transmise

SCHMID-SCHÖNBEIN et coll.(186) ont montré l'intérêt de la mesure du flux lumineux transmis à travers l'entrefer d'un viscosimètre cône-plan. Ce rhéoscope modifié par l'adaptation d'un dispositif photoélectrique permet de suivre les variations de la transmission de la lumière à travers un échantillon de sang (111, 222).

La vitesse de cisaillement correspondant au minimum de transmission reflète l'état d'agrégation du sang.

La cinétique d'agrégation peut être suivie par l'enregistrement des variations de la transmission lumineuse en fonction du temps après l'arrêt brutal de l'écoulement. Cet enregistrement est appelé syllectogramme (Figure 30). En effet, l'arrêt brusque du cisaillement est suivi d'une diminution de la lumière transmise due à la désorientation des cellules dispersées, puis d'une augmentation de la transmission correspondant à l'agrégation érythrocytaire.

SCHMID-SCHÖNBEIN et coll. ont développé un agrégamètre photométrique (Myrenne, GMBH) (Figure 31) qui calcule un index d'agrégation appelé indice de Myrenne. Les hématies sont soumises à un cisaillement élevée (600sec^{-1}) dans un viscosimètre cône plan. Après avoir stoppé brusquement le moteur, les hématies complètement dissociées commencent à s'agréger. Le flux transmis augmente avec le temps. L'appareil intègre directement les variations de la transmission lumineuse (infra-rouge) pendant dix secondes, et donne un index AI qui approche semi-quantitativement la cinétique d'agrégation des hématies.

Il est certain qu'un tel index moyen ne reflète que l'agrégation dans son ensemble. En particulier, il ne présente pas de corrélation évidente avec les données expérimentales obtenues par microscopie optique directe (210).

Des modifications informatiques ont été faites en 1987 par BAUERSACHS et coll. (10). Ils ont développé un système automatisé, basé sur l'Agrégamètre de Myrenne et un équipement informatique, qui permet de mesurer plusieurs facteurs de l'agrégation pendant 8 minutes. Les paramètres déterminées à la stase comportent : 1) Index d'agrégation; 2) t-rapide (constante de temps correspondant à une phase précoce d'agrégation); 3) t-lent (constante de temps correspondant à une phase tardive d'agrégation); 4) t-1/2 (temps correspondant à la moitié du temps de l'agrégation totale); 5) Amp (amplitude du changement de la transmission lumineuse); 6) Rel (proportion relative de la phase lente). Les mesures sous cisaillement sont : 1) Gamma Tmin (valeur de la vitesse de cisaillement pour une lumière transmise minimale entre 5 à 500 s⁻¹); 2) FSAR (rapport de l'agrégation dans un écoulement (10sec⁻¹) / l'agrégation au repos).

IV.4.2. Lumière rétrodiffusée laser

D'un point de vue théorique, la lumière transmise à travers une suspension de grosses particules est une fonction compliquée de l'épaisseur géométrique du milieu éclairé et des coefficients d'absorption et de diffusion des hématies. Par contre, le flux de la lumière rétrodiffusée s'exprime de façon assez simple lorsque le milieu est suffisamment épais pour que le flux transmis soit faible. Dans ces conditions et en utilisant une source lumineuse dont l'émission se trouve dans une plage du spectre où l'absorption par les hématies est faible. MILLS et coll. (146, 148) ont montré que l'intensité du flux lumineuse rétrodiffusé par une suspension sanguine est une fonction plus simple que celle gouvernant l'intensité de la lumière transmise.

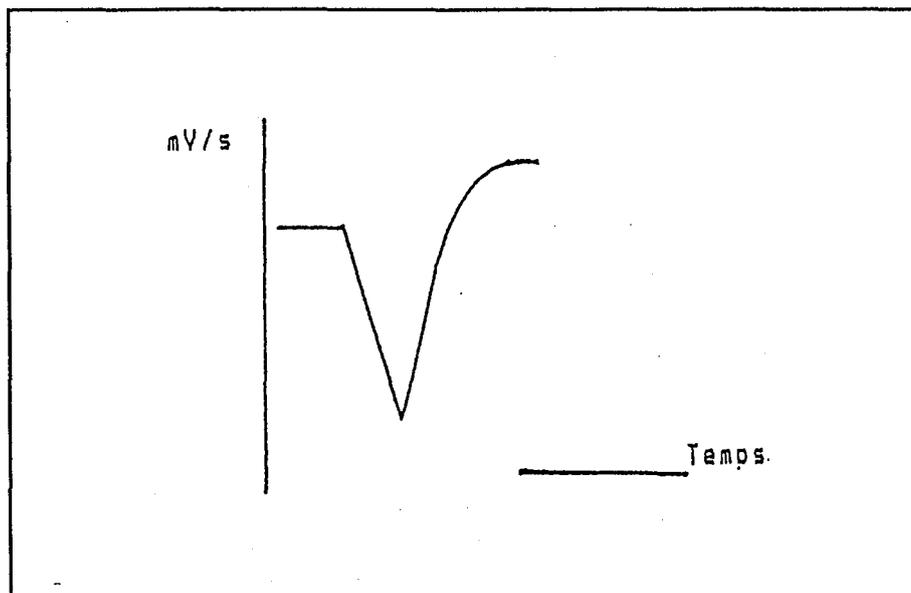


Figure 30 : Syllectogramme : diminution de la lumière transmise (passage à l'état "random cell flow", puis augmentation de la transmission due à la formation des rouleaux. (D'après KLOSE H.J. et coll. 1972) (111).

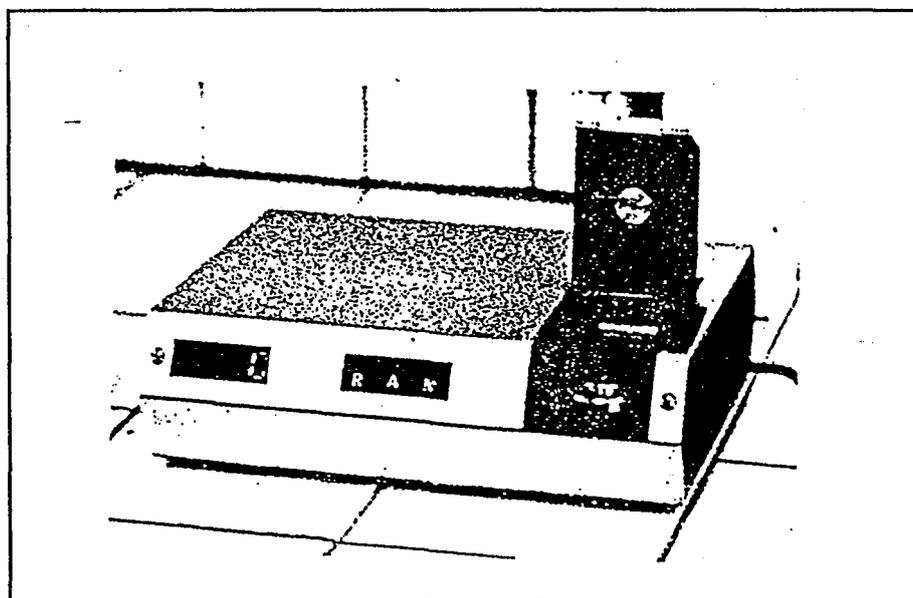


Figure 31 : Agrégamètre automatique (Myrenne GmbH).

A la suite des travaux de MILLS et coll., un système instrumental a été développé (67, 212) qui permet de déterminer automatiquement à la fois des paramètres cinétiques, structuraux et rhéologiques de l'agrégation érythrocytaire (Erythroagrégamètre, Affibio, Villers-lès-Nancy). Ce système est un viscosimètre de type Couette transparent, éclairé par une diode laser émettant dans le proche infra-rouge. Une photodiode reçoit le flux rétrodiffusé. La vitesse de rotation du cylindre extérieur est variable et contrôlée par un microordinateur, ce qui permet d'appliquer à la suspension sanguine des vitesses de cisaillement comprises entre 7 et 600 s^{-1} (Figure 32).

L'agrégation érythrocytaire est étudiée à l'aide de deux programmes de mesure et permet la détermination de paramètres cinétiques et rhéologiques.

a) Cinétique d'agrégation à l'arrêt

Le sang est soumis à une vitesse de cisaillement élevée, telle que les hématies sont dissociées et orientées. L'intensité du flux lumineux est notée R_{DO} . La contrainte étant stoppée brusquement, on enregistre une augmentation, puis une décroissance de l'intensité du flux lumineux rétrodiffusé. L'intensité maximale du flux rétrodiffusé R_{DD} correspond à l'état dissocié et désorienté des hématies. La diminution du flux rétrodiffusé traduit la formation des rouleaux puis des réseaux (ou des agrégats).

A partir de cette courbe, (Figure 33), l'ordinateur détermine 3 paramètres cinétiques :

- Temps d'agrégation (t_A): inverse de la pente de la courbe entre 0,3 et 1,9 secondes après suppression de la contrainte de cisaillement.
- Temps final d'agrégation (t_F): deux minutes après le début de l'agrégation on fait l'hypothèse que l'agrégation est complète. La différence $R_{DD}-R_t$ étant considérée comme égale à 100%, le temps final d'agrégation est le temps pour lequel la différence $R_{DD}-R_t$ est égale à 90%.
- Indice d'agrégation à 10 secondes (S_{10}) : rapport de la surface au-dessus de la courbe pendant les dix premières secondes suivant l'arrêt de la contrainte de cisaillement par la surface totale durant la même période.

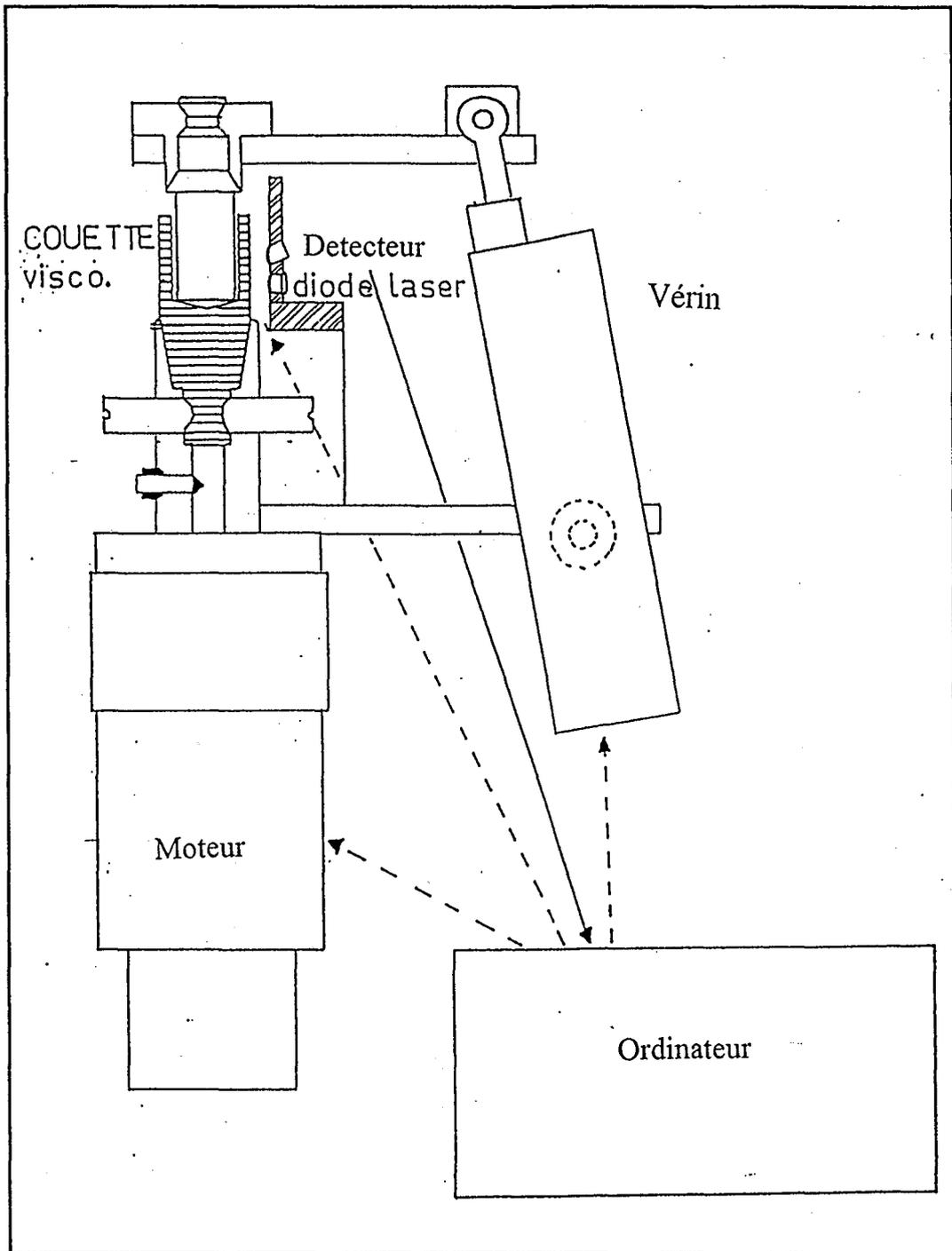


Figure 32 : Représentation schématique de l'Erythroagregamètre.

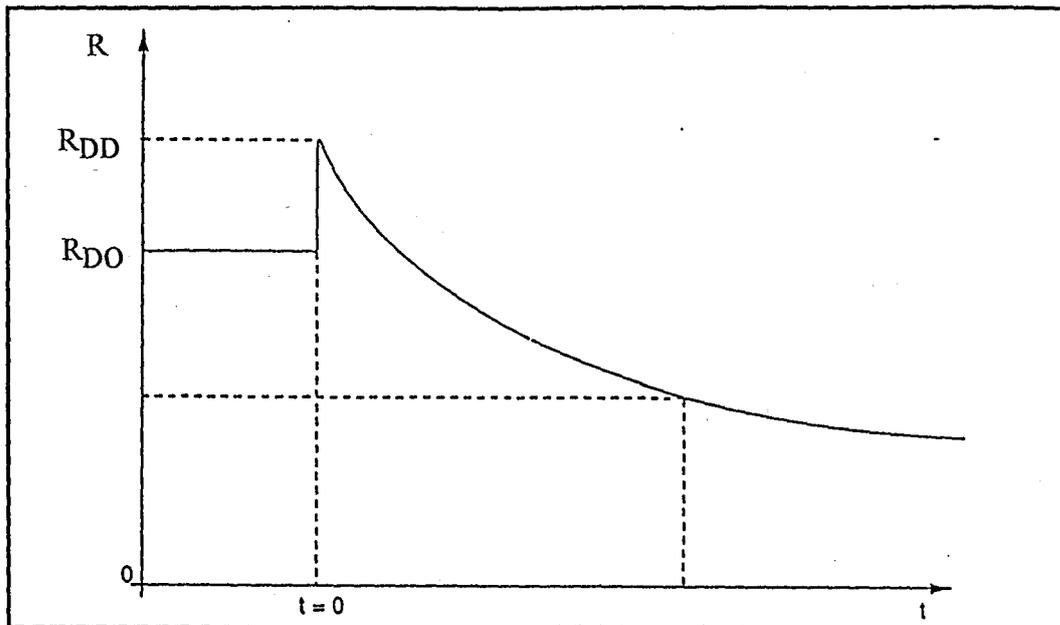


Figure 33 : Cinématique d'agrégation : enregistrement du flux lumineux rétrodiffusé en fonction du temps après arrêt du moteur au temps zéro.

b) Seuils de désagrégation

L'échantillon de sang est soumis à des vitesses de cisaillement décroissantes, chaque vitesse étant appliquée pendant 5 secondes puis stoppée également pendant 5 secondes.

On constate qu'en dessous d'un certain taux de cisaillement, les intensités R_{DD} et R_{DO} diminuent. Cette variation traduit le fait que la vitesse de cisaillement n'est plus suffisante pour orienter et dissocier les hématies. Les variations de R_{DO} entre 500 et $5s^{-1}$ permettent alors de déterminer des vitesses de cisaillement seuil correspondant à la désagrégation partielle ($\dot{\gamma}_D$) et totale des hématies ($\dot{\gamma}_S$).

$\dot{\gamma}_S$ correspond à la vitesse de cisaillement pour laquelle les intensités R_{DD} et R_{DO} commencent à diminuer. $\dot{\gamma}_D$ représente la vitesse de cisaillement correspondant à l'intersection de l'asymptote et à la droite correspondant à une régression linéaire pour les 7 vitesses de cisaillement les plus faibles (Figures 34, 35).

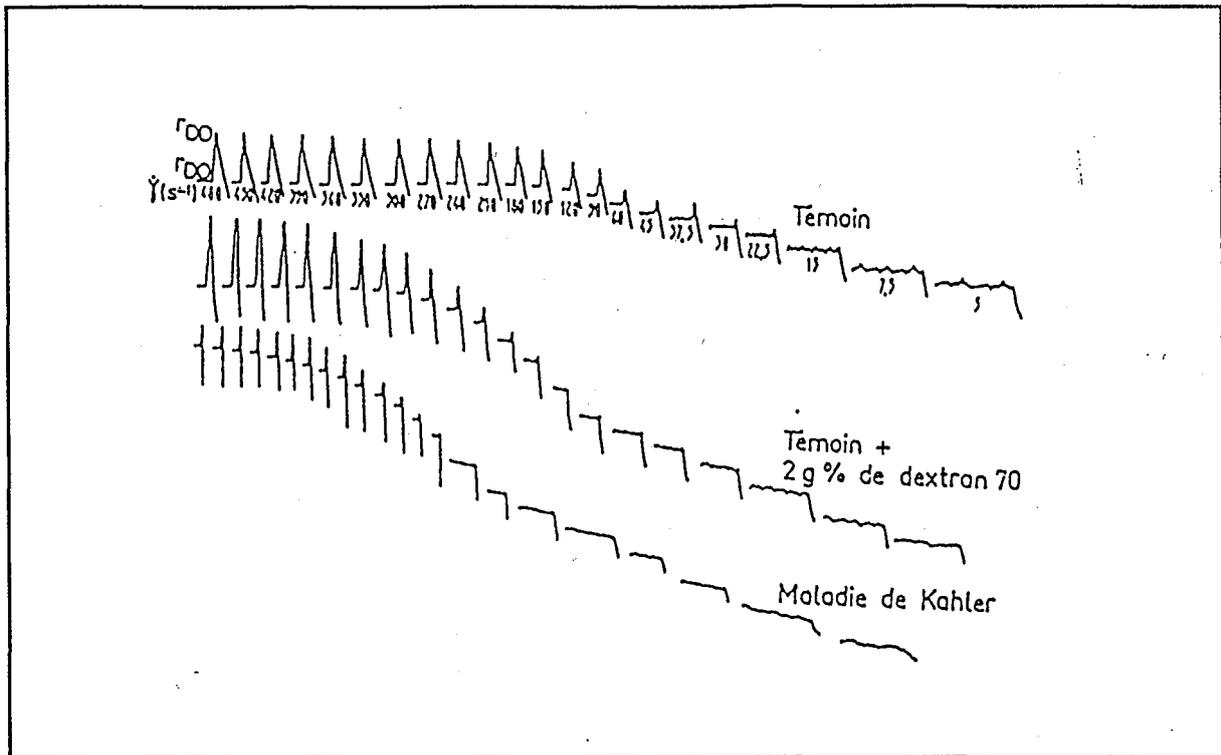


Figure 34 : Exemples d'enregistrement des variations de R_{DO} et R_{DD} en fonction de la vitesse de cisaillement (de 480 à 5 sec^{-1}) pour différents échantillons du sang.

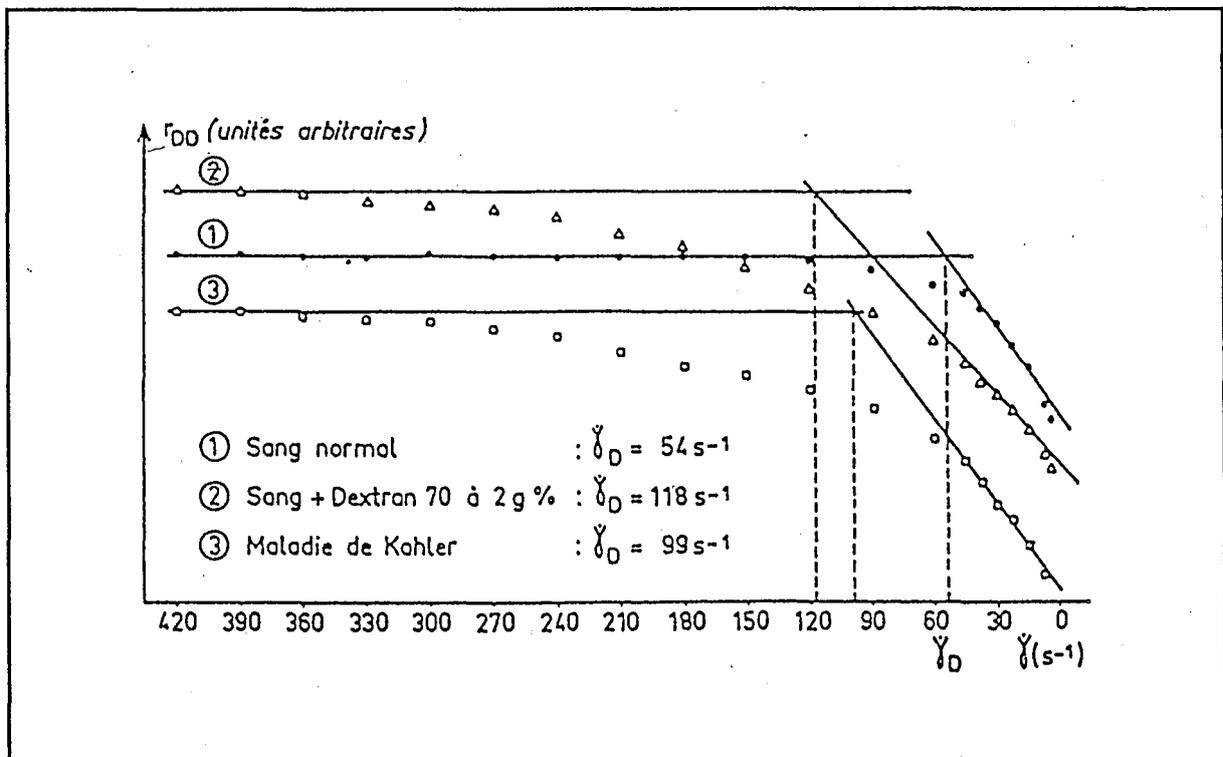


Figure 35 : Variations de R_{DD} (réflexion maximum) en fonction de la vitesse de cisaillement.

IV.5. Méthodes encore au stade du laboratoire

BOYNARD et coll. (16, 17) ont approché in vitro l'agrégation érythrocytaire par la méthode ultrasonore qui permet de mesurer un coefficient de rétrodiffusion ultrasonore (χ). Ils ont étudié la taille moyenne de l'agrégat pour les hématies suspendues dans une solution de dextran 70 ou dans du dextran 500 et ont conclu qu'une augmentation du coefficient de rétrodiffusion ultrasonore reflète une augmentation de la taille des agrégats d'hématies.

HERBST et GOLDSTEIN (92) ont présenté une étude de la cinétique d'agrégation érythrocytaire à partir de mesures du temps moyen de rétention des molécules d'eau dans les agrégats en utilisant la technique de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire).

BERLING et HALL (12) ont également étudié in vitro l'agrégation des hématies à l'aide de la méthode RMN. Ils ont calculé les valeurs du temps moyen de la relaxation d'eau intracellulaire (T_a) qui sont corrélées au nombre de cellules par agrégat en utilisant une relation entre T_a et le rapport volume/aire surfacique de l'agrégat. De plus, la cinétique d'agrégation est également déterminée.

IV.6. Méthodes in vivo

D'un point de vue hémorhéologique, les déterminations de l'agrégation des hématies in vitro ne sont pas tout-à-fait le reflet de la situation existant in vivo (70). Une situation hémodynamique locale (un état de faible débit), responsable d'une agrégation des hématies, peut induire des cercles vicieux même si les valeurs d'agrégation mesurées in vitro sont absolument normales. Pour ces raisons, de nombreuses méthodes ont été développées en vue de déterminer l'agrégation érythrocytaire in vivo.

Pour répondre à l'hypothèse d'une altération de la perméabilité capillaire au cours de l'inflammation, SKALAK en 1988 a proposé la technique de la chambre auriculaire pour observer "la compactage" des hématies. Cette technique a un intérêt considérable puisque : "lorsque la circulation est bloquée, le plasma quitte très rapidement les capillaires laissant derrière lui essentiellement une masse érythrocytaire constituée d'hématies étroitement tassés" (51). Ces observations ont montré que la stase de compactage pendant une réaction inflammatoire est accompagnée d'une perméabilité capillaire augmentée.

BRANEMARK a développé une méthode de visualisation biomicroscopique de fines sections de l'organe vaisseau-sang cultivé dans un pédicule cutané double à l'intérieur du bras supérieur fixé dans un compartiment en titane (18, 19). Au moyen de cette méthode, on peut enregistrer le flux sanguin dans des vaisseaux capillaires et identifier les structures au niveau des détails cellulaires.

FAGRELL a observé in vivo les capillaires de la peau du pied à l'aide d'un capillaroscope pour estimer l'état nourricier de la peau chez les patients présentant des occlusions artérielles périphériques (73).

BERNARD et coll. (13) ont proposé que l'agrégation des hématies doit être considérée comme une cause majeure de l'échogénicité du sang en utilisant des ultrasons à 5 mHz ou au dessus. Dans leurs observations, l'échogénicité augmente avec l'élévation de l'hématocrite, du fibrinogène, d'autres macromolécules et de la température. Ils ont conclu finalement que la technique ultrasonore est utile pour des applications in vitro et in vivo.

L'agrégation intravasculaire est déterminée par exemple de la conjonctive sous biomicroscope.

DEUXIEME PARTIE

**APPROCHES *in vitro* DE L'AGREGATION
ERYTHROCYTAIRE EN REGIME PULSE ET PAR
ANALYSE D'IMAGES**

II - 1
**AGREGATION ERYTHROCYTAIRE ET CISAILLEMENT
PULSE**

I. INTRODUCTION

Les types d'écoulement dans la circulation sanguine sont très complexes. Dans les artères, l'écoulement sanguin est pulsé. Les vitesses de cisaillement sont variables et il existe des fluctuations de pression, de vitesse et de turbulence. Dans les grosses artères en particulier derrière les valves et les embranchements, l'écoulement présente, aux instants où le débit est maximum, de nombreuses fluctuations de pression ou de vitesse. Ces fluctuations semblent être associées au jeu des valvules, à l'élasticité de la paroi, à des instabilités de couche limite ou de paroi, voire de la turbulence (122, 158). Par contre, dans la circulation veineuse compliquée par la structure des veines (existence de valvules axiales) et par l'existence de zones stagnantes (stase veineuse), l'écoulement sanguin est quasiment continu. Il en résulte que l'agrégation des hématies a tendance à apparaître dans les régions à faible cisaillement des veinules post-capillaires. Toutefois, il est fondamental de connaître le comportement des hématies dans toutes les conditions survenant dans les différents compartiments de la circulation sanguine et en particulier en régime pulsé.

Une étude préliminaire a été conduite dans le but de vérifier l'intérêt de mesures en régime pulsé.

Cette étude a mis à profit l'introduction dans l'Erythroagrégamètre d'un programme informatique permettant la détermination de la cinétique de formation des rouleaux en régime continu et en régime pulsé et la comparaison des paramètres déterminés.

Après un premier test du programme et des modifications effectuées à notre demande pour le rendre plus modulable, nous avons entrepris une série d'expérimentations dont les résultats sont rassemblés dans ce chapitre.

II. DETERMINATION DE L'AGREGATION EN REGIME PULSE

L'établissement du régime pulsé a été réalisé par un programme informatique développé par J. SIDELGHAZI (Ingénieur thechnologue) sous la responsabilité de J. DIDELON, IE INSERM. Ce programme informatique a été associé à un programme dont le principe est basé sur l'établissement d'un régime continu au cours duquel le sang est soumis à un cisaillement constant pendant 10 secondes (Erythroagrégamètre). Le programme en régime pulsé qui concerne uniquement la détermination d'un paramètre de cinétique d'agrégation, permet de faire varier les vitesses de cisaillement selon une amplitude et une fréquence définies. La suspension sanguine est soumise à une série de cisaillements pulsés pendant 10 secondes puis une analyse des variations de l'intensité de la lumière rétrodiffusée r est réalisée pendant 4 secondes. La détermination du paramètre t_A pulsé est effectuée comme pour t_A continu. Il correspond à l'inverse de la pente de la courbe $r = f(t)$ entre 0,3 et 1,9 secondes après l'arrêt du cisaillement.

Toutes les déterminations du paramètre d'agrégation t_A pulsé sont comparées avec t_A continu déterminé dans les mêmes conditions, mais avec un cisaillement continu.

Grâce au caractère très souple du nouveau programme informatique, nous avons la possibilité de choix des conditions suivantes :

- Nombre de cisaillement : 5 vitesses de cisaillement différentes peuvent être choisies;
- Valeur des vitesses de cisaillement : la valeur de cisaillement maximale est 600 sec^{-1} et minimale $0,2 \text{ sec}^{-1}$ et il est possible d'imposer aux vitesses de cisaillement un sens croissant ou décroissant.
- Amplitude du cisaillement : deux amplitudes différentes (30% et 75%) ont été employées dans cette étude. Pour l'amplitude de 30% par exemple, si la vitesse de cisaillement moyenne est 100 sec^{-1} , elle varie de 70 sec^{-1} à 130 sec^{-1} (Figure 36);
- Fréquence du cisaillement : elle peut être choisie entre 0,5 Hz et 4 Hz.
- Intervalle de temps entre deux cisaillements qui peut être choisi entre 5 secondes et 3 minutes.

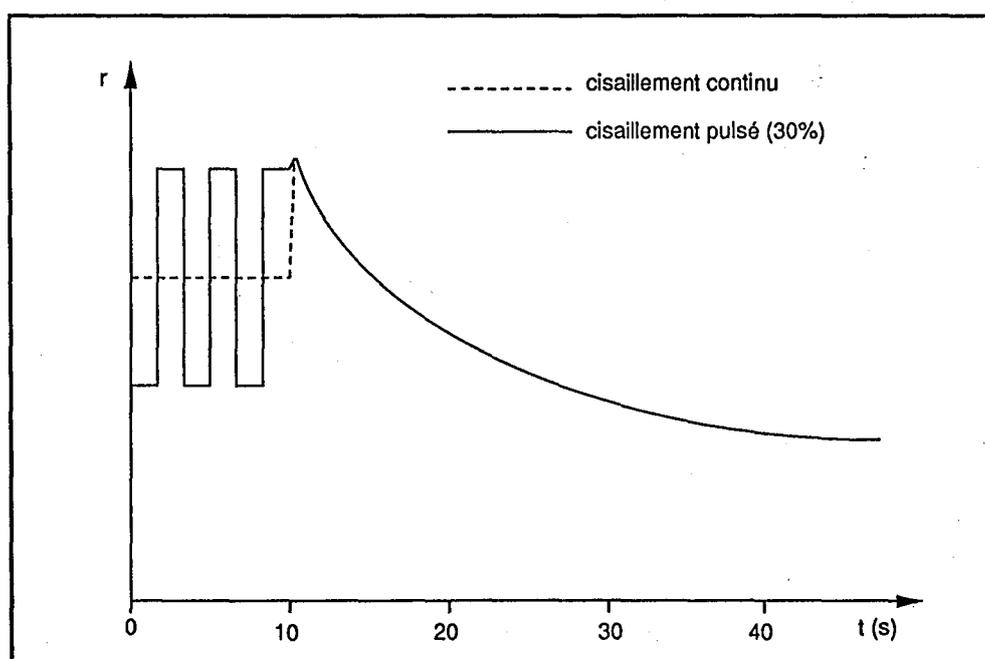


Figure 36 : Représentation schématique d'un cisaillement continu ou pulsé (amplitude de 30%) appliqué à une suspension sanguine.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé le processus de mesure suivant :

- La suspension sanguine est soumise tout d'abord à une série de vitesses de cisaillement continu;

- L'intervalle de temps entre le mode continu et le mode pulsé peut être choisi entre 10 secondes et 3 minutes;
- Ensuite, une série de vitesses de cisaillement pulsé est appliquée au même échantillon.

III. RESULTATS

III.1. Régime pulsé d'amplitude 30%

III.1.1. Description des conditions qui ont été employées

L'hématocrite final est fixé systématiquement à 0,40 l/l. Les suspensions sanguines sont soumises tout d'abord à des vitesses de cisaillement décroissantes continues, puis aux mêmes valeurs décroissantes de vitesses de cisaillement pulsé. Le délai entre les deux modes continu et pulsé est fixé à 20 secondes. Ensuite, un cisaillement croissant avec les mêmes valeurs est appliqué de la même façon sur le même échantillon.

Les valeurs de vitesse de cisaillement étudiées pour le régime continu et pulsé ont été fixées comme suit :

Cas n°1 :	150 sec ⁻¹	100 sec ⁻¹	75 sec ⁻¹	50 sec ⁻¹	25 sec ⁻¹ (décroissant)
	25 sec ⁻¹	50 sec ⁻¹	75 sec ⁻¹	100 sec ⁻¹	150 sec ⁻¹ (croissant)
Cas n°2 :	50 sec ⁻¹	35 sec ⁻¹	20 sec ⁻¹	15 sec ⁻¹	10 sec ⁻¹ (décroissant)
	10 sec ⁻¹	15 sec ⁻¹	20 sec ⁻¹	35 sec ⁻¹	50 sec ⁻¹ (croissant)

III.1.2. Effet d'un cisaillement pulsé sur la cinétique d'agrégation d'un sang normal

Des expérimentations de reproductibilité ont été effectuées dans le cadre d'une étude préliminaire. On constate sur le Tableaux VI que les coefficients de variation sont faibles pour le paramètre tA aussi bien continu que pulsé.

Les Figures 37 A et 37 B illustrent les résultats observés dans le cas de sang normal soumis à un cisaillement pulsé d'amplitude de 30 %, de fréquence 1 Hz, les délais entre chaque cisaillement ayant été fixés à 5, 10 et 15 secondes.

Tableau VI : Reproductibilité de la détermination de tA continu et tA pulsé

Vitesse de cisaillement (sec ⁻¹)	tA continu		tA pulsé	
	M±DS	C.V.%	M±DS	C.V.%
150	2,58±0,031	1,20	2,58±0,048	1,86
50	2,75±0,033	1,20	2,74±0,037	1,35
10	3,52±0,071	2,02	3,65±0,080	2,19

Les résultats montrent que les valeurs de tA continu et tA pulsé sont pratiquement identiques et ne varient pas lorsque les vitesses de cisaillement varient de façon croissante ou décroissante entre 25 et 150 sec⁻¹, quel que soit le délai entre chaque cisaillement (**Figure 37 A**).

En ce qui concerne les faibles vitesses de cisaillement (entre 10 et 50 sec⁻¹), on observe une diminution des valeurs de tA lorsque la vitesse de cisaillement augmente (**Figure 37B**). Cependant, pour une même valeur de la vitesse de cisaillement, les valeurs de tA continu et tA pulsé sont pratiquement identiques. Des différences minimales entre tA continu et tA pulsé sont uniquement observées pour les faibles valeurs de cisaillement (de 10 à 20 sec⁻¹) et lorsque l'intervalle entre deux cisaillements est de 15 secondes.

L'influence de la fréquence du cisaillement a été ensuite étudiée. Les résultats rassemblés sur la **Figure 38** montrent que la fréquence pour autant qu'elle varie entre 1 et 4 Hz n'entraîne aucune différence entre tA continu et tA pulsé, les valeurs restant identiques quel que soit le régime et la fréquence de pulsation et ceci pour la gamme de cisaillement 20-150 sec⁻¹.

En ce qui concerne les faibles vitesses de cisaillement, il semble que seule l'utilisation d'une fréquence de 1 Hz puisse entraîner des différences entre tA continu et tA pulsé.

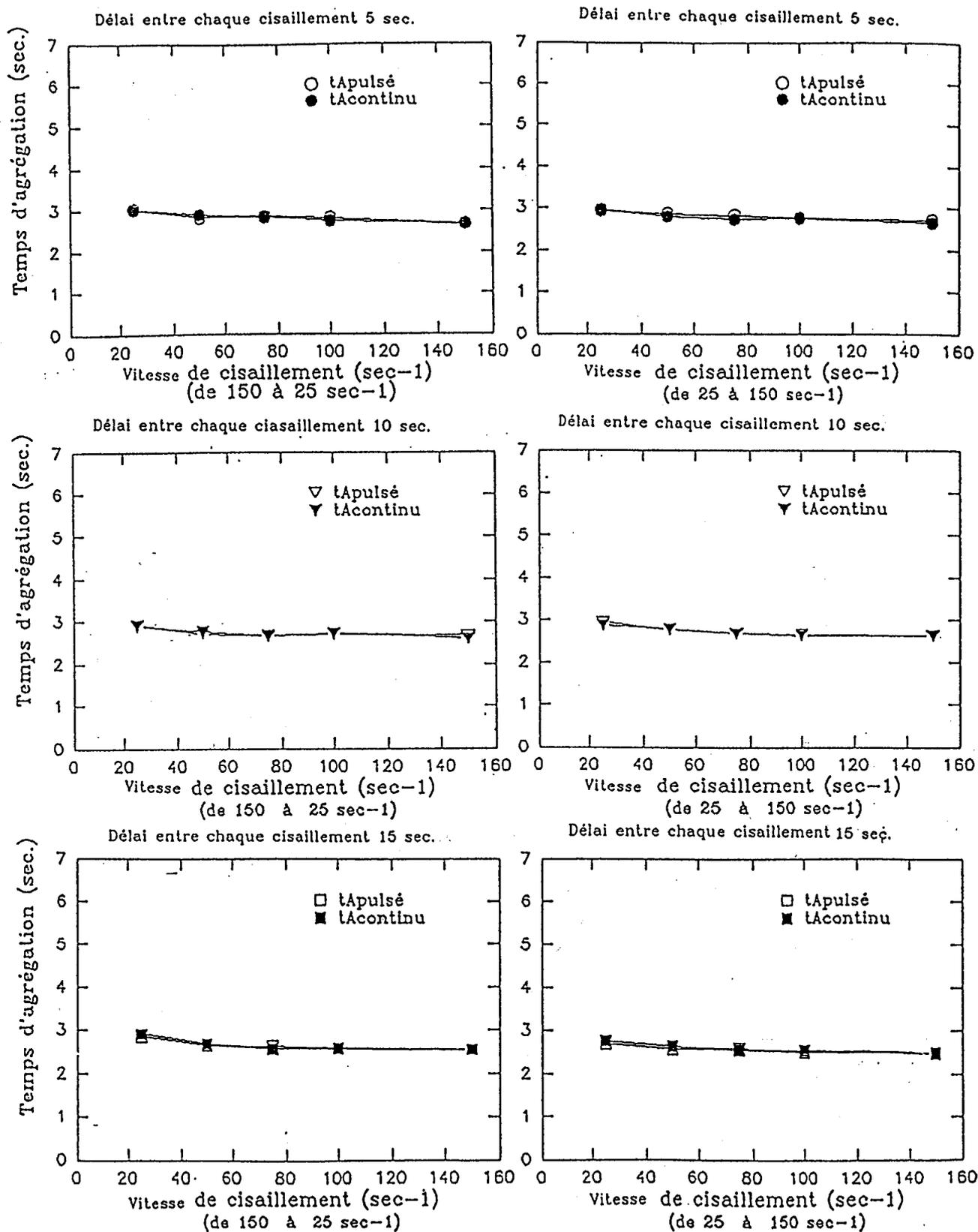


Figure 37 A : Comparaison entre tA continu et tA pulsé dans le sang normal à une amplitude de cisaillement de 30% aux vitesses de cisaillement de 150 sec^{-1} à 25 sec^{-1} (décroissantes ou croissantes). (Délai entre chaque cisaillement : 5sec., 10sec. ou 15sec. Délai entre les modes continu et pulsé : 20 sec. Fréquence : 1 Hz. $n = 2$).

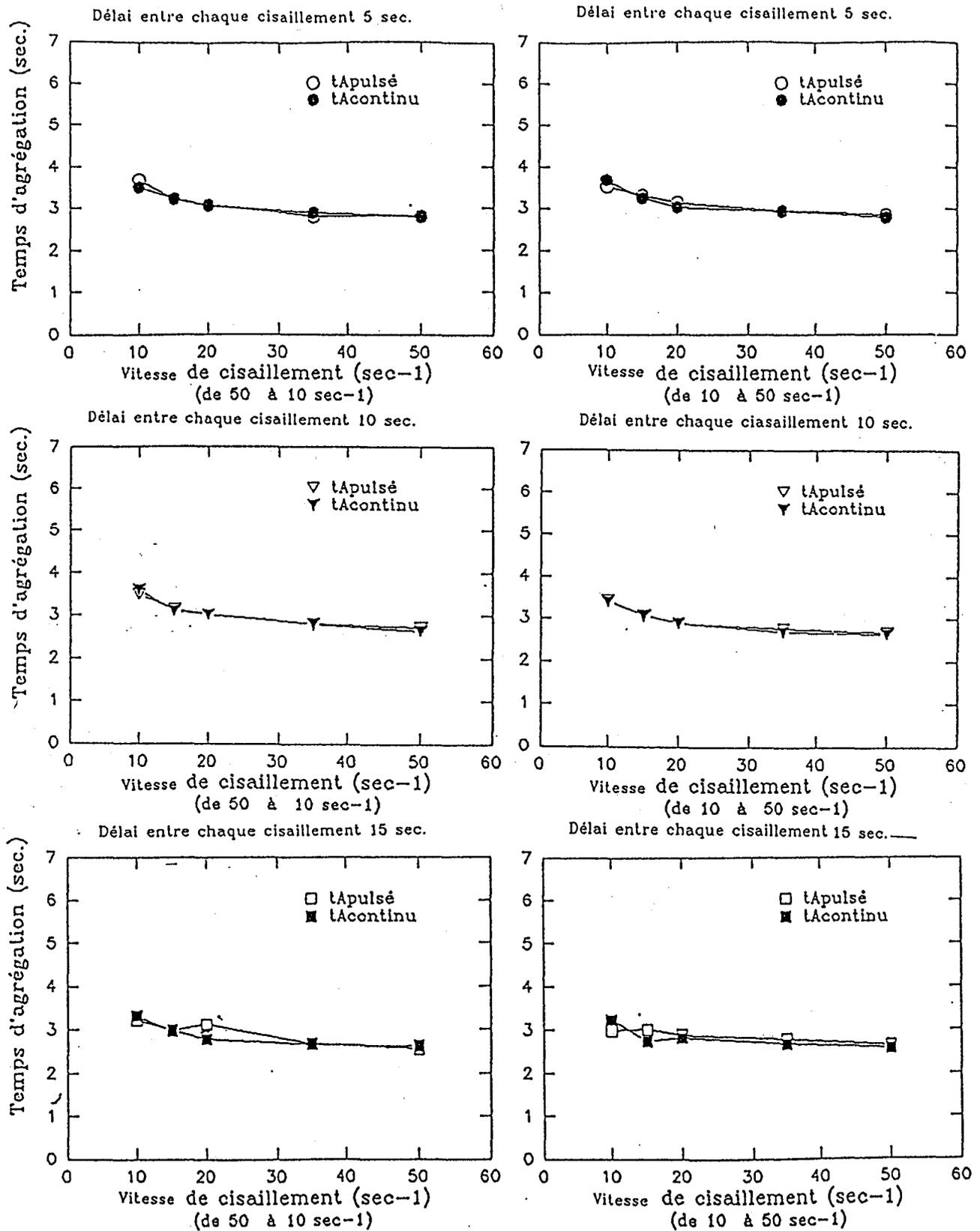


Figure 37 B : Comparaison entre tA continu et tA pulsé dans le sang normal à une amplitude de cisaillement de 30% aux vitesses de cisaillement de 50 sec^{-1} à 10 sec^{-1} (décroissantes ou croissantes). (Délai entre chaque cisaillement : 5sec., 10sec. ou 15sec. Délai entre les modes continu ou pulsé : 20 sec. Fréquence : 1 Hz. $n = 2$).

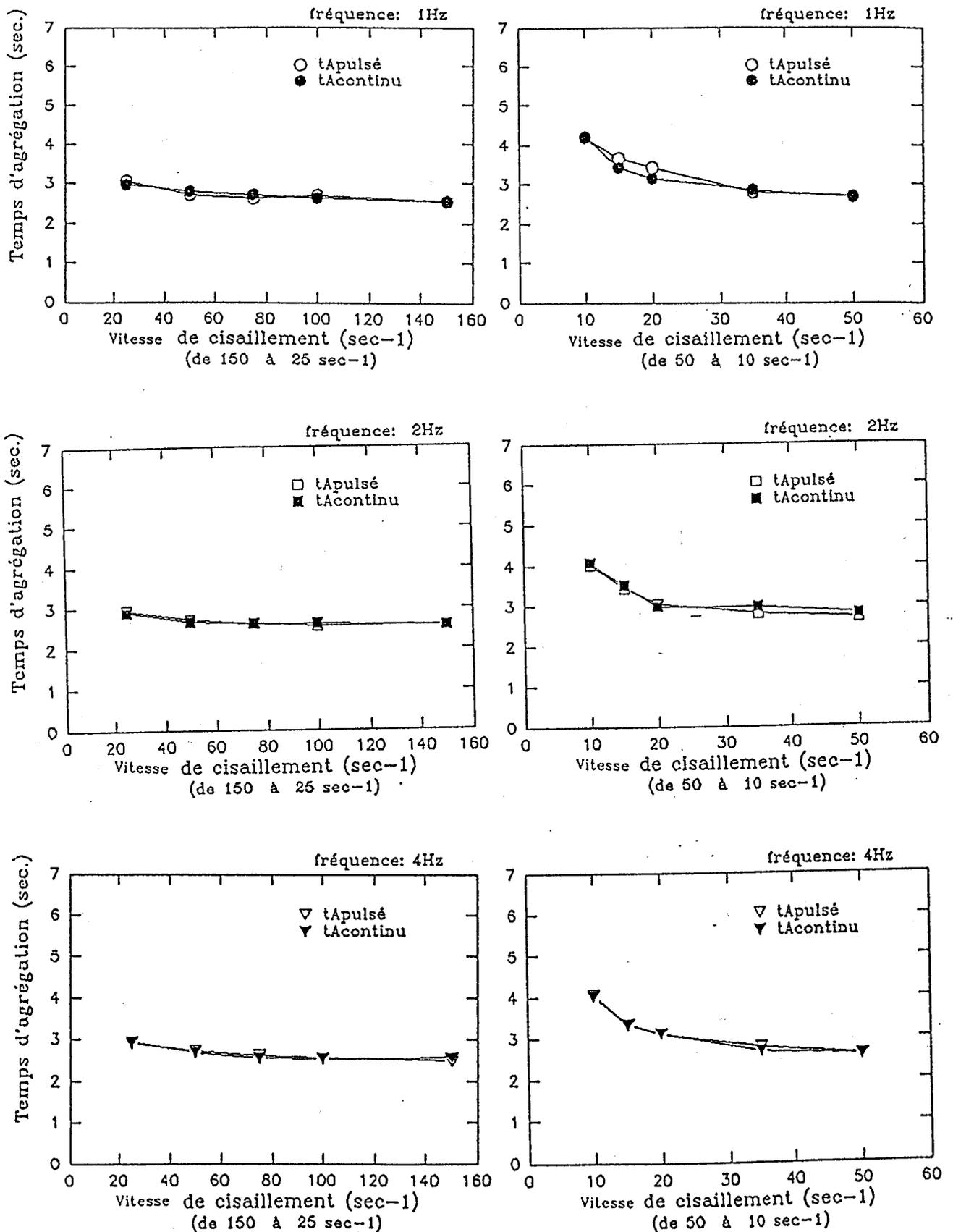


Figure 38 : Comparaison entre tA continu et tA pulsé dans le sang normal à une amplitude de cisaillement 30% avec les fréquences de 1 Hz, 2Hz ou 4 Hz. (vitesses de cisaillement de 150 sec^{-1} à 25 sec^{-1} ou de 50 sec^{-1} à 10 sec^{-1} dans le sens décroissants, 20 sec. de délai entre les modes continu ou pulsé, $n = 3$).

L'influence de la nature de la suspension sanguine a été ensuite recherchée (soit hyper ou hypoagréante). Dans le cas de ces expérimentations, un volume défini de plasma a été remplacé par le même volume d'albumine (5 g/l) [modèle hypoagréant], de fibrinogène (2,5g/l), ou d'IgG (12 g/l) [modèles hyperagréants]. Des sangs de diabétiques ont été également pris en compte dans les modèles hyperagréants. Les échantillons ainsi préparés sont incubés 5 minutes à 37°C dans un bain-marie, puis la détermination de la cinétique d'agrégation des hématies est effectuée.

Les résultats sont rassemblés sur les **Figures 39, 40, 41 et 42**.

Dans la majorité des expérimentations, les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec les hématies resuspendues dans du plasma autologue et considérées comme témoins.

Les déterminations ont permis de faire les observations suivantes :

Influence du fibrinogène (Figure 39) :

Le caractère hyperagréant du fibrinogène ne se manifeste par une diminution des valeurs de tA que pour les valeurs de vitesse de cisaillement les plus élevées. Il n'existe pas de différence entre tA continu et tA pulsé pour une même valeur de vitesse de cisaillement.

Influence des IgG (Figure 40) :

Le caractère hyperagréant des IgG se traduit par rapport au témoin par une diminution de tA continu et pulsé et ceci pour toutes les vitesses de cisaillement. Toutefois, pour un même type d'échantillon et une valeur identique de la vitesse de cisaillement, les valeurs de tA continu et tA pulsé sont pratiquement identiques.

Influence du statut pathologique (Figure 41) :

Le caractère hyperagrégant lié à un état pathologique (diabète) n'entraîne pas de différences entre tA continu et tA pulsé à l'exception des faibles vitesses de cisaillement où l'on observe de légères différences.

Influence de l'albumine (Figure 42) :

Le caractère hypoagrégant de l'albumine se traduit par une augmentation de tA continu et tA pulsé par rapport à un sang témoin.

La diminution de tA avec l'augmentation des vitesses de cisaillement est toujours observée pour les faibles vitesses de cisaillement.

De légères différences entre tA continu et tA pulsé sont enregistrées pour les faibles vitesses de cisaillement.

L'évolution de tA pulsé est la même, quel que soit la fréquence : 0,5 ou 1 Hz.

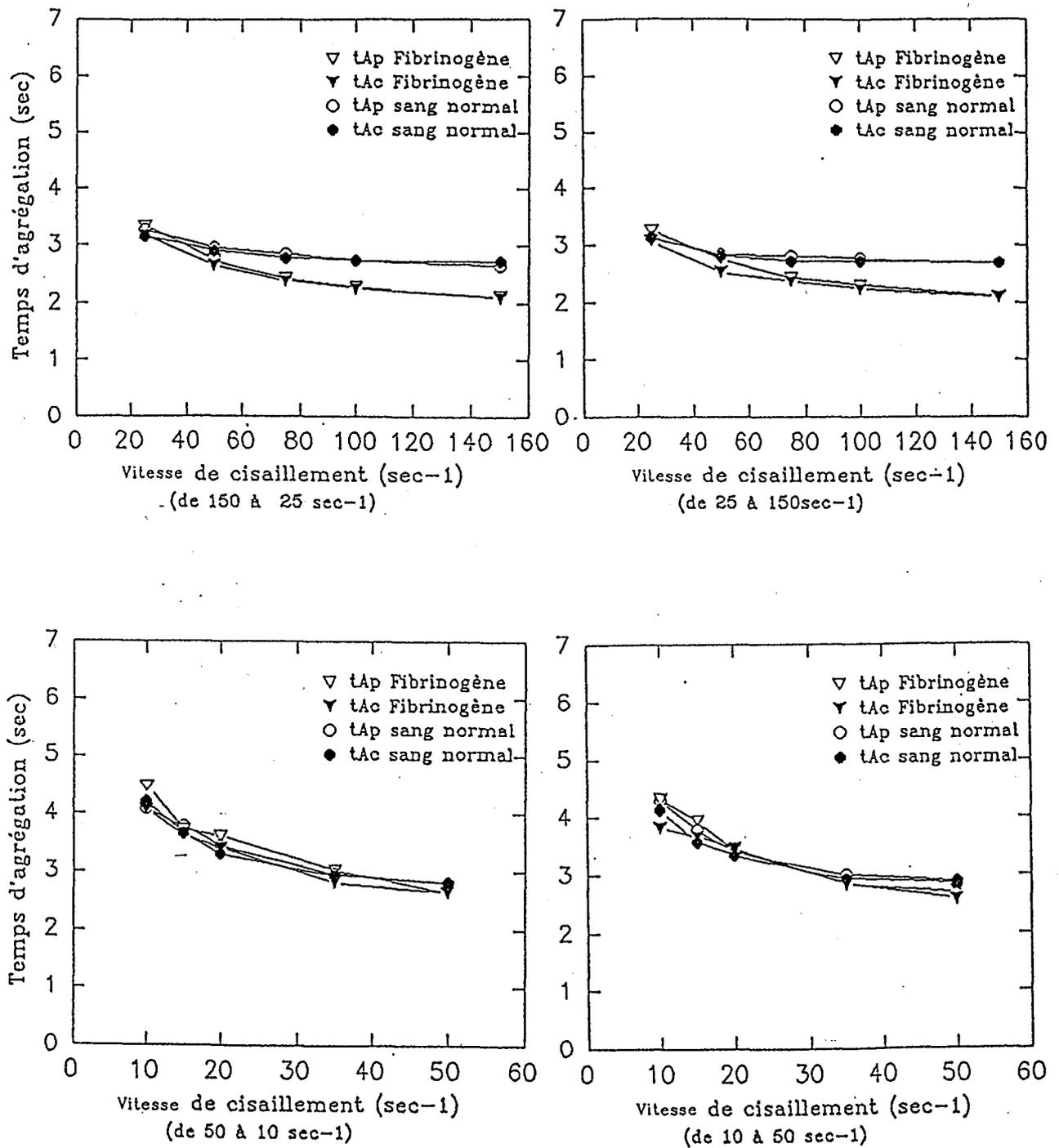


Figure 39 : Effet du fibrinogène (2,5 g/l) sur tA continu et tA pulsé à une amplitude de cisaillement 30% en comparaison avec le sang normal. (vitesses de cisaillement de 150 sec⁻¹ à 25 sec⁻¹ ou de 50 sec⁻¹ à 10 sec⁻¹ dans le sens décroissant ou croissant, délai entre les deux modes : 20sec., fréquence : 1 Hz, n = 5).

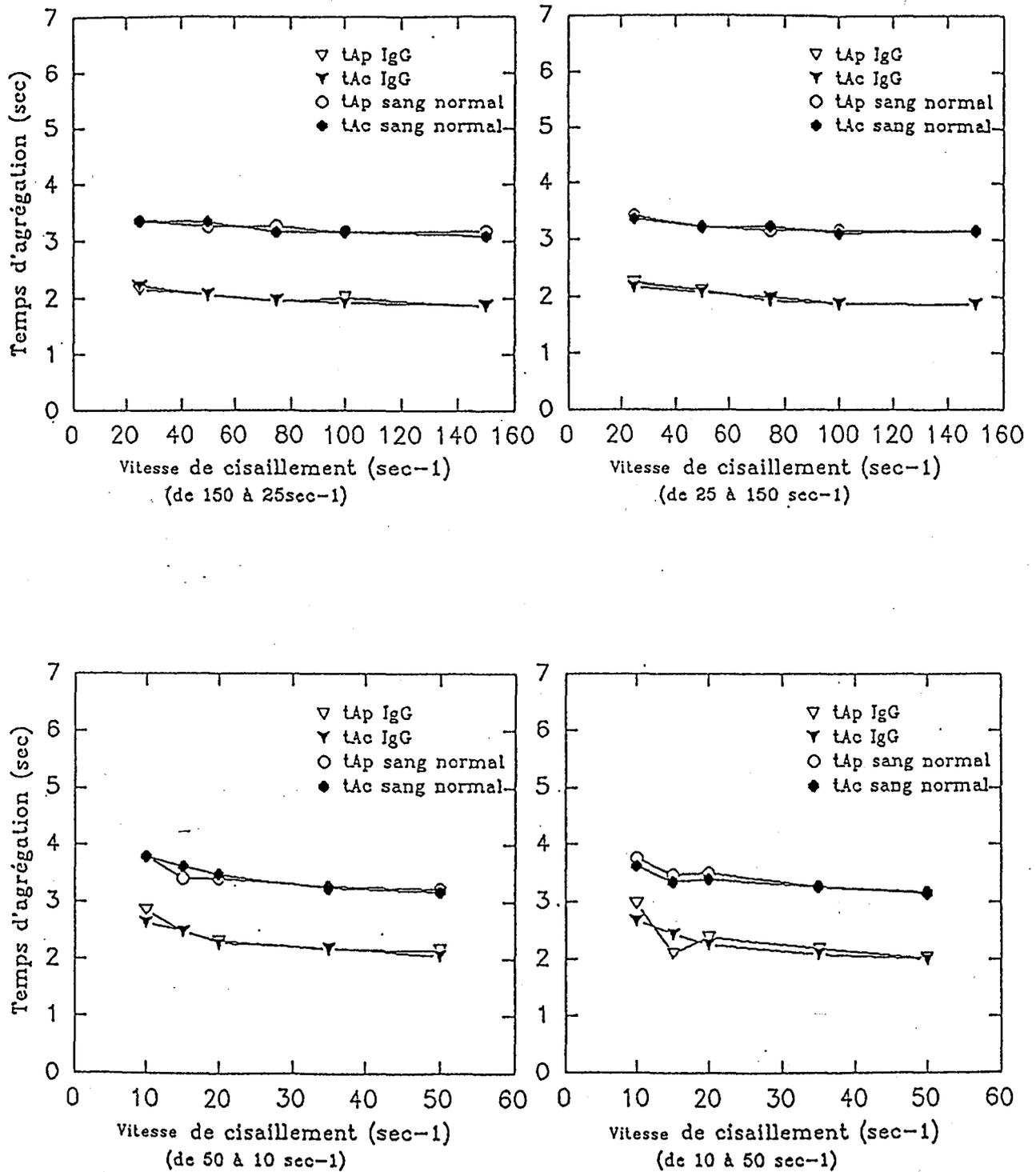


Figure 40 : Effet des IgG (12 g/l) sur tA continu et tA pulsé à une amplitude de cisaillement de 30% en comparaison avec le sang normal. (vitesses de cisaillement de 150 sec⁻¹ à 25 sec⁻¹ ou de 50 sec⁻¹ à 10 sec⁻¹ dans le sens décroissant ou croissant, délai entre les deux modes : 20sec., fréquence : 1 Hz, n = 1).

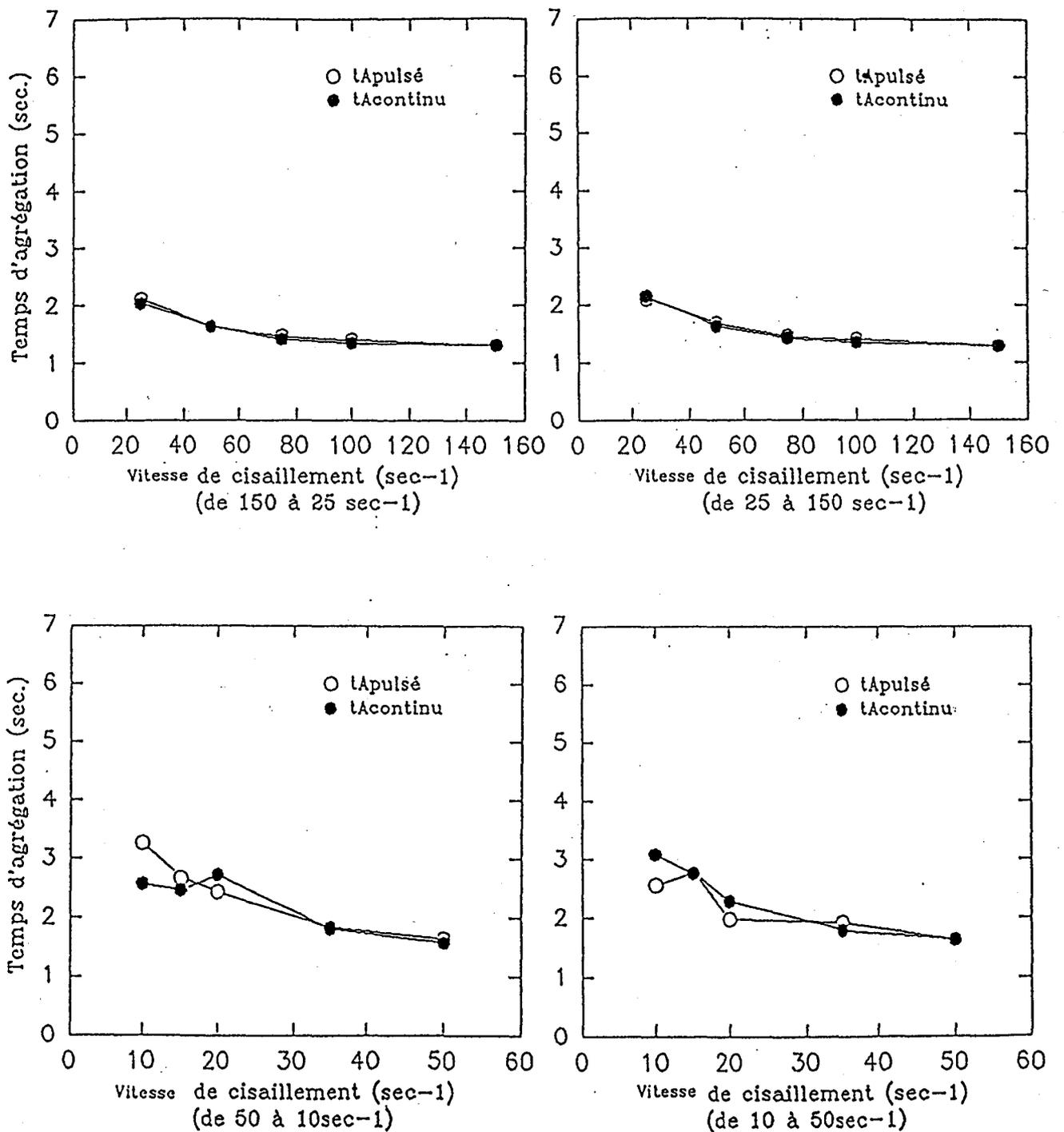


Figure 41 : Influence du régime d'écoulement pulsé à une amplitude de cisaillement de 30% sur t_A pulsé dans le cas d'un sang de diabétique. (vitesses de cisaillement de 150 sec⁻¹ à 25 sec⁻¹ ou de 50 sec⁻¹ à 10 sec⁻¹ dans le sens décroissant ou croissant, délai entre les modes continu et pulsé : 20sec., fréquence : 1 Hz, $n = 1$).

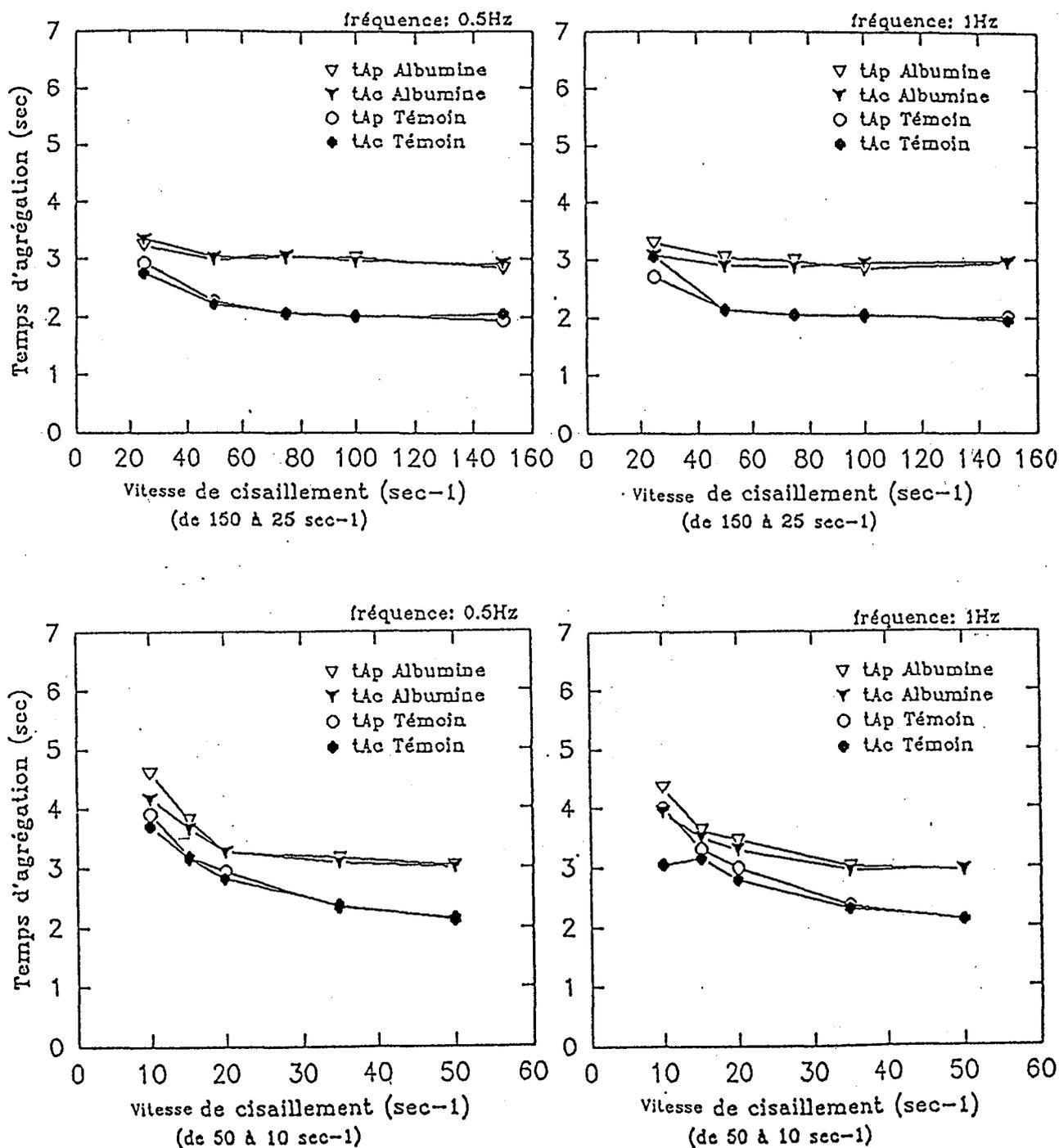


Figure 42 : Effet de la substitution partielle du plasma par de l'albumine (5 g/l) sur tA continu et tA pulsé à une amplitude de cisaillement de 30% en comparaison avec le sang normal. (vitesses de cisaillement de 150 sec⁻¹ à 25 sec⁻¹ ou de 50 sec⁻¹ à 10 sec⁻¹ dans le sens décroissant, fréquence : 0,5 Hz et 1 Hz, n = 1).

Ces résultats nous ont amené à envisager d'autres expérimentations dans des conditions différentes, concernant en particulier l'amplitude du régime pulsé, la gamme de vitesses de cisaillement et la fréquence de la pulsation.

III.2. Régime pulsé d'amplitude 75 %

III.2.1. Effet de l'amplitude du régime pulsé

Un comparaison a été faite entre deux amplitudes de pulsation : 30 et 75%. Trois fréquences de régime pulsé égales à 0,5 Hz, 1Hz et 2 Hz respectivement, ont été choisies. Les vitesses de cisaillement ont été fixées entre 20 sec^{-1} et 3 sec^{-1} .

La Figure 43 illustre les résultats observés dans ces conditions. On constate que l'utilisation de faibles vitesses de cisaillement entraîne effectivement des différences entre t_A continu et t_A pulsé.

Les différences sont plus importantes dans le cas d'un régime pulsé d'amplitude 75%.

La diminution de t_A pulsé et t_A continu est systématiquement observée lorsque la vitesse de cisaillement augmente.

La fréquence de la pulsation apparaît être un facteur important. t_A pulsé est supérieur à t_A continu pour une fréquence de pulsation de 0,5 Hz. En revanche, t_A pulsé est inférieur à t_A continu pour des fréquence de pulsation de 1 et 2 Hz.

Pour cette raison, nous avons développé une étude du rôle de la fréquence du régime pulsé.

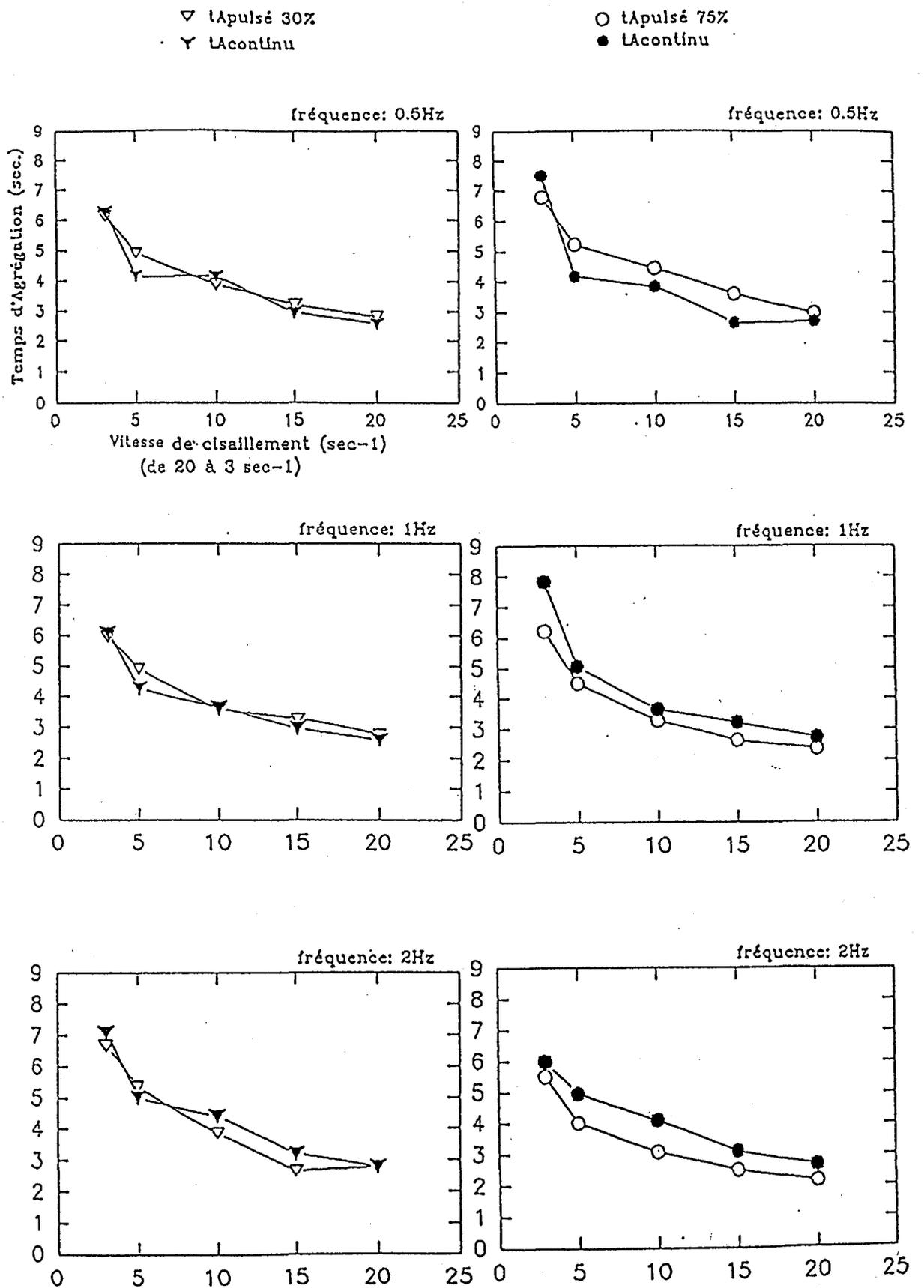


Figure 43 : Evolutions de tA continu et tA pulsé en fonction du cisaillement dans le cas d'un sang normal. En régime pulsé, l'amplitude de la pulsation est égale à 75% et les fréquences de pulsation ont été fixées à 0,5, 1 et 2 Hz.

III.2.2. Influence de la fréquence du régime pulsé

Les expériences ont été effectuées avec soit du sang normal, soit des échantillons de sang dont un volume de plasma a été substitué avec de l'albumine à la concentration de 5 g/l (modèle hypoagrégant), du fibrinogène (2,5 g/l) ou des IgG (12 g/l), qui sont considérés comme des modèles d'un statut d'hyperagrégation. Un sang pathologique (choc septique) a également été étudié.

Les résultats sont rassemblés sur les **Figures 44, 45, 46, 47, 48** pour un régime pulsé d'amplitude 75% et des fréquences variables comprises entre 0,5 et 3 Hz avec des intervalles de 0,5 Hz.

Les observations dans ces différentes conditions sont les suivantes :

Dans le sang normal (**Figure 44**), pour une fréquence de 0,5 Hz, tA pulsé est supérieur à tA continu. A une fréquence de 1Hz, on observe des irrégularités de la courbe tA pulsé = $f(\gamma)$ traduisant une tA pulsé inférieur à tA continu pour les vitesses de cisaillement inférieur à 20 sec^{-1} . Par contre, tA pulsé est supérieur ou égal à tA continu pour des vitesses de cisaillement supérieures à 20 sec^{-1} . A 1,5 et 2 Hz, tA pulsé est inférieur à tA continu. En revanche, pour une fréquence de pulsation de 2,5 et 3 Hz, les fluctuations de tA pulsé par rapport à tA continu sont minimales.

On retrouve la même situation dans le cas des modèles hyperagrégants (**Figures 45 et 46**) et du modèle hypoagrégant (**Figure 47**) comportant une supplémentation en albumine quoique moins accentué que dans les modèles de sang normal et hyperagrégants.

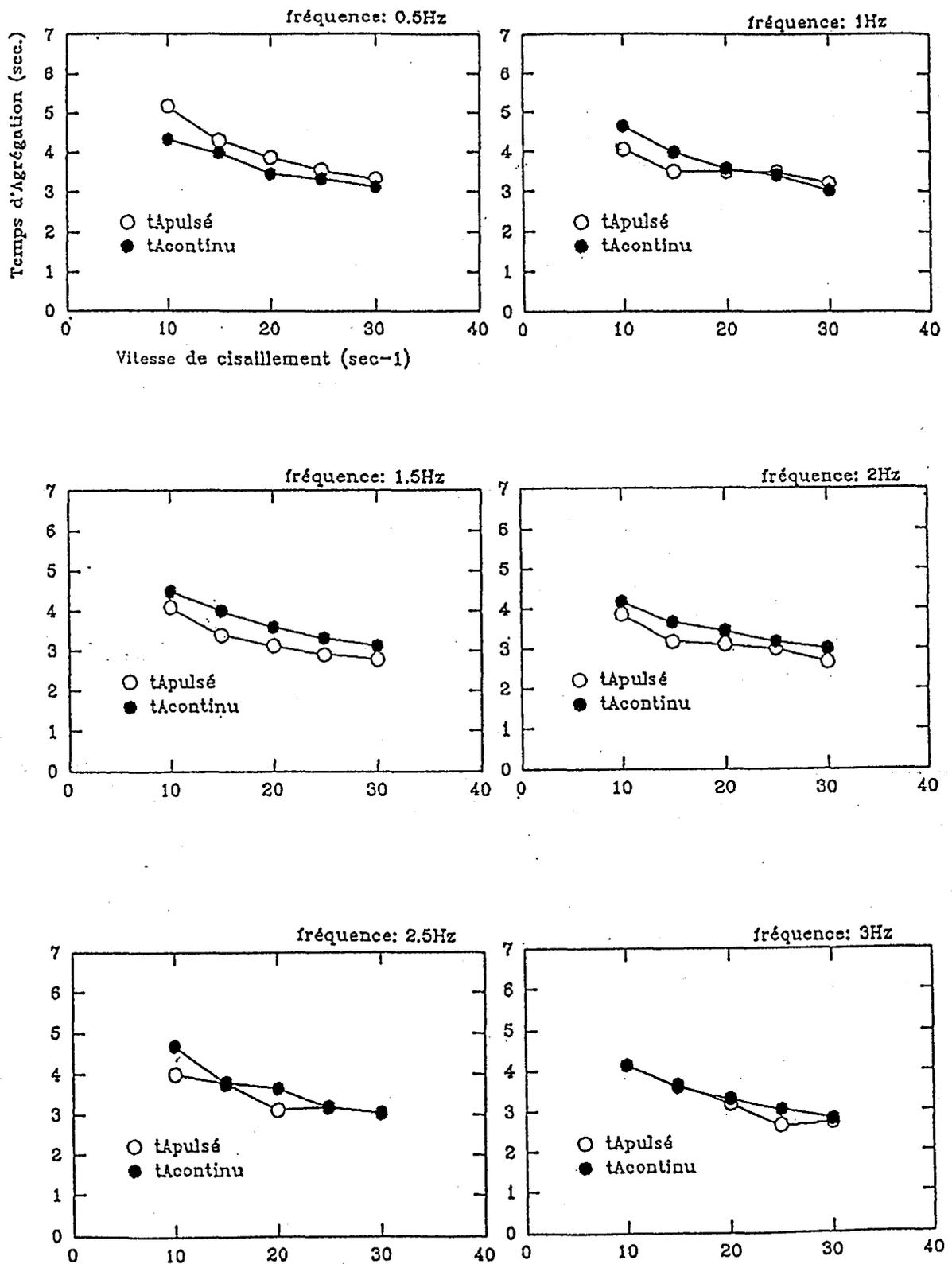


Figure 44 : Etude comparative de tA continu et tA pulsé en fonction de la vitesse de cisaillement avec une fréquence de pulsation variant entre 0,5 et 3 Hz et une amplitude de pulsation de 75% (sang normal).

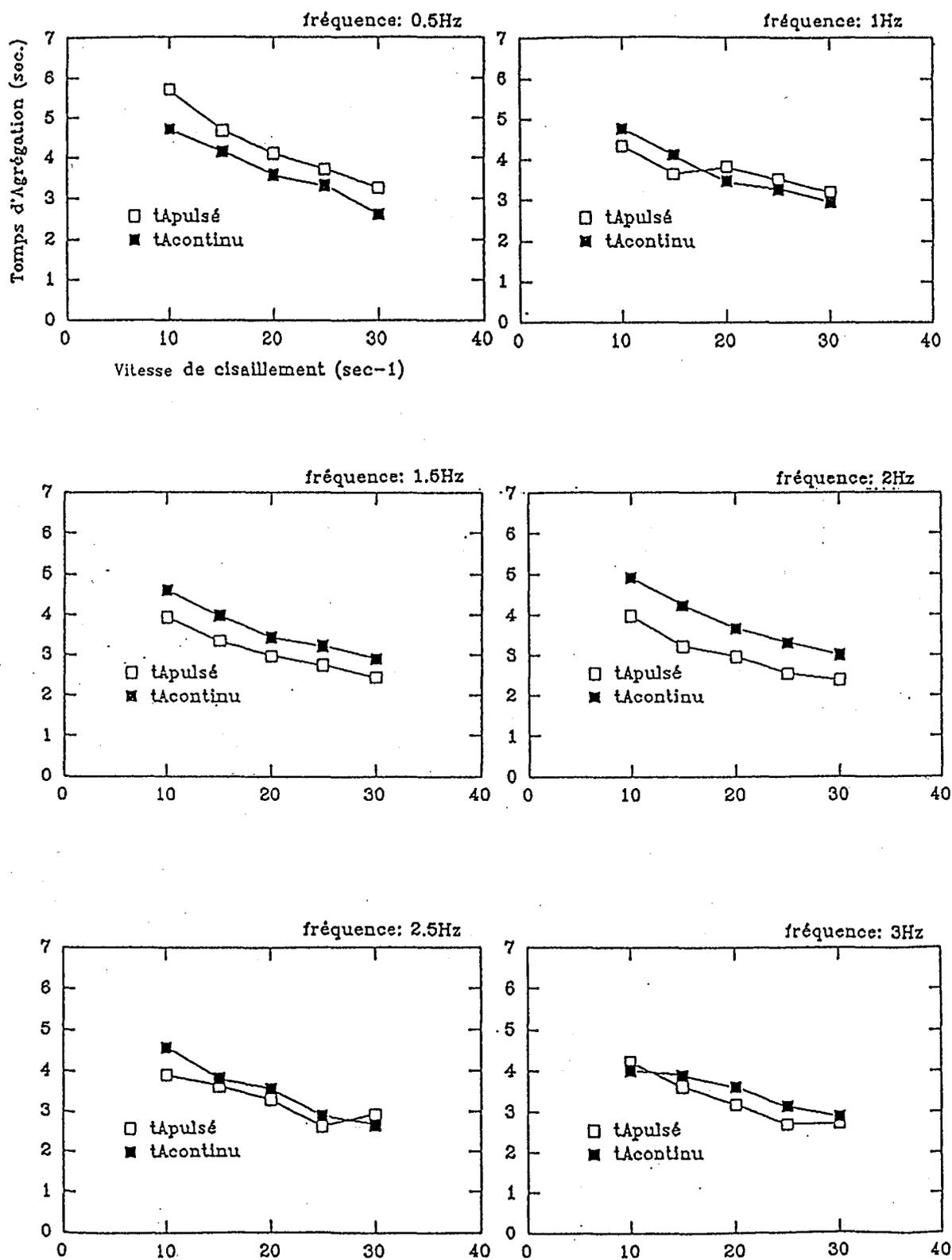


Figure 45 : Effet du fibrinogène (2,5 g/l) sur tA pulsé (amplitude de pulsation 75%, fréquence variant entre 0,5 et 3 Hz) et tA continu.

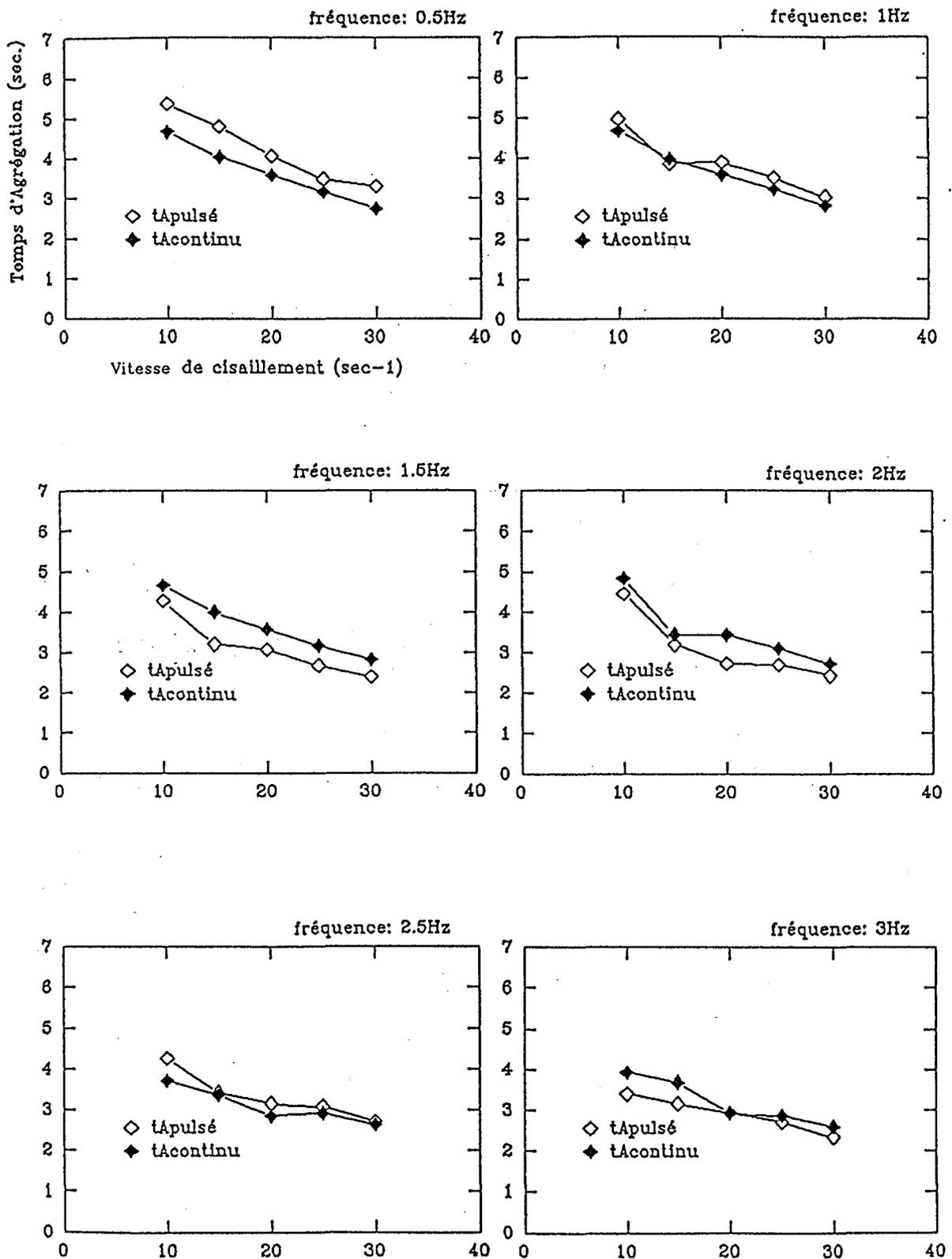


Figure 46 : Effet des IgG (12 g/l) sur tA pulsé (amplitude de pulsation : 75%, fréquence variant entre 0,5 et 3 Hz) et tA continu.

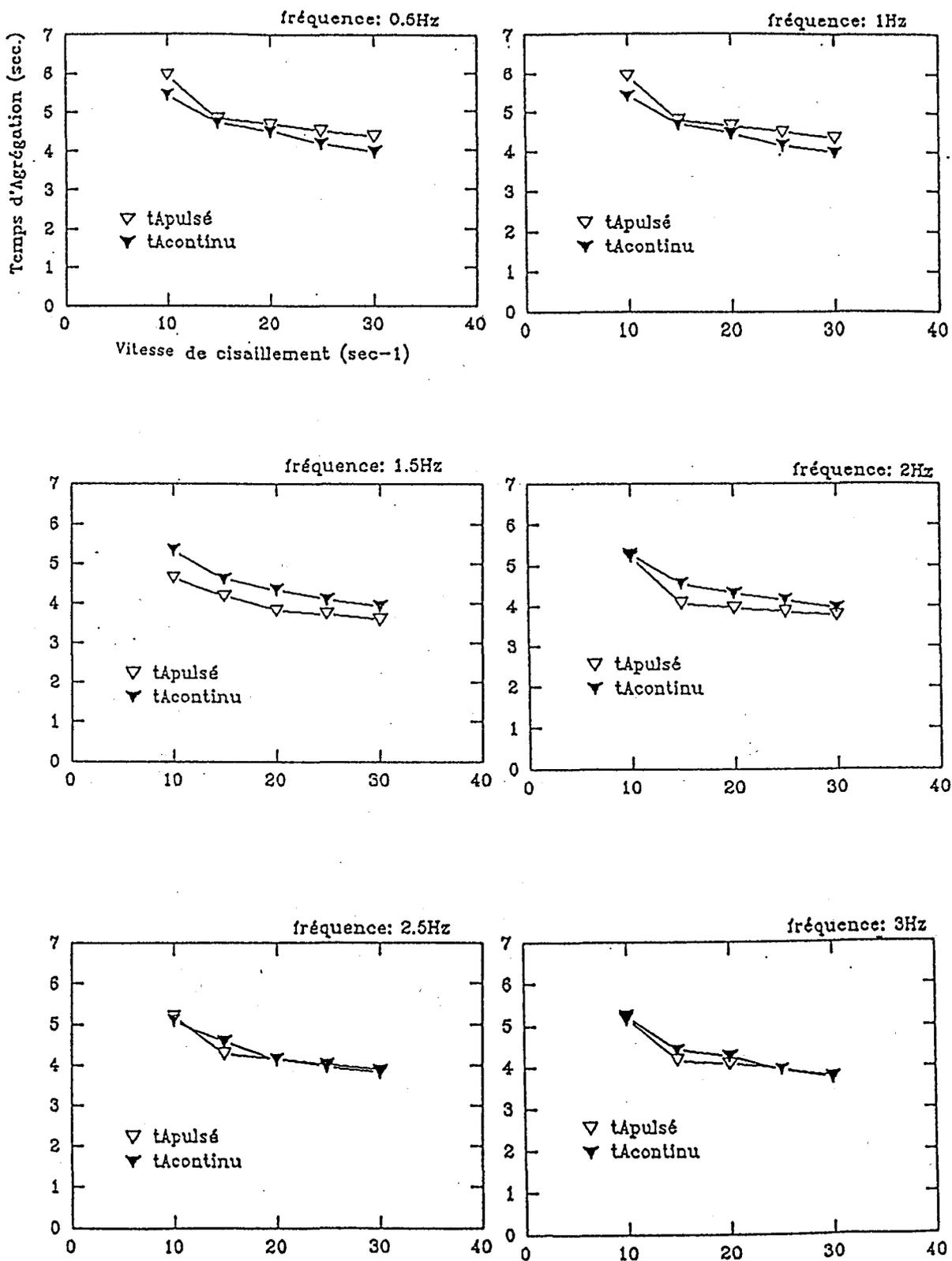


Figure 47 : Effet de l'albumine (5 g/l) sur tA pulsé (amplitude de pulsation : 75%, fréquence variant entre 0,5 et 3 Hz) et tA continu.

La situation est globalement identique dans le cas de l'échantillon sanguin provenant d'un patient atteint d'un choc septique (Figure 48). Toutefois, il faut noter dans ce cas des fluctuations irrégulières de tA pulsé à la fréquence de 1 Hz et des valeurs de tA pulsé systématiquement inférieures à tA continu pour des fréquences de 2,5 et 3 Hz.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

On sait que le sang s'écoule dans les artères du coeur vers la périphérie pendant la systole et la partie terminale de la diastole. A l'état physiologique, le coeur bat à une fréquence variant entre 0,8 et 1,2 Hz et l'écoulement du sang dans les artères est pulsé. Pendant la période de systole cardiaque, à l'ouverture des valvules sigmoïdes, l'aorte ascendante reçoit un volume éjecté de l'ordre de 80 ml, sous une pression croissant de 80 à 150 mmHg. A la fin de la systole, quand se ferment les valvules, un tiers du volume admis dans l'artère a atteint l'aorte thoracique, soit 26 ml. Pendant la systole, un volume de 54 ml ne s'écoule pas puisqu'il s'accumule dans l'artère, du fait de l'élasticité de la paroi. Le "retour élastique" pariétal intervient pendant la diastole pour se composer avec la force cardiaque et déterminer l'écoulement du fluide. Au début de la systole, il a été montré chez le chien que la vitesse résiduelle du sang varie entre 100 cm/sec. et 165 cm/sec. au niveau de l'aorte ascendante (122). Par conséquent, le flux systolique a une pression et une vitesse plus grande, le flux diastolique un volume plus élevé. Le jeu des valvules sigmoïdes dans un système de tuyaux souples donne à l'écoulement sanguin dans les artères un mode pulsé. Ces pulsations évidentes dans les artères larges, peuvent être retrouvées jusque dans les petites artères (122). Bien que les réseaux capillaires soient situés loin du coeur, l'écoulement capillaire est aussi pulsé (26).

Du fait des propriétés rhéologiques très complexes du sang, de nombreux travaux ont étudié l'effet de l'écoulement pulsé dans les artères. FUKUSHIMA et coll. (78) ont étudié in vitro le flux pulsé dans un modèle en verre simulant l'anévrisme d'aorte abdominale à l'aide

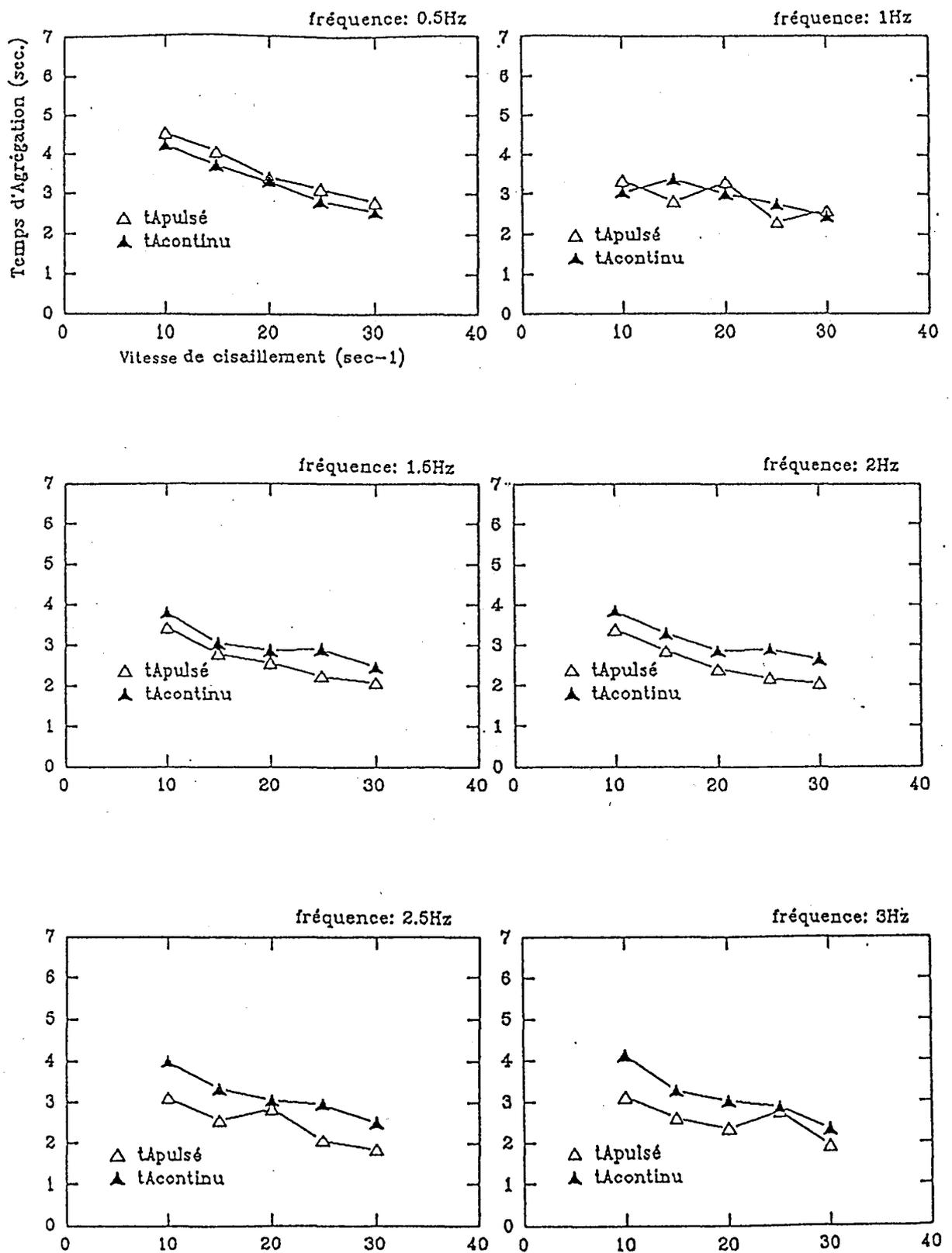


Figure 48 : Comparaison entre tA pulsé (amplitude de la pulsation : 75%, fréquence variant entre 0,5 et 3 Hz) et tA continu dans le cas d'un choc septique.

d'une méthode de visualisation du flux. Le flux pulsé est obtenu par le moyen d'une pompe pulsée qui permet de faire varier la vitesse du flux en fonction du temps. L'étude du profil de vitesse du flux donne une valeur maximale de 76 ml/sec. et minimale de 8 ml/sec. Ils ont démontré que le mode pulsé conduit à un changement complet du caractère de l'écoulement par rapport au flux stable. Les tourbillons et les turbulences sont formés dans le modèle d'anévrisme. Une réduction de l'amplitude de la pulsation induit un type d'écoulement similaire à celui d'un flux continu.

Des analyses théoriques de l'écoulement pulsé en simulant des conditions variées (tube rétréci, accélération des mouvements du corps humain, anévrisme...) ont également été publiées (29, 30, 129)

Récemment, CLOUTIER et coll. ont utilisé un modèle de régime pulsé en circuit fermé avec du sang du porc pour détecter et caractériser le comportement hémodynamique des rouleaux et agrégats d'hématies en utilisant les ultrasons (48). Ils ont observé que pour des pulsations de 70 battements/min. et pour des vitesses moyennes de 13 cm/sec. et 63 cm/sec., il n'y a pas de variation cyclique de la puissance Doppler, suggérant l'absence de formation et de dissociation de rouleaux d'hématies. Par contre, à une pulsation de 20 battement/min. et des vitesses moyennes de 11 cm/sec. et 38 cm/sec., des variations cycliques significatives ($p < 0,01$) de la puissance Doppler ont été observées. Elles traduisent la formation de rouleaux d'hématies et montrent effectivement l'influence de la fréquence de la pulsation et de la vitesse du flux sur l'apparition du phénomène d'agrégation.

Le programme informatique utilisé dans notre étude a été associé au système instrumental basé sur l'analyse des variations de la lumière rétrodiffusée par une suspension sanguine après l'arrêt brusque d'un cisaillement qui peut être soit continu, soit pulsé. Dans le cas d'un cisaillement élevé, l'arrêt de ce cisaillement se traduit par une augmentation de

l'intensité du flux rétrodiffusé correspondant à la désorientation des hématies dans le flux. Ensuite, on observe une diminution de l'intensité de la lumière rétrodiffusée correspondant à la formation de rouleaux et agrégats d'hématies. Le temps primaire d'agrégation, t_A , est un paramètre qui caractérise la vitesse de formation des rouleaux et qui représente l'inverse de la pente de la courbe $r = f(t)$ entre 0,3 et 1,9 secondes. La détermination du paramètre t_A pulsé a été effectuée au niveau du programme informatique sur le même principe. Toutefois, les conditions dans lesquelles les paramètres t_A continu et t_A pulsé ont été déterminés dans notre étude et les cas où des différences ont été objectivées nécessitent un certain nombre de commentaires.

Aux vitesses de cisaillement les plus faibles (entre 10 et 30 sec^{-1}), on observe une augmentation des valeurs de t_A lorsque la vitesse de cisaillement diminue. Ce phénomène est probablement lié au fait qu'à ces vitesses de cisaillement très faibles, les hématies sous cisaillement ne sont pas complètement dissociées. Après l'arrêt du cisaillement, l'allure de la courbe représentant la variation de l'intensité de la lumière rétrodiffusée va en fait refléter deux composantes : la prise en compte de l'existence de rouleaux et agrégats non dissociés du fait du cisaillement insuffisant et la cinétique de la formation de rouleaux à partir d'hématies isolées résiduelles. L'augmentation de t_A aux faibles vitesses de cisaillement traduit uniquement une analyse de la courbe $r = f(t)$ dans une section où la pente est plus faible.

Dans ces conditions, il serait logique d'interpréter des différences entre t_A continu et t_A pulsé de la manière suivante. Si un cisaillement pulsé favorise la désagrégation, après l'arrêt du cisaillement, le temps d'agrégation t_A pulsé doit être relativement plus court par rapport au t_A continu aux mêmes vitesses de cisaillement. Par contre, si le régime pulsé a tendance à augmenter l'agrégation, le t_A déterminé sera plus élevé par rapport au t_A enregistré en régime continu.

Au vu des résultats de notre étude, il apparaît qu'une amplitude de pulsation de 30% n'influence pratiquement pas le phénomène d'agrégation des hématies. Par contre, quand l'amplitude de la pulsation est de 75% et pour les cisaillement les plus faibles, les courbes reflétant l'évolution de tA continu et tA pulsé sont distinctes. En fait, les résultats suggèrent qu'un écoulement pulsé peut soit augmenter, soit inhiber l'agrégation des hématies. Ce phénomène n'existe dans nos expérimentations que pour des vitesses de cisaillement faibles ($< 30 \text{ sec}^{-1}$). La fréquence du régime pulsé apparaît avoir une grande importance. Un régime pulsé de fréquence 0,5 Hz aurait tendance à favoriser l'agrégation. Par contre, un régime pulsé de fréquences 1,5 Hz et 2 Hz inhiberait la formation des rouleaux et des agrégats d'hématies.

La fréquence de 1 Hz correspondrait dans certains cas à un régime transitoire où pour des vitesses de cisaillement inférieures à 20 sec^{-1} , le régime pulsé inhiberait l'agrégation par rapport au régime continu. Pour des cisaillement supérieurs à 20 sec^{-1} , le régime pulsé favoriserait l'agrégation. Ces observations concernant l'influence du cisaillement sont en accord avec l'étude de RIHA et coll. (179), tout en ne se plaçant pas dans la même gamme de vitesse de cisaillement. Toutefois, l'influence de la fréquence de la pulsation que nous avons mis en évidence n'a pas été trouvée dans la précédente étude.

Les résultats de la présente étude ne permettent pas pour l'instant d'extrapoler aux situations *in vivo*.

Il serait nécessaire de prendre en compte la déformabilité des hématies qui a fait l'objet d'un certain nombre de travaux (114, 178, 190).

Toutefois, on peut admettre qu'aux fréquences physiologiques (de 0,8 à 1,2 Hz), le régime de l'écoulement pulsé peut diminuer l'agrégation des hématies pour compenser les faibles vitesses de cisaillement qui favorisent l'agrégation des hématies. Dans des cas

pathologiques, la fréquence de la pulsation baisse et favorise la formation des rouleaux des hématies. Par ailleurs, nous pouvons imaginer aussi que dans les larges artères, les rouleaux et les agrégats sont plus faciles à dissocier par la plus forte amplitude de la pulsation par rapport aux petites artéριοles où les amplitudes de la pulsation sont diminuées.

Par conséquent, l'étude de l'effet d'un écoulement pulsé sur l'agrégation des hématies peut apporter des informations supplémentaires et donc une meilleure compréhension du mécanisme hémodynamique de l'agrégation érythrocytaire. Toutefois, il serait indispensable de modéliser les courbes d'agrégation obtenues avec le système expérimental utilisé.

II - 2

QUANTIFICATION DE L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE PAR ANALYSE D'IMAGES

I. INTRODUCTION

L'analyse par rétrodiffusion laser ne donne pas d'information directe sur la morphologie des rouleaux et agrégats d'hématies. A l'heure actuelle, cet aspect du phénomène d'agrégation ne peut être approché que par un examen microscopique dont il est indispensable de quantifier les résultats. La possibilité de traitement des images par un système informatique offre l'opportunité de répondre à cette question.

Les buts de ce travail ont été : (1) l'adaptation et la validation d'un logiciel pour l'évaluation de l'agrégation des hématies; (2) la recherche de conditions de reproductibilité de ce traitement d'image; (3) la signification du paramètre donné par l'analyse d'images par rapport aux paramètres de la rétrodiffusion laser.

II. SYSTEME MICROSCOPIQUE ET ANALYSE D'IMAGES

Le système utilisé est composé essentiellement de deux parties :

- un rhéoscope monté sur un microscope inversé
- un équipement informatique comportant un logiciel de traitement d'image

II.1. Rhéoscope et microscope

Le rhéoscope et le microscope équipés d'un dispositif vidéo permettent d'effectuer les prises d'images.

Le rhéoscope qui est un système viscosimétrique cône-plan est monté sur un microscope inversé (LEITZ-DIAVERT) muni d'une caméra vidéo (CCTV Camera model HV-17T, Hitachi) qui est reliée à un écran vidéo (model VM-173, Hitachi). Cet ensemble permet l'observation directe de l'évolution de la formation des rouleaux sur l'écran vidéo (Figure 49).

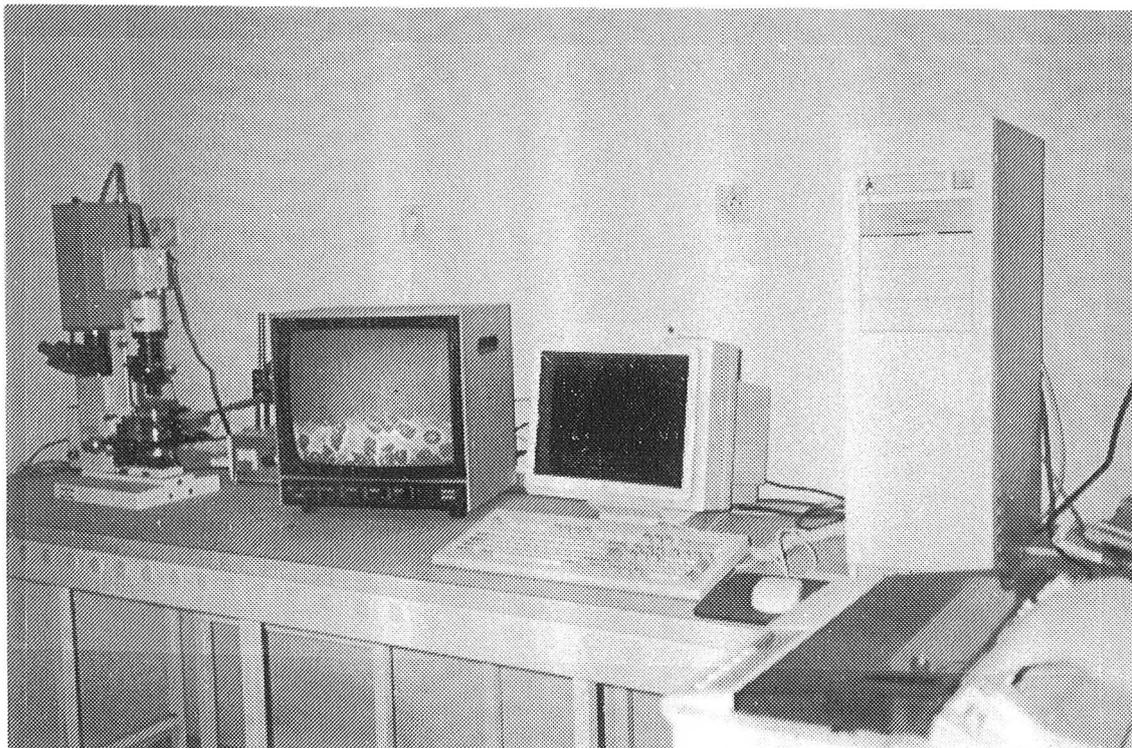


Figure 49 : Système d'analyse d'images.

La pièce centrale du rhéoscope est une chambre de mesure transparente formée d'un cône et d'un plan (lamelle de microscope) tournant en sens inverse et représentée schématiquement sur la **Figure 50** (187).

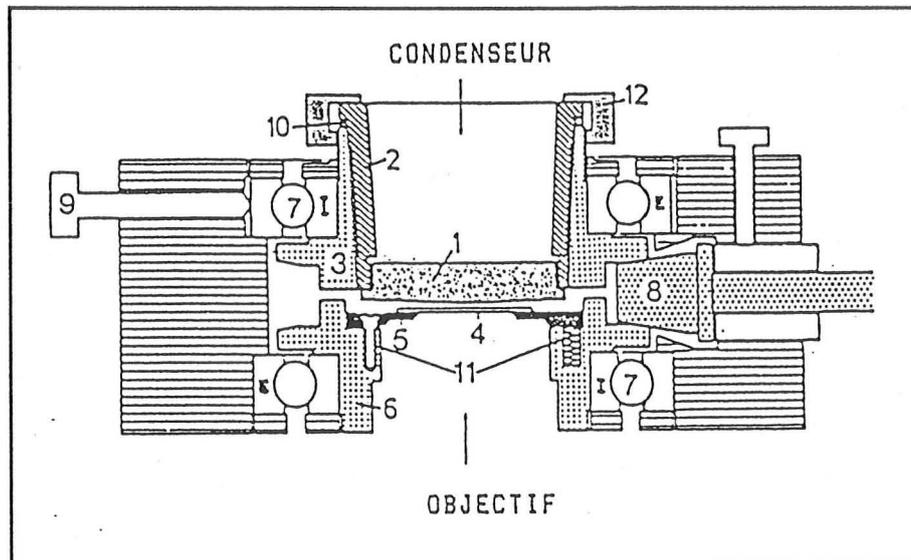


Figure 50 : Coupe schématique de la chambre rhéoscope. (d'après SCHMID-SCHONBEIN H. et coll. 1973) (187).

Les deux parties opposées "3, 6" tournent chacune à l'aide de roulement à billes "7". Elles sont entraînées en sens inverse par les cônes en caoutchouc "8" composant un cône d'entraînement et deux cônes de transmission espacés chacun de 120°. Le cône d'entraînement est relié à un moteur qui possède une régulation électronique de vitesse allant de 0 à 3000 tours/mn.

Aux vitesses modérées, le mouvement du fluide est laminaire. Le cône et le plan tournant en sens inverse à la même vitesse, il s'établit sur une zone médiane une couche stationnaire où les hématies, tout en subissant la contrainte de cisaillement, ne se déplacent pratiquement pas, permettant ainsi une bonne observation microscopique.

Aux grandes vitesses, en fonction de la viscosité de la solution et de l'angle α du cône, il se crée des mouvements secondaires dont le plus élémentaire est représenté à la **Figure 51**.

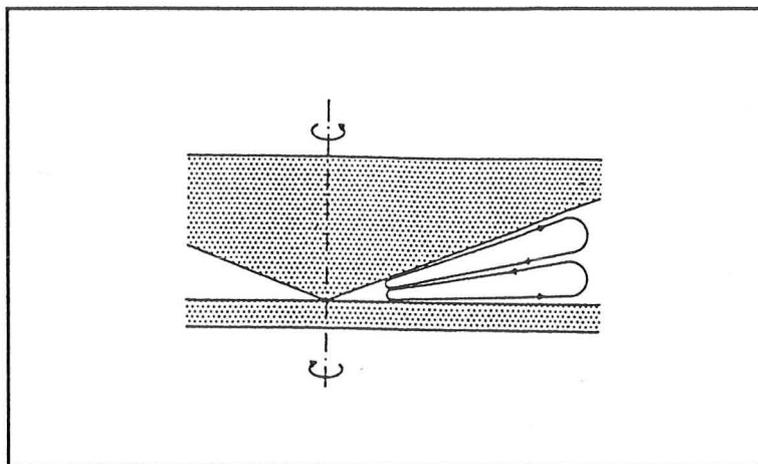


Figure 51 : Schéma des mouvements secondaires créés dans le cône-plan du rhéoscope aux grandes vitesses de cisaillement (d'après HEUSER G. 1977) (93).

200 μ l d'échantillon sanguin sont placés dans la chambre et soumis une vitesse de cisaillement suffisante pour dissocier complètement les rouleaux. Au temps zéro, la rotation du cône est stoppée. Les hématies commencent à s'agréger et le processus de la formation des rouleaux est suivi sur un moniteur vidéo.

Les mesures quantitatives étant effectuées à partir de l'écran vidéo avec des images bidimensionnelles d'un phénomène tridimensionnel, il est nécessaire d'observer dans une région proche de la pointe du cône où la couche sanguine est très fine mais suffisante pour permettre le phénomène d'agrégation des hématies.

II.2. Le logiciel JAVA

Le logiciel JAVA (Jandel Video Analyse System) est un logiciel de Jandel Scientific (65 Koch Road, Corte Madera, CA 94925, USA). Le logiciel JAVA V 1.40 est installé sur

un ordinateur CompuAdd 486/SX muni d'une carte PCVISIONplus Frame Grabber (model PFGPLUS 640-3-60, display (640 x 480). C'est grâce à celle-ci que le signal analogique émis par la source vidéo (la caméra) est transformé en un signal numérique contenant les données de l'image sous forme de pixels (picture elements). La PCVISIONplus digitalise le signal vidéo sur 8 bits (d'où une gamme de 256 niveaux de gris) à la vitesse de 30 images par seconde.

Voici le schéma du système général mis en place pour cette étude (Figure 52) :

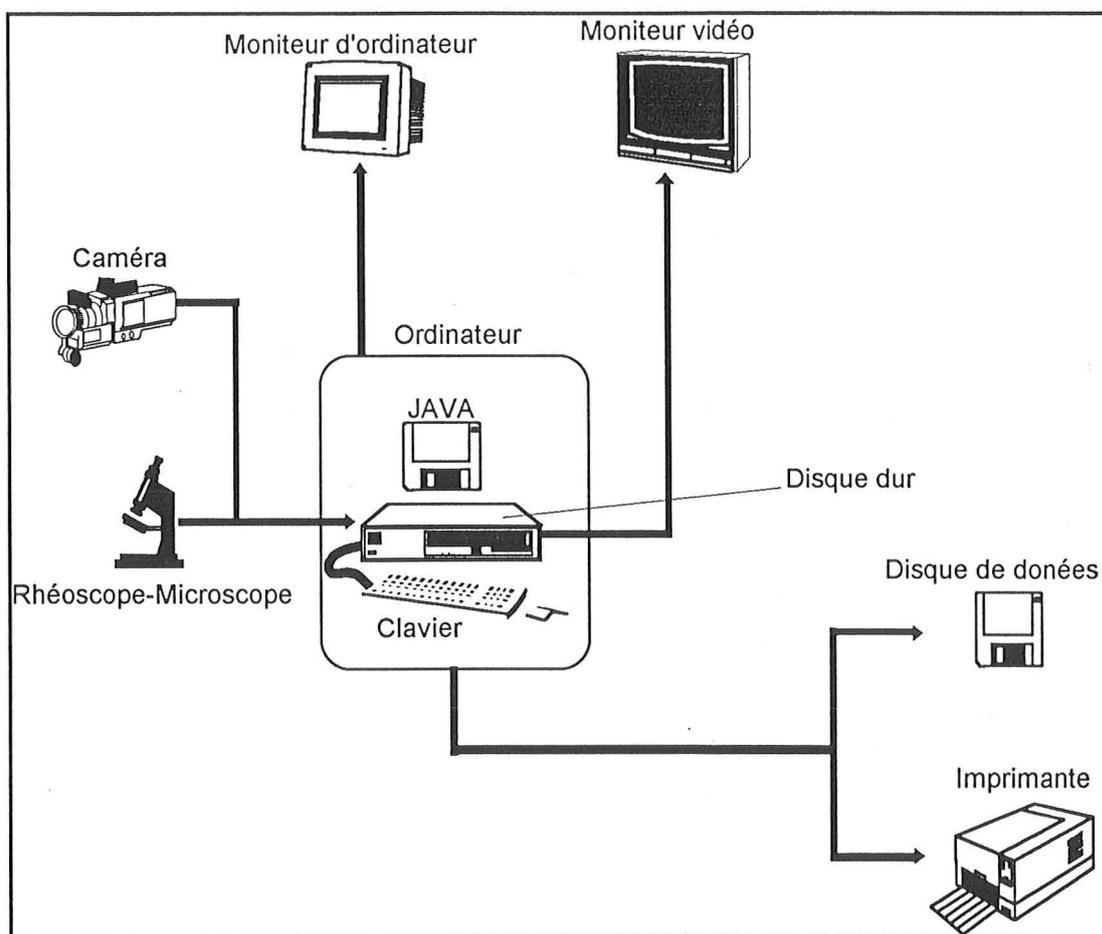


Figure 52 : Schéma général du système d'analyse d'images.

Le logiciel JAVA se décompose en six menus principaux et un tableau (Figure 53) :

- **Morph Menu** : Menu morphométrique (morphometrics menu). C'est le menu de départ lors d'une nouvelle session de JAVA. Il permet des mesures morphométriques sur les images et l'accès aux autres menus;
- **Intensity Menu** : Menu intensité. Il contient les options nécessaires aux mesures d'intensité;
- **Chart Menu** : Menu graphique. Il permet de tracer des contours d'objets, de mesurer les coordonnées X,Y d'un point sur une image;
- **Obj N Menu** : Menu nombre d'objets (objet count menu). Il contient les options permettant le comptage des objets;
- **IP Menu** : Menu traitement d'image (image processing). Il permet de modifier l'image pour améliorer la visibilité et faciliter les mesures.
- **Data Menu** : Tableau de données (data worksheet). Dans ce tableau, peuvent être enregistrées et disposées les données désirées;
- **Disk Menu** : Menu disque. Sur ce menu sont listées les opérations de sauvegarde et de récupération des fichiers (ie image, tableaux, macros, calibrages, transformations).

Le logiciel JAVA permet d'un grand nombre d'opérations. Ainsi, il est possible de mesurer automatiquement des intensités, de compter les objets, de mesurer des formes complexes, d'effectuer des mesures morphométriques et d'analyser toutes les données.

(1) Prise d'une image unique

Après avoir fait tous les réglages nécessaires au niveau du rhéoscope, l'option Freeze permet de saisir une image à l'instant déterminé par le manipulateur.

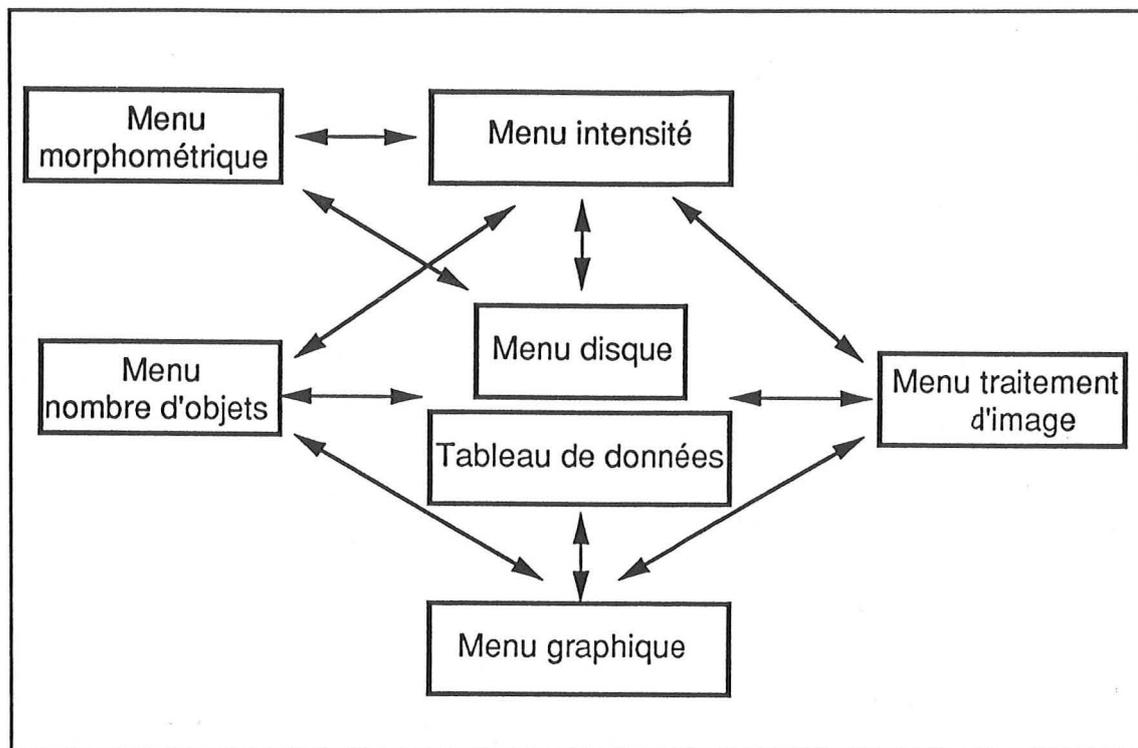


Figure 53 : Représentation schématique des relations entre les différents menus et tableaux.

Cette image est constituée d'un ensemble de pixels : 640 x 480. Chaque pixel est défini par trois informations :

- son abscisse X
- son ordonnée Y
- son niveau de gris ou son intensité

Il y a 256 niveaux de gris allant de 0 pour le noir à 255 pour le blanc.

L'image prise est ensuite mise en mémoire (sauvegarde sous la forme d'une Snapshot) et retraitée ultérieurement.

(2) Prise d'une série d'image

Afin d'approcher l'évolution dans le temps de l'agrégation des hématies, il était nécessaire de saisir après l'arrêt du cisaillement une série d'images.

Le logiciel offre la possibilité de mettre dans une mémoire temporaire automatiquement des images ou Snapshots (instantanés). En effet, la fonction Snapshot a pour but de mettre en mémoire un maximum de 9 images choisies préalablement à des intervalles de temps définis après l'arrêt du cisaillement.

(3) Traitement des images

(a) Définition d'une zone d'intérêt

Après la sauvegarde de l'image, grâce à la souris, la traçage d'une zone d'intérêt ou AOI peut être effectuée sur l'écran vidéo (Figure 54). Une AOI (area of interest) est une zone particulière de l'écran que l'on définit et qui offre plusieurs avantages :

- amélioration de la vitesse de réalisation de certaines mesures, opérations concernant le traitement d'images, analyse d'images et comptage d'objets. La vitesse d'exécution de ces opérations dépend très fortement de la taille de l'AOI. Plus elle est petite, plus rapide est l'exécution.
- amélioration des contrastes car dans de petites surfaces, une moins grande gamme de niveaux de gris est représentée par rapport à l'image entière, d'où un meilleur contraste final.

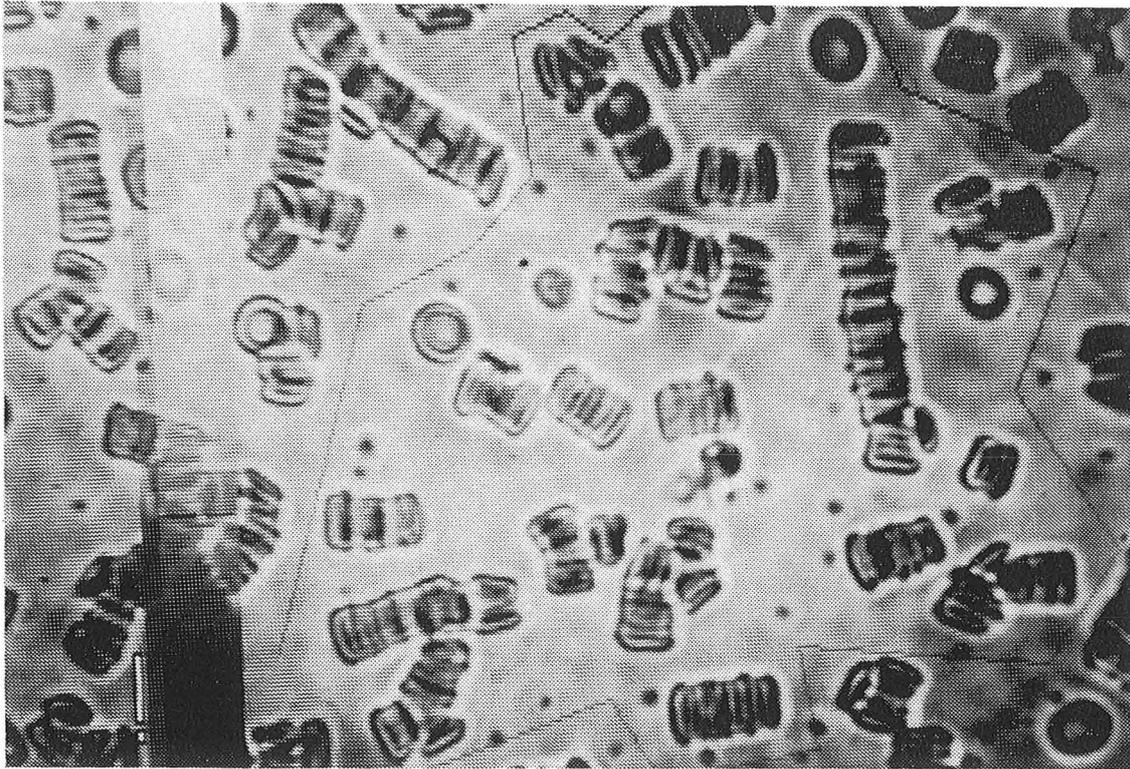


Figure 54 Représentation d'une zone d'intérêt.

(b) Etablissement d'un contraste

Une macrocommande permet d'augmenter automatiquement le contraste pour une AOI préalablement définie. Après l'augmentation du contraste, les pixels blancs sont éliminés et l'image est plus nette par rapport celle qui se trouve à l'extérieur de la zone d'intérêt. Ce qui améliore la visibilité et donc favorise les mesures. De plus, le grossissement de l'image est également effectué afin de faciliter le traçage ultérieur du contour des objets sur l'écran vidéo (Figures 55, 56).

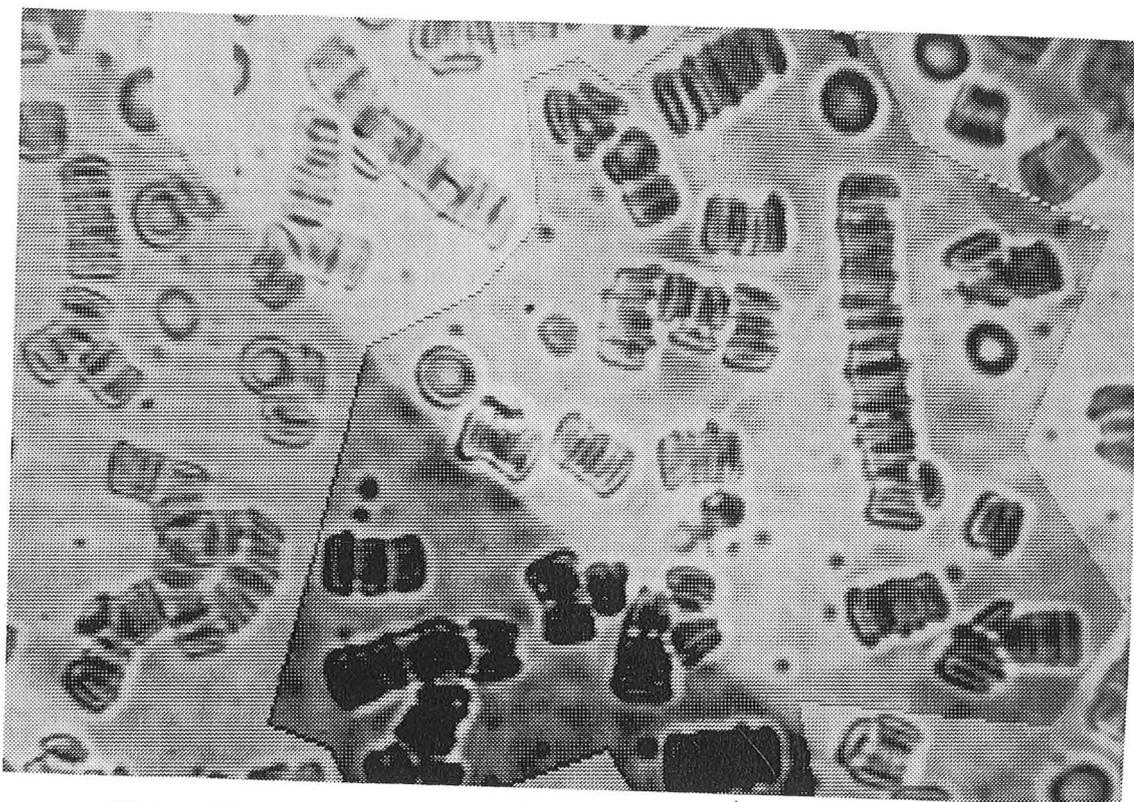


Figure 55 : Etablissement d'un contraste sur une zone d'intérêt définie.



Figure 56 : Agrandissement d'image (x 2).

(c) Méthodes de traçage, comptage et contour

Une fois que le contraste et le grossissement de la zone d'intérêt sont effectués, trois méthodes peuvent être utilisées pour les calculs des paramètres :

• Méthodes de traçage

Grâce à la souris, il est possible de tracer le contour des objets et d'en définir leur aire et périmètre. Le contour de l'objet doit être dessiné intégralement ou on peut dans le cas d'un polygone, définir ses sommets en sélectionnant une des options "area" ou "dist" dans le menu "morph" pour obtenir l'aire ou le périmètre de l'objet.

Selon le choix de l'utilisateur défini préalablement dans ses variables d'environnement, cette méthode peut utiliser soit l'algorithme Scan Conversion, soit l'algorithme de Stokes.

Pour plus de précisions sur ces algorithmes, voir ci-après dans la méthode de comptage et la méthode des contours.

• Méthodes de comptage

Après la définition d'une zone d'intérêt ou AOI (une partie de l'écran à traiter) et l'établissement d'un contraste, il est tout d'abord nécessaire de sélectionner la gamme des niveaux de gris à prendre en considération (Thresholding). Dès lors, les niveaux de gris éliminés apparaissent comme des pixels blancs. Ensuite, l'option Count du menu Objet Count permet de compter le nombre d'objets présents dans l'AOI mais aussi de définir leurs caractéristiques dont l'aire et périmètre. Enfin, il suffit d'éliminer les objets comptés ne correspondant pas à une cellule ou à un agrégat.

Cette méthode utilise l'algorithme Scan Conversion.

- 1) Dans l'espace pour l'entier 16K x 16K dans lequel est initialement enregistré les données du pointeur, JAVA relie les sommets digitalisés avec les lignes digitalisées les plus proches de la ligne se trouvant dans l'espace non digitalisé.
- 2) Ensuite, il compte tous les pixels qui se trouvent à l'intérieur du polygone.
- 3) Il multiplie ce nombre de pixels par facteurs qui convertissent l'espace 16K x16K des pixels dans le monde réel.

• *Méthodes des contours*

Après avoir effectué un contraste, cette méthode utilise l'option Edge qui permet de tracer le contour d'un objet de manière soit automatique pour des objets simples, soit par l'opérateur lui-même pour des objets complexes (**Figure 57**). Ensuite, les objets dont les contours ont été définis sont enregistrés par les coordonnées X,Y de l'ensemble des points du contour dans un tableau de données. Grâce à des transformations sur les données, il est possible à partir de ces coordonnées d'obtenir l'aire et le périmètre des objets.

L'algorithme utilisé dans cette méthode de calcul d'aire est l'algorithme de Stokes très rapide et performant pour des objets de forme simple (un périmètre ne se coupant pas et aucun trou dans l'objet).

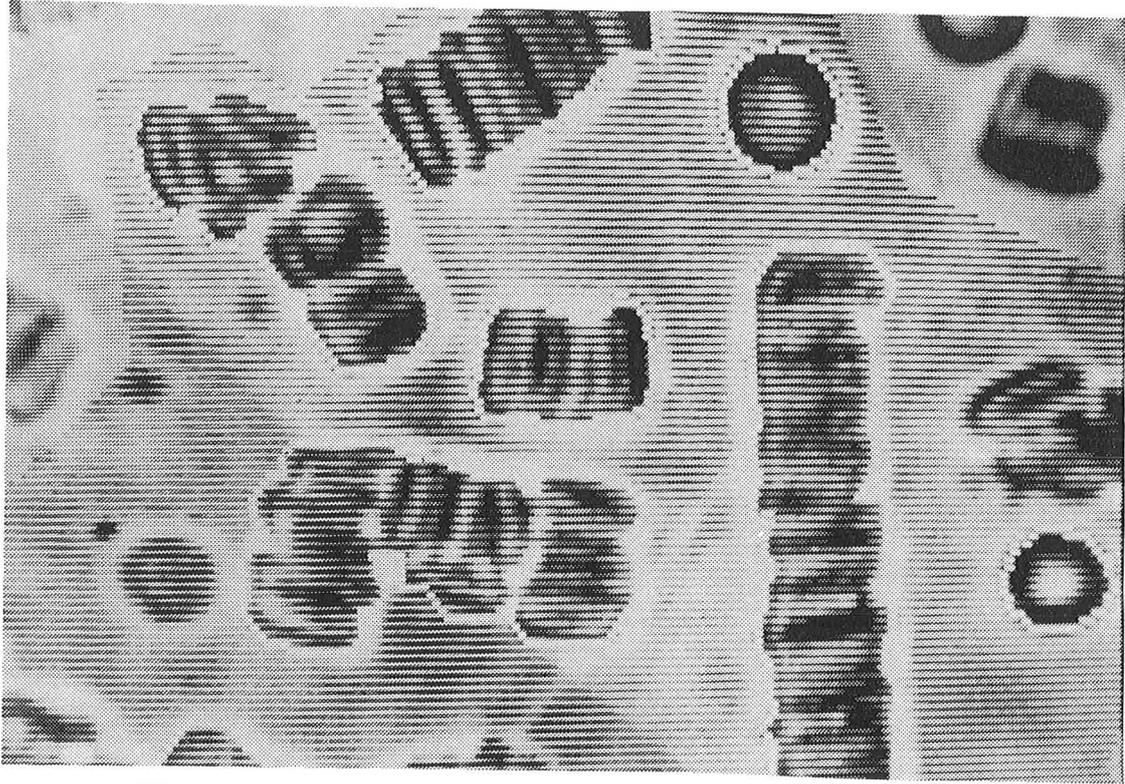


Figure 57 : Représentation des objets dont le contour a été défini.

(4) Traitement du calcul

Une fois que les contours de tous les agrégats et hématies isolées ont été tracés et leurs coordonnées stockées dans un tableau de données, la phase de calcul peut commencer. Une macrocommande du logiciel permet à partir des coordonnées d'un tracé de calculer l'aire délimitée par celui-ci et son périmètre, de faire la somme des aires et des périmètres mesurés pour calculer les paramètres souhaités.

II.3. Paramètre d'agrégation érythrocytaire

PAULUS et coll. (161, 162) ont considéré un indice qui présente l'avantage d'être sans dimension et de pouvoir se normer pour sa plus grande valeur obtenue dans le cas d'un cercle unique.

$$K = \frac{4\pi S}{p^2}$$

Cet index prend la valeur théorique de 1 dans le cas d'un cercle. A surface constante l'augmentation de l'indice K est lié à la diminution du périmètre des structure observées. Elle correspond donc à la formation d'agrégats érythrocytaire. Une diminution de l'indice K traduit l'allongement des structures en rapport avec la formation des rouleaux.

Par ailleurs, MUNN et coll. en 1993 (152) dans une étude l'agrégation lymphocytaire par analyse d'images, ont proposé un indice qu'ils dénomment "facteur de forme" :

$$\sigma_i = \frac{P_i^2}{4\pi A_i} \quad \text{et qui est l'inverse de K.}$$

III. RESULTATS

III.1. Définition des conditions optimales

III.1.1 Sélection de la méthodes de traitement d'images

En ce qui concerne la **méthode de traçage**, elle est très facile à appliquer pour des objets simples. Par contre, il est quasiment impossible de la mettre en oeuvre pour des objets complexes. En effet, il n'est pas aisé de tracer le contour très précisément d'un objet d'où un risque d'erreur assez important. De plus, les fonctions Area et Dist qui permettent le calcul de l'aire et du périmètre ne peuvent s'appliquer simultanément. Il est donc nécessaire de répéter deux fois le tracé, et on obtient l'aire et le périmètre de deux objets légèrement différents. Etant donné la difficulté d'application de cette méthode, elle a été éliminée dans le début de l'étude.

Pour la **méthode des comptages**, elle offre l'énorme avantage d'être relativement rapide pour des images où les objets à compter sont très distincts. De plus, elle est très précise et correcte pour des objets ayant un périmètre se coupant (figure en huit par exemple) ou comportant des trous. Cependant, l'une des principales difficultés est l'établissement de la gamme des niveaux de gris à sélectionner. En effet, une certaine habitude est nécessaire et en outre selon l'appréciation de chacun, les résultats peuvent ainsi être différents.

Remarque : Une méthode pour pouvoir plus facilement définir la gamme des niveaux de gris, est de tracer les contours des objets à définir grâce à la méthode définie ci-après car ceux-ci restent apparents pendant cette opération de sélection (thresholding). Cependant, cette disposition est très coûteuse au niveau temps.

Un des atouts majeurs de la **méthode des contours** est sa facilité d'application grâce à la possibilité d'intervenir manuellement dans le tracé si le contour automatique ne satisfait pas. Cette option est rendue ainsi très maniable. Néanmoins plusieurs précautions sont nécessaires pour que cette méthode fournisse des résultats corrects :

- Dans le cas de petits objets, JAVA avant d'arrêter son tracé, tourne plusieurs fois autour de celui-ci entraînant ainsi de fausses mesures. On retrouve ce cas lorsqu'il est arrêté au cours d'un tracé car il tourne autour d'un petit objet. Il faudra alors prendre garde à effacer correctement tous les points car ceux-ci n'apparaissent plus à l'écran.
- Il faut absolument éviter tout tracé ayant un périmètre se coupant.

Au travers d'études sur des cas réels, il est apparu que seul la méthode des contours était valable, la méthode de comptage n'ayant aucune valeur biologique car elle considère la cellule comme un anneau, le périmètre pris en compte étant la somme du périmètre intérieur et extérieur.

III.1.2. Grossissement du microscope

Pour l'observation microscopique, le rhéoscope est fixé sur la platine d'un microscope inversé muni d'un objectif x60. Avec l'objectif x60, les hématies même isolées, sont suffisamment grosses pour que le tracé s'arrête à la fin du premier tour. Si on choisit un plus petites objectif par exemple x32, les cellules séparées apparaissant sur l'écran sont plus petites et le tracé automatique effectue plusieurs fois le tour de la cellule avant de s'arrêter. Dans le tableau de données il y a apparition de x fois les coordonnées du contour de la cellule ce qui entraîne des mesures fausses de l'aire et du périmètre.

III.1.3. Hématocrite

Il est impossible de traiter une image d'une suspension sanguine à hématocrite 0,40 l/l sur l'écran vidéo à cause des hématies trop nombreuses qui se superposent ou se chevauchent. Pour cette raison, un hématocrite de 0,20 l/l a été systématiquement utilisé dans cette étude en vue de visualiser correctement les rouleaux et les hématies isolées.

III.1.4. Intervalle de temps entre deux images

L'observation microscopique a montré qu'après l'arrêt du cisaillement, l'évolution de la formation des rouleaux était un processus relativement lent, l'agrégation n'étant complète qu'après plusieurs minutes. Ainsi, l'enregistrement d'une seule image pour une suspension sanguine a été systématiquement réalisé 3 minutes après l'arrêt du cisaillement lorsque l'on considère que le processus d'agrégation est terminé. Pour étudier l'évolution du phénomène d'agrégation des hématies, nous avons pris habituellement 9 clichés du même échantillon de sang au temps 20sec, 35sec, 50sec, 65sec, 85sec, 105sec, 125sec, 145sec, et 165sec après l'arrêt d'un cisaillement élevé. Un temps inférieur à 10 secondes n'a pu être considéré, les images n'étant pas nettes.

III.2. Influence du nombre de cisaillement sur la valeur de l'indice K

Une première série d'expériences a consisté en une comparaison entre les indices d'agrégation K obtenus après deux étapes de cisaillements à la même vitesse sur le même échantillon. 3 minutes après l'arrêt du cisaillement, une image a été enregistrée. L'intervalle de temps entre chaque étape de cisaillement est de 3 minutes. Les résultats de cinq expériences sont traités par le test t de Wilcoxon et représentés sous forme de moyenne \pm déviation standard. La comparaison montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les indices K obtenus après deux étapes de cisaillements (Figure 58).

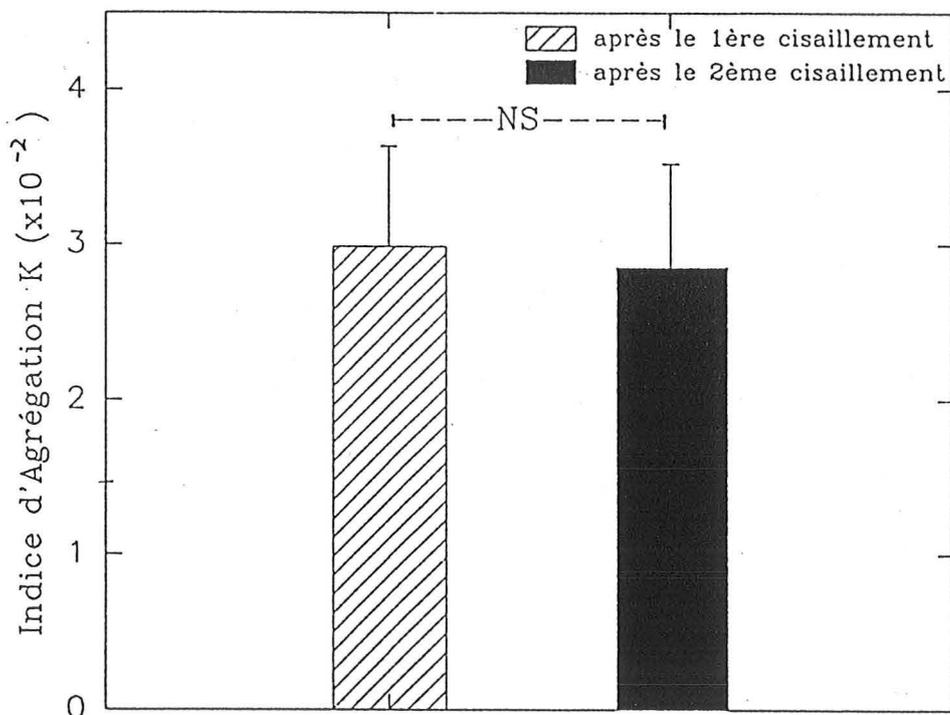


Figure 58 : Influence de deux cisaillements successifs sur la valeur de l'indice K (n = 5).

III.3 Reproductibilité

III.3.1. Influence du nombre d'objets traités sur la valeur de l'indice K

Dans le but d'estimer l'indice K en fonction du nombre d'objets traités, nous avons analysé des échantillons de sang normaux. Pour chaque échantillon, 9 images

ont été enregistrées à partir de l'arrêt de la contrainte de cisaillement et pour chaque image 5 traitements successifs correspondant à un nombre d'objet traité différent : 10, 12, 16, 20 et 25 objets traités ont été effectués. Nous constatons sur la **Figure 59** que, quel que soit le moment où l'image a été enregistrée l'indice K varie en relation inverse avec le nombre d'objets analysés. La **Figure 60** montre l'allure de la variation de l'indice K en fonction du nombre d'objets traités. Sur cette figure, chaque point représente la moyenne de six expériences de traitement de la première, la cinquième et la neuvième image.

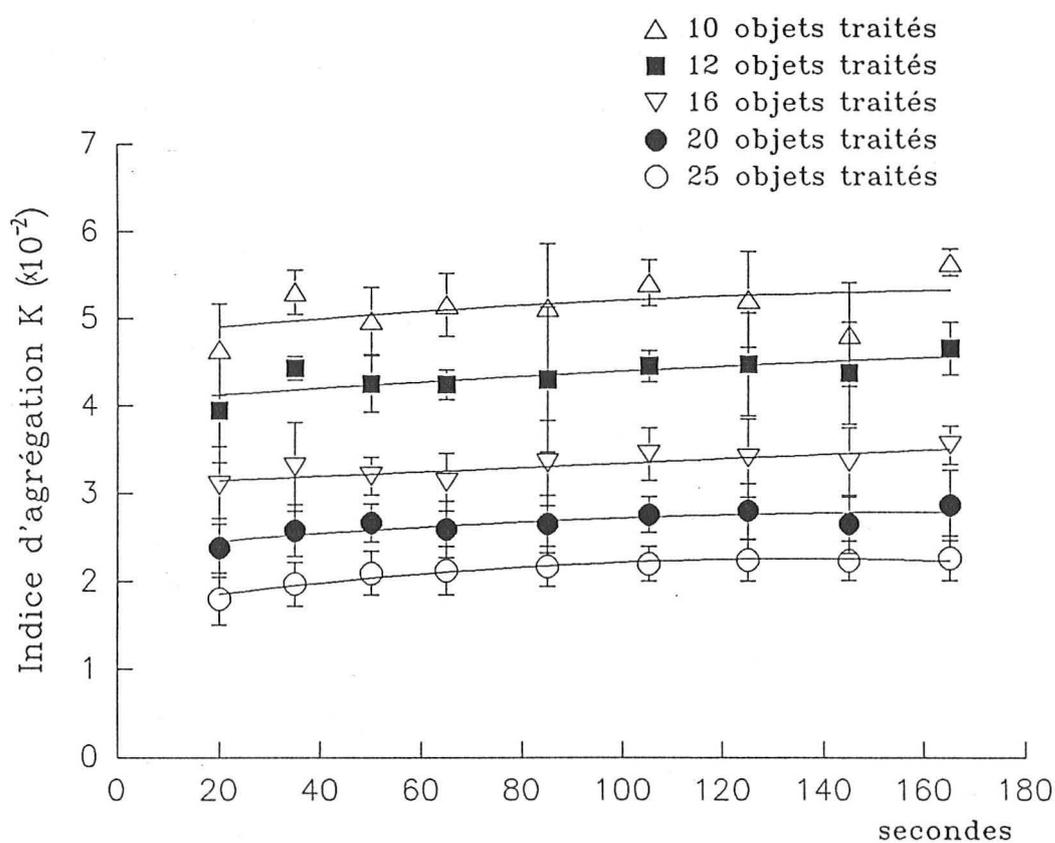


Figure 59 : Influence du nombre d'objets sur la valeur de l'indice K en fonction du temps ($n = 6$).

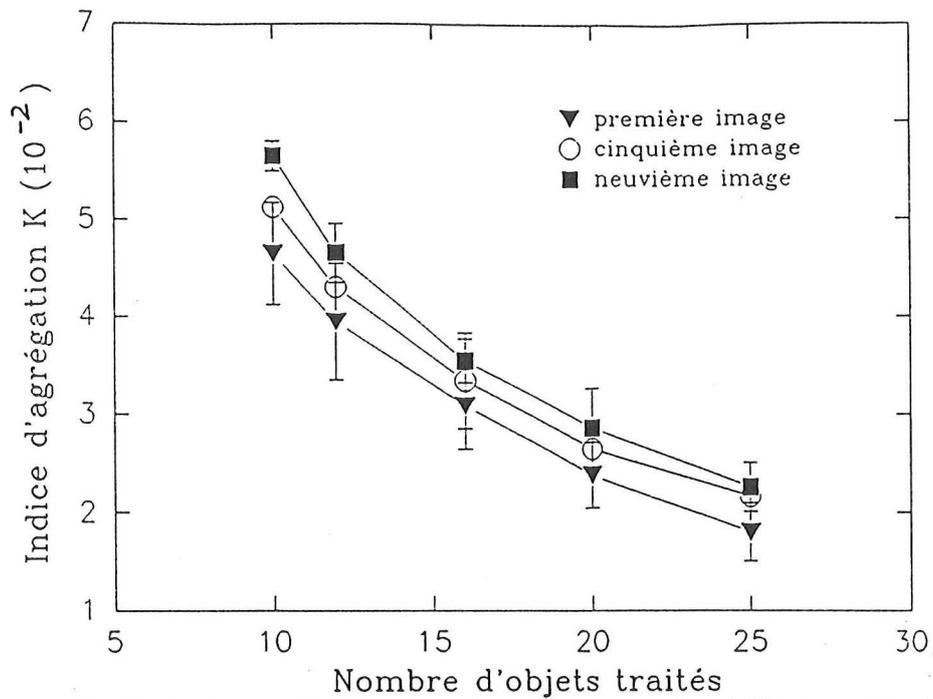


Figure 60 : Variation de l'indice K en fonction du nombre d'objets traités ($n = 6$).

III.3.2. Reproductibilité

Dans cette partie du travail, nous avons estimé la reproductibilité de la détermination de l'indice K. Une même image a été traitée successivement quatre fois avec le même nombre d'objets. De plus, chaque image a été traitée avec trois nombres d'objets différents : 10, 15 et 25 objets. Les résultats représentant le traitement de trois images prises respectivement à 20, 85 et 165 secondes après l'arrêt du cisaillement sont rassemblés sur le **Tableau VII**. Les valeurs de l'indice K montrent qu'il n'y a pratiquement pas de différence entre les quatre traitements successifs pour la même image avec un même nombre d'objets analysés. Ce résultat reflète une bonne reproductibilité. Cependant, comme on pouvait s'y attendre, le traitement d'un petit nombre d'objets induit une dispersion de la valeur K et tous les traitements d'images suivants ont été réalisés avec un nombre d'objets fixé à 25.

Tableau VII : Reproductibilité de l'indice K ($\times 10^{-2}$)

	1ère image (20 sec)			5ème image (85sec)			9ème image (165sec)		
	10 objets	15 objets	25 objets	10 objets	15 objets	25 objets	10 objets	15 objets	25 objets
1er calcul	4,94	2,95	1,92	5,92	3,77	2,23	5,38	3,69	2,29
2ème calcul	3,68	2,78	1,88	5,40	3,64	2,26	5,85	3,91	2,27
3ème calcul	4,53	3,22	1,83	5,90	3,58	2,27	5,45	3,81	2,24
4ème calcul	4,30	3,01	1,98	5,68	3,78	2,28	5,84	3,77	2,32

III.4. Mise en évidence de la cinétique de l'agrégation érythrocytaire

Les résultats sont rassemblés dans la **Figure 61**. Les expériences ont été effectuées sur trois échantillons différents : sang normal, sangs hypoagrégant et hyperagrégant. Un volume défini de plasma a été remplacé par le même volume d'albumine (30g/l) pour le modèle hypoagrégant, de fibrinogène 2,5g/l pour le modèle hyperagrégant. Après l'arrêt du cisaillement, 9 images ont été enregistrées automatiquement pendant 3 minutes environs avec des intervalles du temps définis. On constate que pour tous les échantillons, l'indice d'agrégation K augmente avec le temps. Les valeurs de K par rapport au témoin (sang normal) diminuent pour les échantillons comportant de l'albumine et inversement, augmentent pour les échantillons comportant du fibrinogène.

Les images représentatives de ces trois types d'échantillons sont représentées sur les **Figures 62, 63 et 64**.

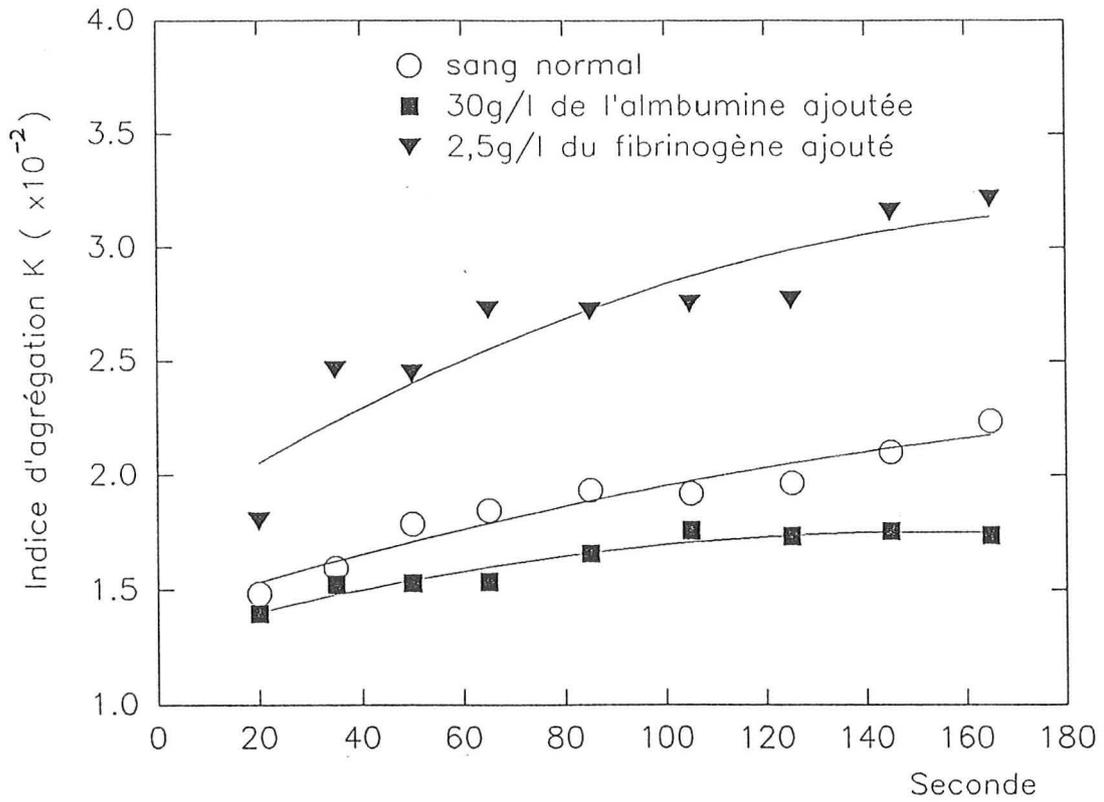


Figure 61 : Variations de la valeurs de l'indice K dans différentes situations d'agrégation érythrocytaire

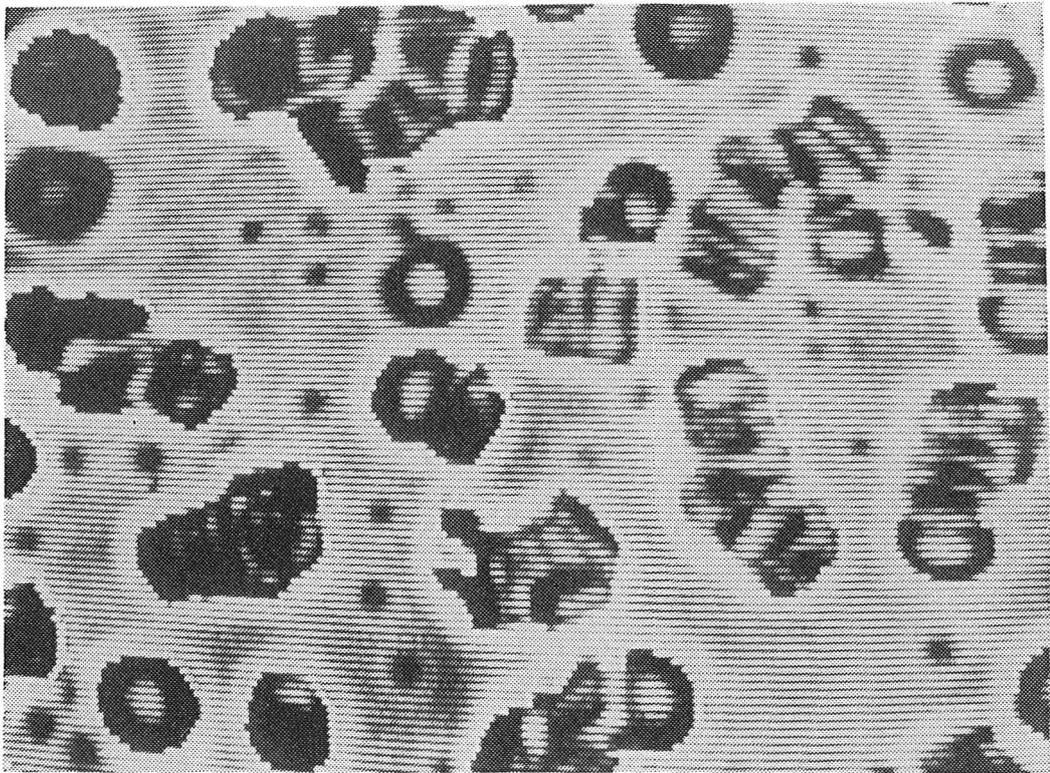


Figure 62 : Image de la suspension d'hématies normales dans du plasma autologue à hématocrite 0,2 l/l.

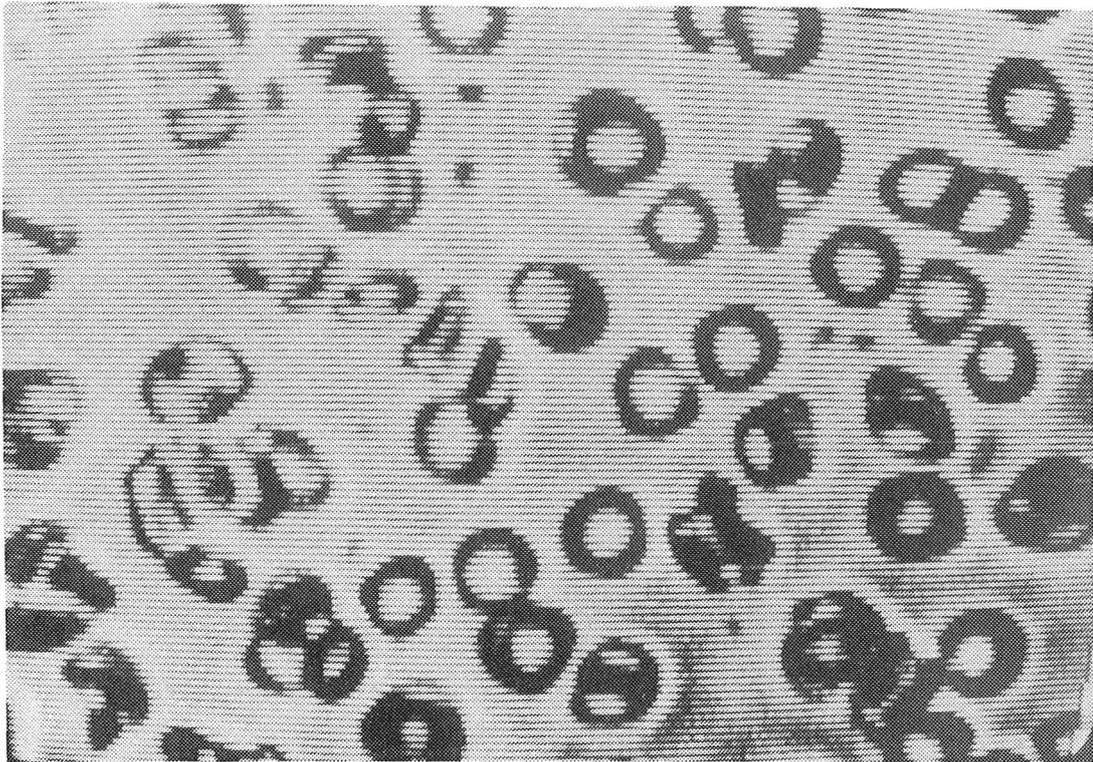


Figure 63 : Image de la suspension d'hématies comportant de l'albumine 30 g/l à hématoците final 0,2 l/l.

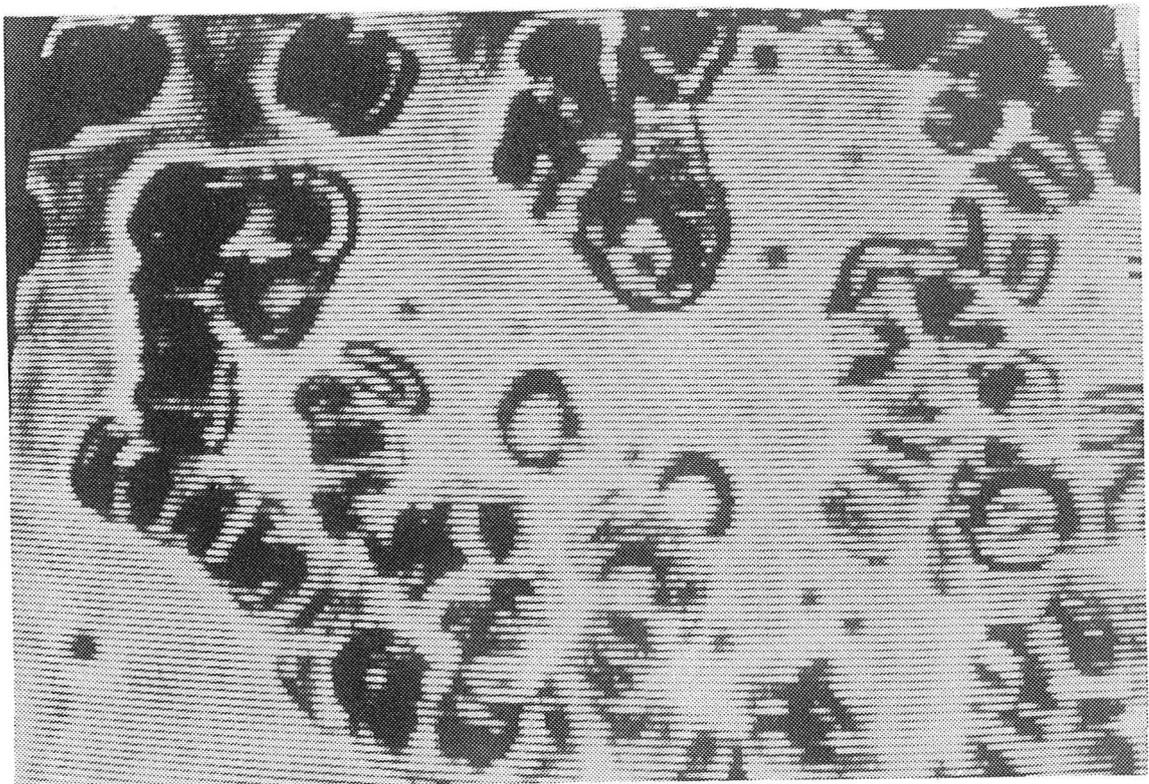


Figure 64 : Image de la suspension d'hématies comportant du fibrinogène 2,5 g/l à hématoците final 0,2 l/l.

III.5. Relations de l'indice K avec les paramètres de l'analyse par rétrodiffusion laser

Afin de déterminer si l'indice K traduit une caractéristique particulière de l'agrégation érythrocytaire, une étude a été entreprise pour comparer l'évolution de K et des paramètres : t_A , t_F , S_{10} , IS, $\dot{\gamma}_D$ et $\dot{\gamma}_S$ qui sont obtenus avec le système de l'analyse de la lumière rétrodiffusée par une suspension sanguine (Erythroagrégramètre). Pour chaque image, 25 objets ont été traités. Les valeurs de 10 expériences sont représentées sur la **Figure 65**. Nous avons constaté qu'il n'existe pas de corrélations très fortes entre l'indice K et les six paramètres de la rétrodiffusion laser. La meilleure corrélation est obtenue avec le temps primaire d'agrégation t_A ($r = -0,708$). Il n'apparaît pas de corrélation entre K et les paramètres $\dot{\gamma}_D$ et $\dot{\gamma}_S$ traduisant la cohésion des rouleaux. Paradoxalement, la corrélation est médiocre avec IS donné comme un paramètre de structure ($r = -0,568$).

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Le présent travail a permis une première validation de la quantification de l'agrégation érythrocytaire par traitement d'image en exploitant le logiciel JAVA et en utilisant la méthode des contours.

Il nous a paru important tout d'abord de vérifier que cette méthode est reproductible. En effet, il est souhaitable qu'à chaque fois que l'on traite une même image, l'indice K trouvé soit identique. Pour cela, nous avons effectué quatre traitements successifs pour une même image avec le même nombre d'objets analysés. Les résultats ont démontré que la méthode apparaît très satisfaisante et les différences observées d'un traitement à l'autre sont faibles en particulier pour les images comportant un nombre d'objets traités supérieur à 15.

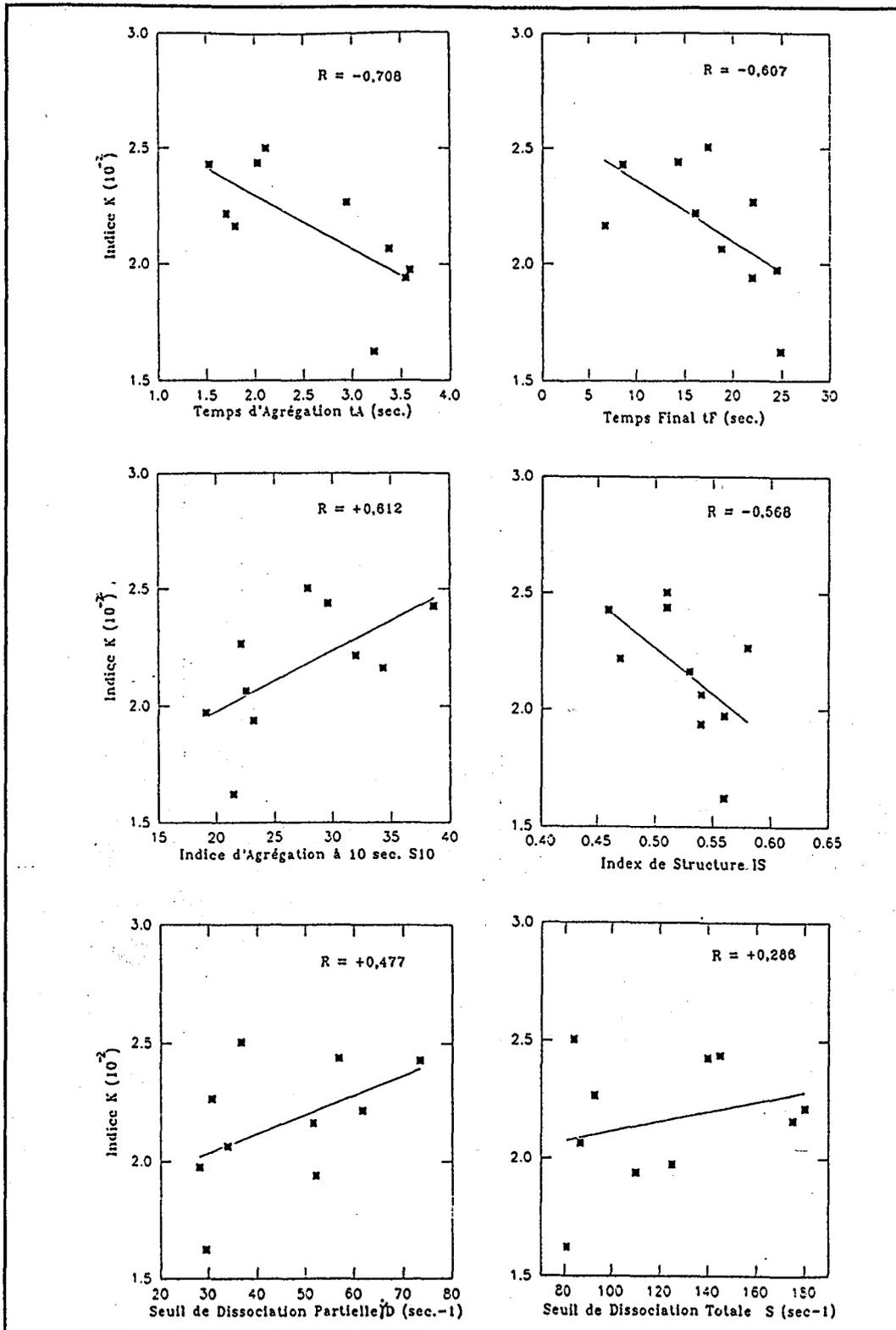


Figure 65 : Relations de l'indice K avec les paramètres de la rétrodiffusion laser. ($n = 10$)

En ce qui concerne le rôle du nombre d'objets traités sur la valeur de K, nous avons été surpris de constater que l'indice K baissait lorsque le nombre d'objets traités augmentait. En fait, nous avons découvert tardivement une erreur dans la macrocommande du logiciel. L'ordinateur calcule une indice K final après avoir effectué la somme des surfaces et la somme des périmètres de tous les objets traités. Toutefois, si le nombre d'objets traités est le même d'une image à l'autre les différences observées ont une signification biologique en valeur relative.

Quant au nombre d'objets choisis, les expériences de reproductibilité ont montré qu'il vaut mieux traiter dans une zone d'intérêt un plus grand nombre possible d'objets. Toutefois, il n'est pas possible de traiter fréquemment un nombre d'objet supérieur à 25 pour un échantillon à hémocrite 0,2 l/l sur une zone d'intérêt défini en raison du grossissement du microscope. Une diminution du grossissement du microscope entraîne une augmentation du nombre d'objets dans la zone d'intérêt qui a été définie mais dans ce cas, comme on l'a vu, la méthode des contours présente des limites.

En ce qui concerne la rapidité du traitement d'images, il faut noter que la définition de la zone d'intérêt, l'établissement du contraste et le calcul du paramètre K sont très rapides (moins d'une minute pour chaque étape). L'étape la plus longue est le traçage des contours qui dans le cas de rouleaux de formes complexes ne s'effectue pas automatiquement de façon correcte. La "reprise en main" de l'ordinateur par le manipulateur en vue de la définition d'un tracé correct peut être assez longue. En général, le traitement complet d'une image prend 15 minutes.

Quoi qu'il en soit, on a constaté que cette méthode d'analyse d'images permet de caractériser l'agrégation érythrocytaire (Figure 61). Par ailleurs, elle semble donner d'autres informations que l'analyse de la rétrodiffusion laser.

Pour améliorer le système d'analyses, il serait souhaitable d'envisager la résolution tridimensionnelles des images. C'est ainsi que, par exemple, MUNN et coll. (152) ont proposé deux formules différentes pour déterminer les caractéristiques bidimensionnelles ou tridimensionnelles.

TROISIEME PARTIE

**ETUDE DES INTERACTIONS DES PRODUITS DE
CONTRASTE IODES AVEC LES HEMATIES**

III-1

INTRODUCTION

Les dérivés de l'acide triiodobenzénique sont largement utilisés pour augmenter le contraste tissulaire lors d'examens radiologiques. L'existence de réactions "pseudo" allergiques d'intensités très variables et d'accidents thromboemboliques ou hémorragiques à la suite de leur injection (71, 86, 220) a suscité de nombreux travaux pour tenter d'approcher le mécanisme d'interaction de ces molécules avec les cellules du sang périphérique. Des modifications de la fonction plaquettaire et des propriétés phagocytaires des polynucléaires ont été rapportées (71). Par ailleurs, les propriétés rhéologiques macroscopiques et microscopiques du sang sont également modifiées (7,96,156). Il est vraisemblable que ces altérations rhéologiques sont en relation avec les propriétés physico-chimiques particulières des produits de contraste: viscosité élevée, hyperosmolalité, contenu en iode représentant 40 à 60% de la masse de la molécule, existence de groupements chimiques ionisés ou non. Dans ces conditions, il est nécessaire de cerner le ou les facteurs responsables des modifications rhéologiques pour approcher au niveau cellulaire et moléculaire l'action de ces produits, en particulier pour les plus récents dont l'hyperosmolalité est réduite. Or, des études *in vitro* récentes font apparaître des résultats contradictoires, les produits de contraste étudiés provoquant soit une diminution (5,6,156), soit une augmentation de l'agrégation érythrocytaire (108,110,151,171,180). Ces résultats différents sont peut-être liés à la méthodologie utilisée pour apprécier l'agrégation érythrocytaire ou à certains paramètres qui ont une influence importante sur l'agrégation comme l'hématocrite qui peut être modifié par un effet de dilution.

Quoi qu'il en soit, il est important, en raison des effets secondaires des produits de contraste, de connaître de façon précise leurs propriétés rhéologiques ainsi que leurs mécanismes d'action au niveau moléculaire.

Cette partie de notre mémoire est consacrée aux études entreprises sur l'interaction des produits de contraste avec les hématies.

Le chapitre III - 2 est consacré à la description des structures et des propriétés intrinsèques des produits de contraste.

Le chapitre III - 3 rassemble les études *in vitro* au niveau microscopique qui ont porté sur le phénomène d'agrégation des hématies et ses modifications par les produits de contraste. L'agrégation érythrocytaire a été approchée par l'analyse de la lumière rétrodiffusée et par analyse d'image.

Enfin, au niveau moléculaire, l'interaction des produits de contraste avec les membranes d'hématies a été appréciée à l'aide d'une technique spectroscopique d'émission moléculaire et par la détermination de la charge électrique de la surface cellulaire. Les résultats sont rassemblés dans les chapitres III - 4, III - 5..

III - 2

GENERALITES SUR LES PRODUITS DE CONTRASTE IONIQUES ET NON IONIQUES

I. INTRODUCTION

Afin d'augmenter la densité de contraste des tissus au cours d'examens radiologiques, les produits de contraste iodés ont été introduits et utilisés depuis 1920 (217). De nombreux progrès dans les produits de contraste ont contribué à l'essor de la radiologie moderne. Des molécules de type monomère non ioniques et de type dimère ioniques ont été développées et employées en routine. Toutefois, malgré l'amélioration des produits de contraste, il existe des réactions secondaires telles que des chocs anaphylactiques, des accidents vasculaires et de la néphrotoxicité. Par conséquent, la connaissance préalable des propriétés physico-chimiques des produits de contraste est indispensable à la compréhension des mécanismes d'interactions au niveau cellulaire des produits de contraste.

II. RESUME DE L'HISTORIQUE DES PRODUITS DE CONTRASTE

Initialement développés avec des huiles iodées vers 1920, les examens angiographiques furent poursuivis plus tard avec du bromure de strontium et de l'iodure de sodium. Toutefois, très rapidement, des composés iodés organiques visant à diminuer les réactions secondaires ont été mis au point.

La fixation covalente d'iode sur des molécules organiques a été recherchée afin d'obtenir une tolérance satisfaisante de l'agent de contraste. Il s'est avéré qu'une liaison de l'iode avec un atome de carbone d'un noyau benzénique était la plus adaptée à une diffusion

sans danger de l'iode. Par ailleurs, le noyau benzénique offre différentes possibilités de substitution. C'est pourquoi tous les produits de contraste iodés sont des dérivés du triiodobenzène.

Au noyau benzénique sont liés trois atomes d'iode dans les positions 2, 4, 6. Les positions 1, 3, 5 sont occupées par des groupements soit carboxyles, soit carbamoyles, soit carboxamides (Figure 66).

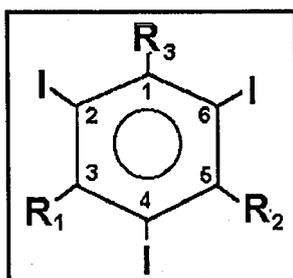
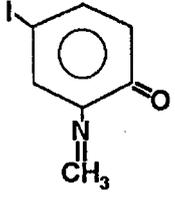
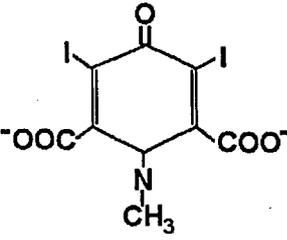
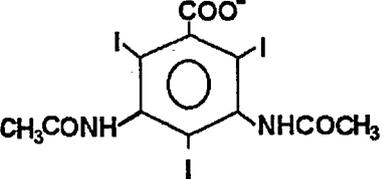
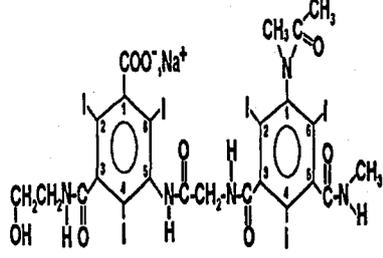
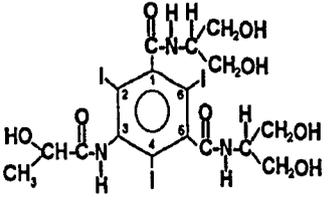


Figure 66: Dérivés du 2, 4, 6 triiodobenzène substitué par les groupements R1, R2, R3

L'évolution de ces produits de contraste est résumée sur le **Tableau VIII**

Tableau VIII : Evolution des produits de contraste

1929	MONOIODES	noyau benzénique + 1 atome d'iode  SELEKTAN®
------	-----------	--

1931	DIIODES	<p>noyau benzénique + 2 atomes d'iode</p>  <p>UROSELEKTAN B®</p>
1954	TRIIODES "ionique"	<p>noyau benzénique + 3 atomes d'iode</p>  <p>RADIOSELECTAN®</p>
1974	TRIIODES DIMERE ionique (osmolalité réduite)	 <p>HEXABRIX®</p>
1977	TRIIODES MONOMERE non ionique (osmolalité réduite)	 <p>IOPAMIRON®</p>

Selon la nature des groupements et le nombre de noyau aromatique, différents groupes de molécules iodées de contraste peuvent être considérés (Figure 67) (71). Si un des groupements, R3 par exemple, est un groupement carboxyle, les molécules sont ionisées à pH neutre. Par contre, si les groupements R1, R2, et R3 sont des groupements carbamoyles ou carboxamides, les molécules ne sont plus ionisables. Dans ces deux cas, il est possible d'avoir une molécule constituée d'un noyau benzénique substitué ("monomère") ou deux cycles aromatiques ("dimères"). Quatre types de molécules pourront être obtenues : (1) "monomères" ioniques; (2) "monomères" non-ioniques; (3) "dimères" ioniques; (4) "dimères" non ioniques. Seuls les trois premiers types sont actuellement utilisés pour les uroangiographies.

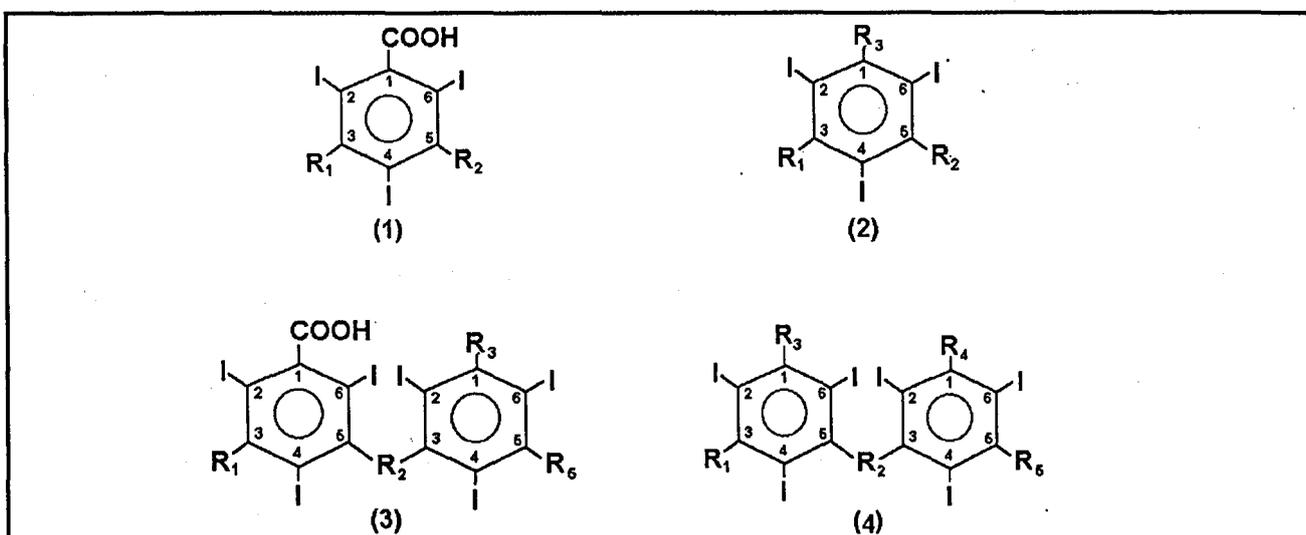


Figure 67. Les quatre types de molécules iodées (1) "monomères" ioniques; (2) "monomères" nonioniques; (3) "dimères" monoioniques; (4) "dimères" nonioniques. Les groupements R sont des groupements carbamoyles ou carboxamides.

Dans le cadre de notre travail, nous avons étudié deux "monomères" triiodés non ioniques: l'Iopamidol (IOPAMIRON[®]), l'Iohexol (OMNIPAQUE[®]) et un dimère hexaiodé ionique : l'Ioxaglate (HEXABRIX[®]) en raison de leur intérêt potentiel en clinique. Leurs structures sont les suivantes :

III.1. Osmolalité

L'osmolalité d'une solution est donnée par la concentration en mole solvatées par kg de solvant. L'osmolalité a été un sujet essentiel de recherche dans le but d'améliorer la tolérance du produit de contraste. En effet, le caractère hyperosmolaire d'un produit de contraste peut induire différentes réactions telles qu'une douleur vasculaire, une lésion de l'endothélium vasculaire, des bouffées de chaleur, des nausées et des vomissements etc. (71, 95). Il a été défini un niveau seuil de douleur vasculaire lorsque les osmolalités des solutions sont supérieures à 650 -750 mOsmol/kg (204).

Afin d'augmenter la tolérance des produits de contraste, on a tenté de développer des molécules dont l'osmolalité des solutions est la plus proche possible de l'osmolalité physiologique tout en conservant la concentration d'iode souhaitable (supérieure à 300mg Iode/ml) (206). Deux voies différentes ont été considérées :

- (1) L'augmentation du nombre d'atomes d'iode pour le même nombre de molécules en solution. Ceci est réalisé grâce à une structure "dimère". L'Ioxaglate par exemple est composé de deux cycles triiodobenzéniques substitués, l'un ionique et l'autre non ionique. La dimérisation est réalisée par la formation d'un pont glycylic entre le groupement en position 5 de la partie ionique et la fonction amide en position 3 de la partie non ionique. Six atomes d'iode sont présents sur chaque anion (97). Les caractéristiques de cette molécule montrent une haute teneur en iode et une augmentation du poids moléculaire due à la "dimérisation". L'Ioxaglate a la particularité d'avoir la plus faible osmolalité : 550 mOsmol/kg pour une solution contenant 300mg Iode/ml (87).
- (2) La suppression de la forme ionique de la molécule organique. En effet, une molécule non ionique ne donnant en solution qu'une seule entité chimique par rapport à une molécule ionique aura approximativement la moitié de l'osmolalité

pour une concentration donnée en iode. C'est ainsi qu'ont été développés l'OMNIPAQUE[®] (Iohexol) et l'IOPAMIRON[®] (Iopamidol). Le substitut en position 1 (R3) est une chaîne latérale non dissociable qui remplace le groupement carboxyle. Ces deux produits de contraste (Iohexol et Iopamidol) ont permis une réduction nette de l'osmolalité : Iohexol (690 mOsmol/kg) et Iopamidol (619 mOsmol/kg) pour une solution contenant 300mg Iode/ml (87).

III.2. Viscosité

En pratique clinique, la viscosité influe sur la vitesse de perfusion ou sur la pression nécessaire pour une injection rapide. Cette vitesse peut être limitée par la forte viscosité de la solution. Il a été montré qu'une solution de 300mg Iode/ml n'excède pas 10cps à 30°C (205).

La viscosité dépend de différents facteurs (205) :

- La forme globulaire de la molécule qui minimise l'interaction avec le solvant.
- L'interaction moléculaire : les agrégats moléculaires diminuent l'osmolalité, mais augmentent la viscosité.
- La concentration molaire d'iode : des solutions moléculaires ayant une teneur en iode plus faible (faible pourcentage d'iode par rapport à la masse moléculaire, sont plus visqueuses (120).
- La taille de la molécule : une plus grande chaîne latérale hydrophilique améliore la solubilité, mais diminue la teneur en iode. La viscosité augmente proportionnellement à la taille des chaînes latérales. Les "dimères" augmentent la viscosité, en particulier les dimères non ioniques. La flexibilité de la liaison entre les deux monomères peut jouer un rôle sur la viscosité par superposition de deux noyaux benzéniques.

- La molécule ionique : en solution, le cation méglumine est plus visqueux que le cation Na^+ .

III.3. Neutralité électrique

Les produits de contraste ioniques sont solubles dans l'eau car ils forment des ions qui portent une charge électrique soit positive (cation), soit négative (anion). La solubilité des produits de contraste non ioniques est principalement obtenue par l'introduction d'un nombre suffisant de groupements hydroxyles (non ioniques).

La neutralité électrique confère aux molécules non ioniques une neurotoxicité plus faible, car elles ne sont pas porteuses de charges électriques et ne perturbe pas le fonctionnement des neurones (120).

III.4. Hydrophilie-Lipophilie

Le potentiel lipophile d'une molécule influe sur la tolérance à cette molécule car un composant lipophile réagit avec des constituants telles que la membrane cellulaire, les protéines, ou joue un rôle sur la diffusion par la barrière hémato-encéphalique. Une augmentation de la lipophilie d'une molécule entraîne des interactions biologiques plus importantes. Les trois atomes d'iode confèrent à la structure benzénique un haut degré de lipophilie qui doit être masqué par les autres substituants du noyau. Par conséquent, la caractéristique d'hydrophilie a été prise en compte dans la recherche des molécules et on a tenté d'augmenter leur caractère hydrophile. Comme l'ionité confère l'hydrophilie totale aux molécules ioniques, la substitution du groupement carboxyle avec des molécules non ioniques est réalisée par l'addition de groupement hydroxyles (97). L'amélioration de l'hydrophilie contribue à accroître la tolérance.

III - 3

EFFETS IN VITRO DES PRODUITS DE CONTRASTE IODES SUR L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE

I. INTRODUCTION

L'existence de réactions vasculaires lors de leur utilisation en radiodiagnostic (71, 86, 95, 220) a suscité de nombreuses investigations pour appréhender leur mécanisme d'action au niveau cellulaire. En particulier, l'action des produits de contraste sur les propriétés rhéologiques du sang a fait l'objet de travaux dont certains ont concerné l'agrégation des hématies.

ROBERTSON et coll. (180) ont rapporté la formation de caillots de sang dans des cathéters angiographiques contenant un mélange de sang et de produits de contraste non ioniques. RAININKO et coll. (171), KIMBALL et coll. (110), ASPELIN et coll. (7), KALLIO et coll. (108) ont mis en évidence une agrégation irrégulière lors de l'interaction *in vitro* du sang avec des produits de contraste non ioniques. NGUYEN et coll. (155) ont observé *in vitro* une inhibition de l'agrégation des hématies provoquée par des produits de contraste ionique et non ioniques. MARY et coll. (139), en utilisant des proportions peu importantes de produits de contraste (de 1 à 5 % V/V), ont rapporté que l'Ioxaglate provoquait *in vitro* une augmentation de l'agrégation, alors que l'effet de l'Iopamidol semblait dépendre du paramètre mesuré. MONNIER et coll. (151) ont observé *in vitro* que les produits de contraste non ioniques provoquaient une baisse de la contrainte de désagrégation alors que l'Ioxaglate n'entraînait pas d'effet significatif sur ce paramètre. Par contre, dans les mêmes modèles expérimentaux, la présence de quantités importantes de fibrinogène est

associée à un effet agrégant de tous les produits de contraste. LERCHE et coll. en 1992 (125) ont montré que les produits de contraste monomère non ioniques provoquent une forte diminution de l'agrégation érythrocytaire. Les résultats sont obtenus par l'analyse des variations de la lumière rétrodiffusée laser. ZANNAD et coll. (226) ont montré qu'une altération morphologique des hématies (formation d'échinocytes et de stomatocytes) est observée plus fréquemment avec l'Iopamidol et l'Iohexol qu'avec l'Ioxaglate.

Ces résultats contradictoires sont peut-être liés au fait que l'hématocrite n'est pas toujours contrôlé, l'effet de la dilution s'ajoutant à celui des propriétés intrinsèques des produits de contraste et pouvant en partie expliquer les résultats. Par ailleurs, la comparaison avec des échantillons témoins d'osmolalité voisine est rarement faite.

Par conséquent, à l'heure actuelle, les travaux publiés sur ce sujet ne permettent pas de tirer des conclusions définitives. Toutefois, il est important que, dans ce domaine, l'effet des différents produits de contraste sur le phénomène d'agrégation des hématies soit apprécié de façon précise. En effet, la présence dans la microcirculation d'agrégats irréversibles ou très difficilement dissociables peut être à l'origine d'accidents thrombotiques.

Le présent travail a consisté en une étude quantitative *in vitro* dans des conditions strictement définies afin de pouvoir différencier le rôle de l'osmolalité de solution des autres propriétés des produits de contraste. L'étude de l'effet de trois produits de contraste ionique (Ioxaglate) et non ioniques (Iohexol, Iopamidol) sur l'agrégation érythrocytaire a été entreprise par analyse de la rétrodiffusion laser et également par analyse d'image.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Produits de contraste

Pour toutes les expérimentations, les produits de contraste ont été systématiquement ajoutés à la concentration de 300mg d'iode par ml. Les osmolalités de ces solutions ont été déterminées par la méthode de congélation avec un Micro-Osmomètre REBLING MROE 01 (Allemagne). Les valeurs sont rassemblées dans le **Tableau IX**.

Tableau IX. Osmolalité des produits de contraste

Produits de contraste	Osmolalité en mOsmol/kg à 300mg Iode/ml
Ioxaglate	638
Iohexol	627
Iopamidol	681

II.2. Détermination de la viscosité

La viscosité des milieux de suspension des hématies a été déterminée à 37°C avec un viscosimètre capillaire (Module V, Amtec, Villeneuve-Loubet, France). Il mesure automatiquement le temps d'écoulement du fluide newtonien dans un capillaire, entre deux repères définis optiquement. Cette mesure d'un temps est équivalente, à une constante près, (celle du tube du viscosimètre) à la mesure de la viscosité cinématique en cStokes. La viscosité dynamique exprimée en mPa.sec. étant égale au produit de la viscosité cinématique par la densité des solutions, la densité a été mesurée à l'aide d'un densimètre électronique digital ANTON PAAR type DMA (Graz, Autriche). Les viscosités exprimées en mPa.sec

sont rassemblées dans le **Tableau X**. Dans le cas des échantillons témoins, les produits de contraste ont été remplacés par du NaCl isotonique et du NaCl ou du Saccharose d'osmolalité voisine de celle des produits de contraste ionique et non ioniques, respectivement.

Tableau X. Viscosité (mPa.sec) des milieux utilisés pour la détermination des paramètres d'agrégation des hématies

Produits	Viscosité (mPa.sec) à 37°C	Produits	Viscosité (mPa.sec) à 37°C
NaCl-isotonique*	0,978		
20% Saccharose-635**	1,118	20% Iohexol-627	1,403
40% Saccharose-635	1,256	40% Iohexol-627	1,989
50% Saccharose-635	1,326	50% Iohexol-627	2,494
20% Saccharose-685	1,151	20% Iopamidol-681	1,313
40% Saccharose-685	1,258	40% Iopamidol-681	1,840
50% Saccharose-685	1,372	50% Iopamidol-681	2,441
20% NaCl-642	1,014	20% Ioxaglate-638	1,388
30% NaCl-642	1,036	30% Ioxaglate-638	1,569
40% NaCl-642	1,047	40% Ioxaglate-638	1,940
50% NaCl-642	1,089	50% Ioxaglate-638	2,444

*Les produits sont dilués dans de l'eau distillée.

**Les chiffres représentent l'osmolalité des solutions.

II.3. Préparation des échantillons - Mesures de l'agrégation érythrocytaire

L'hématocrite est déterminé avec une microméthode (centrifugeuse ADAMS AUTOCRIT) et ajusté à 0,80 l/l. Pour chaque échantillon, on ajoute à 1ml d'hématies, 0,3ml

d'un mélange de composition définie d'albumine (CRTS, Nancy, France), d'immunoglobulines (CRTS, Nancy, France) et de fibrinogène (Biogenic, Montpellier, France) et 0,7ml de milieu comportant les produits de contraste. L'hématocrite de l'ensemble des échantillons ainsi préparé est égal à 0,40 l/l. Le milieu suspensif comporte 10g/l d'albumine, 12g/l d'immunoglobulines et 1,5g/l de fibrinogène et selon l'échantillon des proportions variables de produits de contraste représentant 10 à 25% du volume total de la solution.

En ce qui concerne la partie de l'étude relative à l'analyse d'image, une fraction du sang est centrifugée pendant 10 minutes à 1300g pour récupérer le plasma. Après détermination de l'hématocrite sur l'autre fraction du sang, un volume de 200 μ l est réparti dans chaque tube. On rajoute dans chaque tube un volume de plasma et de produit de contraste (ou de solution de référence) pour que l'hématocrite final soit égal à 0,20 l/l et que le volume de produit de contraste représente 20% du volume total. Des échantillons témoins ont comporté du NaCl-isotonique, du NaCl hyperosmolaire (642 mOsmol/kg), et du Saccharose hyperosmolaire (685 mOsmol/kg). Les produits de contraste étudiés ont été l'Ioxaglate-638 mOsmol/kg, l'Iohexol-627 mOsmol/kg, et l'Iopamidol-681 mOsmol/kg. Les échantillons ainsi préparés sont incubés 5 minutes à 37°C puis la détermination de l'agrégation par l'analyse d'images est effectuée.

II.4. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm déviation standard. Les différences sont analysées par le test non paramétrique de rang de Wilcoxon. Les résultats sont jugés significatifs à $p < 0,05$.

III. RESULTATS

III.1 Adaptation des échantillons témoins à la molécule étudiée

En raison du caractère hyperosmolaire des produits de contraste, des échantillons témoins ayant une osmolalité voisine ont été considérés. De plus, les produits de contraste étant ionique et non ioniques, des expériences préliminaires ont été effectuées avec des échantillons comportant du NaCl isotonique ainsi que du NaCl ou du Saccharose hyperosmolaire à différentes concentrations. L'évolution de l'agrégation est différente avec ces deux produits comme le montre la Figure 68. Les résultats de 5 expériences ont montré que les produits hyperosmolaires : NaCl-703 mOsmol/kg et Saccharose-723 mOsmol /kg entraînent une augmentation significative des temps d'agrégation t_A , t_F et de l'indice de structure IS [à l'exception du NaCl-703 (10%) pour t_F et du Saccharose (10%) pour IS] et une diminution significative de l'indice d'agrégation S_{10} par rapport au témoins NaCl-isotonique, ce qui reflète une diminution importante de l'agrégation érythrocytaire, notamment pour le Saccharose. Les différences observées par rapport aux échantillons comportant du NaCl-isotonique augmentent avec la concentration des solutions hyperosmolaires. Une diminution des seuils de désagrégation est observée pour le Saccharose-723 mOsmol/kg, traduisant une inhibition de la cohésion des hématies. Il faut noter que, par rapport au groupe NaCl isotonique, l'effet du témoin NaCl hyperosmolaire est peu important sur le seuil de désagrégation partielle (à l'exception du NaCl-703 à la proportion de 30%). Quant au seuil de désagrégation total, il est très légèrement augmenté dans les échantillons contenant du NaCl hyperosmolaire en comparaison avec le NaCl isotonique reflétant une légère augmentation de la cohésion des hématies provoqué par le NaCl hyperosmolaire. Il résulte de cette étude que le choix des témoins présente une importance fondamentale. Par conséquent, des échantillons contenant du NaCl hyperosmolaire (642 mOsmol/kg) ont été pris comme témoins pour les expérimentations effectuées avec l'Ioxaglate, produit de contraste ionique. En ce qui concerne l'Iohexol et

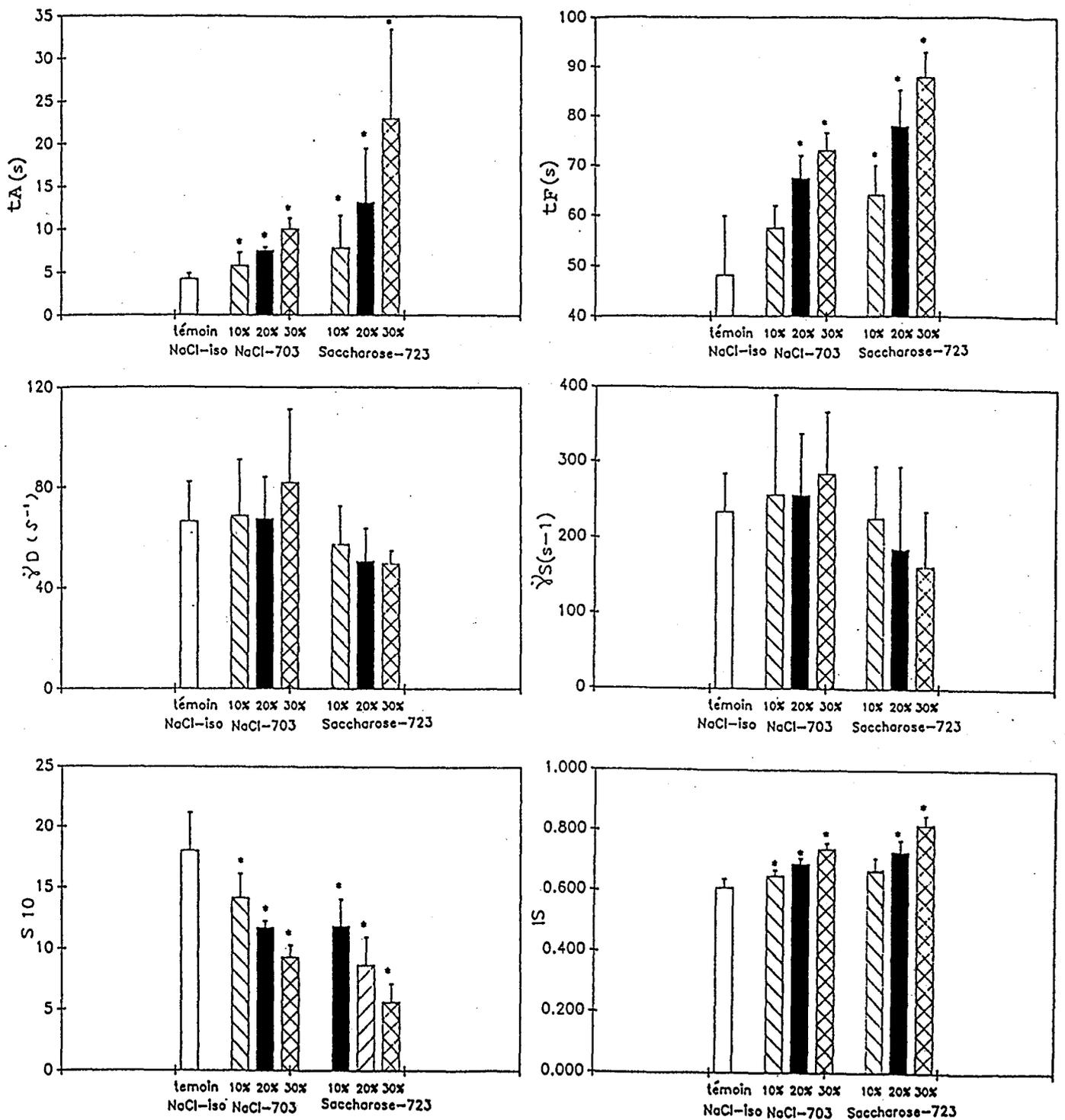
l'Iopamidol, produits de contraste non ioniques, les échantillons témoins ont été constitués de Saccharose hyperosmolaire (674 mOsmol/kg).

III.2. Agrégation érythrocytaire par rétrodiffusion laser

Les résultats observés avec l'Ioxaglate sont rassemblés sur les **Figures 69, 70, 71**.. Ils concernent des valeurs moyennes déterminées après 10 expériences dans des conditions identiques. L'Ioxaglate entraîne une diminution significative de tA et tF par rapport au témoin hyperosmolaire, traduisant une accélération significative de la cinétique d'agrégation ($p < 0,001$) (**Figure 69**). Concernant le paramètre S_{10} , les résultats donnent lieu à une interprétation identique ($p < 0,001$). Pour l'index de structure IS, les valeurs diminuent également significativement ($p < 0,001$) (**Figure 70**).

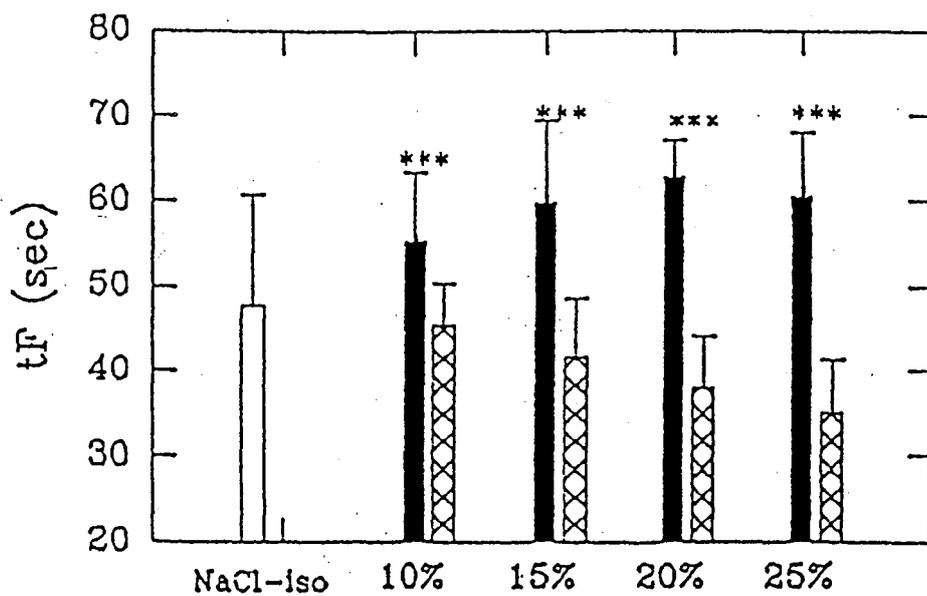
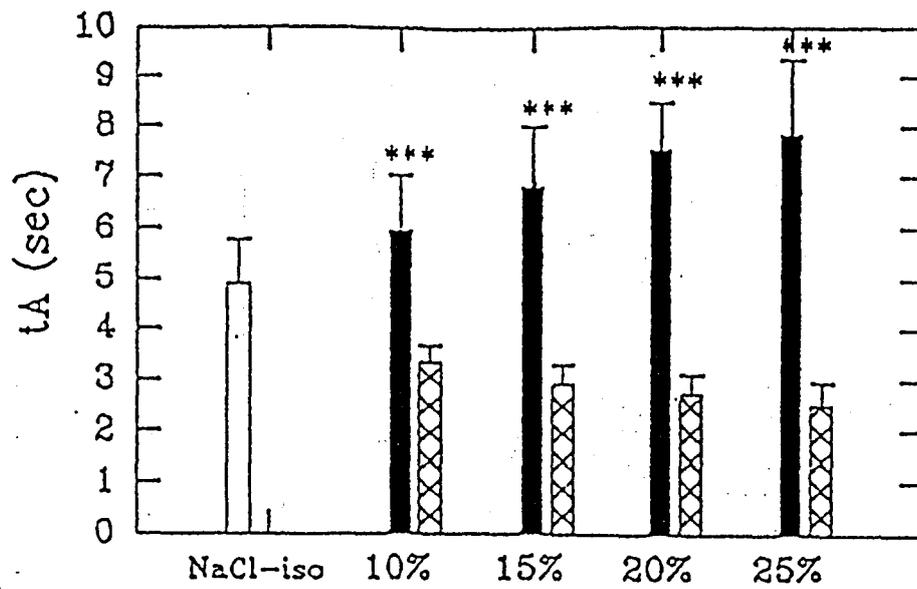
Les concentrations les plus importantes d'Ioxaglate provoquent une augmentation significative des seuils de désagrégation par rapport au témoin hyperosmolaire (**Figure 71**).

Les variations apparaissent être en relation avec les concentrations croissantes de produits de contraste ajoutés à la suspension sanguine.



* $p < 0,05$

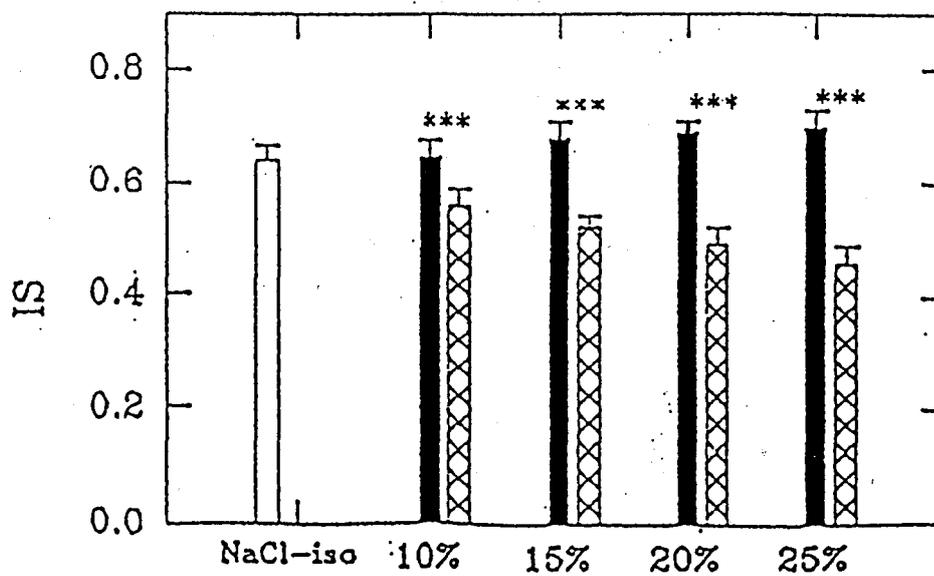
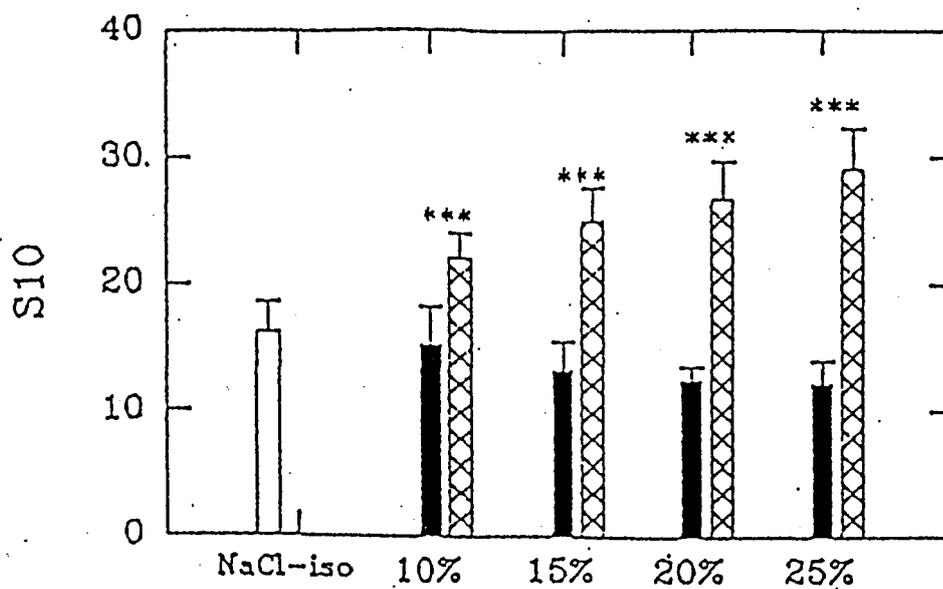
Figure 68 : Effet de différentes proportions de NaCl et de Saccharose hyperosmolaires sur les paramètres de l'agrégation érythrocytaire (n = 5).



NaCl-642
 Ioxaglate-638

*** $p < 0,001$ $n = 10$

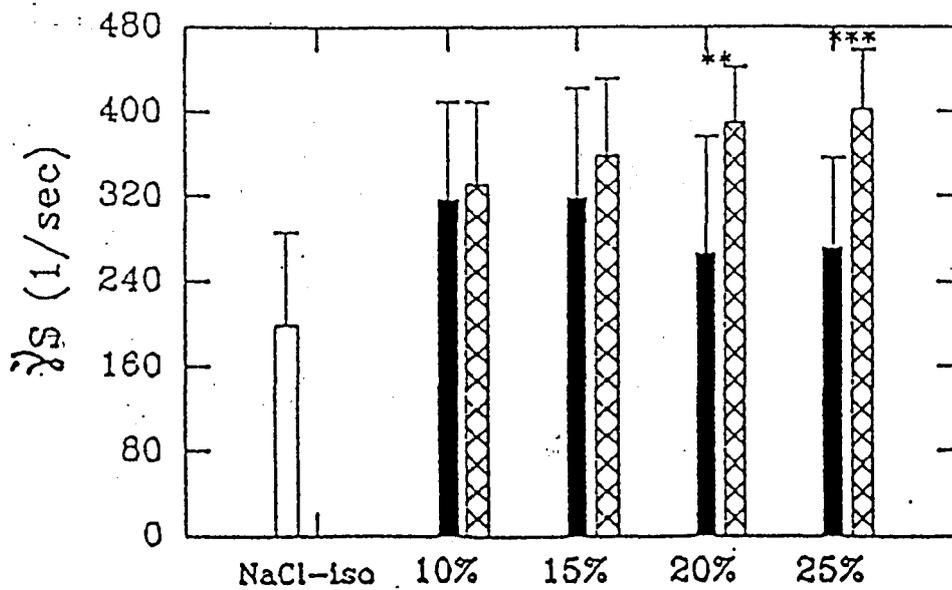
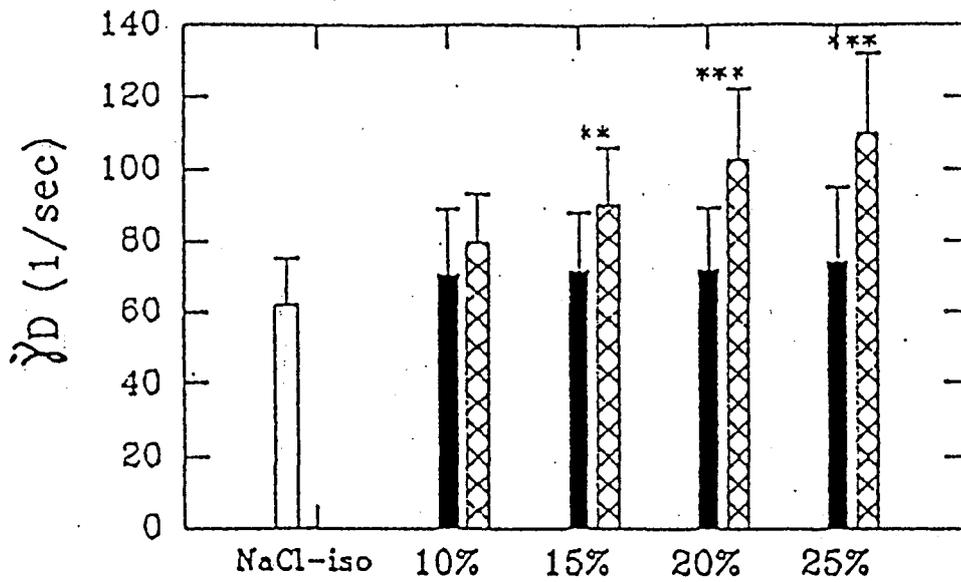
Figure 69 : Effet de l'Ioxaglate sur la cinétique de formation des rouleaux d'hématies.



*** $p < 0,001$ $n = 10$

■ NaCl-642 ☒ Ioxaglate-638

Figure 70 : Effet de l'Ioxaglate sur l'indice d'agrégation S10 et sur l'indice de structure IS.



NaCl-642
 Ioxaglate-638

*** $p < 0,001$ $n = 10$

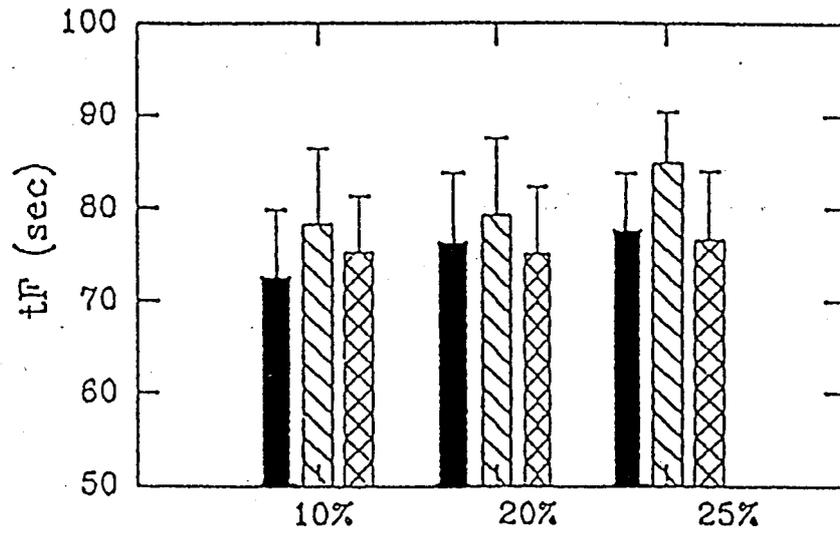
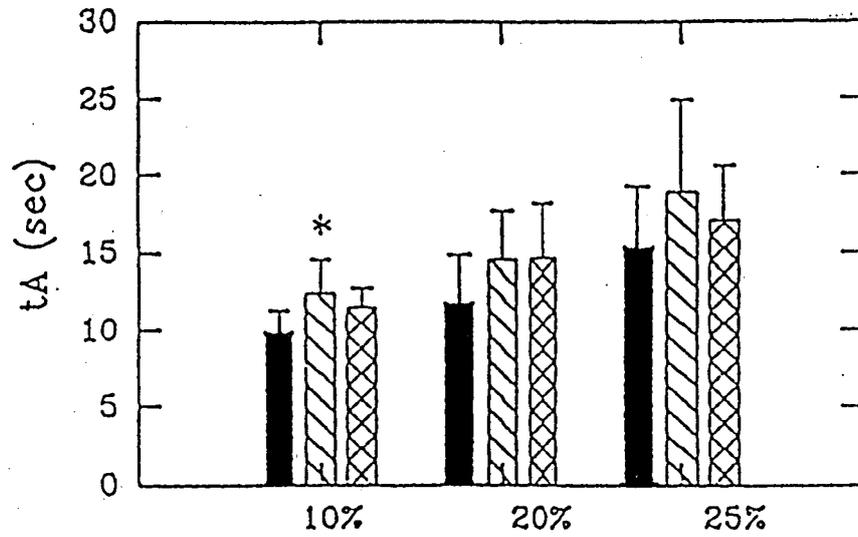
Figure 71: Effet de l'Ioxaglate sur la cohésion des rouleaux d'hématies.

En ce qui concerne l'Iohexol et l'Iopamidol, les Figures 72, 73, 74 résument les résultats de 7 expériences. On constate par rapport au Saccharose hyperosmolaire, que l'effet des deux produits de contraste non ioniques va dans le sens d'une augmentation de tA et de tF, notamment pour l'Iohexol (Figure 72). Ce résultat reflète une diminution de la cinétique de la formation des rouleaux d'hématies. En ce qui concerne les variations de S₁₀ et IS (Figure 73), elles sont très faibles et vont néanmoins également dans le sens d'une diminution de l'agrégation des hématies. Les seuils de désagrégation sont légèrement diminués, surtout pour $\dot{\gamma}_S$ aux plus fortes concentrations des produits de contraste non ioniques (Figure 74). A l'exception du paramètre tA où l'on observe une différence significative ($p < 0,05$) pour une concentration de 10% d'Iohexol, les différences observées sont non significatives.

III.3. Agrégation érythrocytaire par analyse d'images

Afin d'avoir des informations supplémentaires sur la morphologie des rouleaux et agrégats d'hématies, les expériences ont été effectuées par analyse d'image avec une concentration de produits de contraste représentant 20% du volume et un hématoците final de 0,20 l/l. Les résultats sont rassemblés sur la Figure 75. On observe que pour tous les échantillons, l'indice d'agrégation K augmente avec le temps.

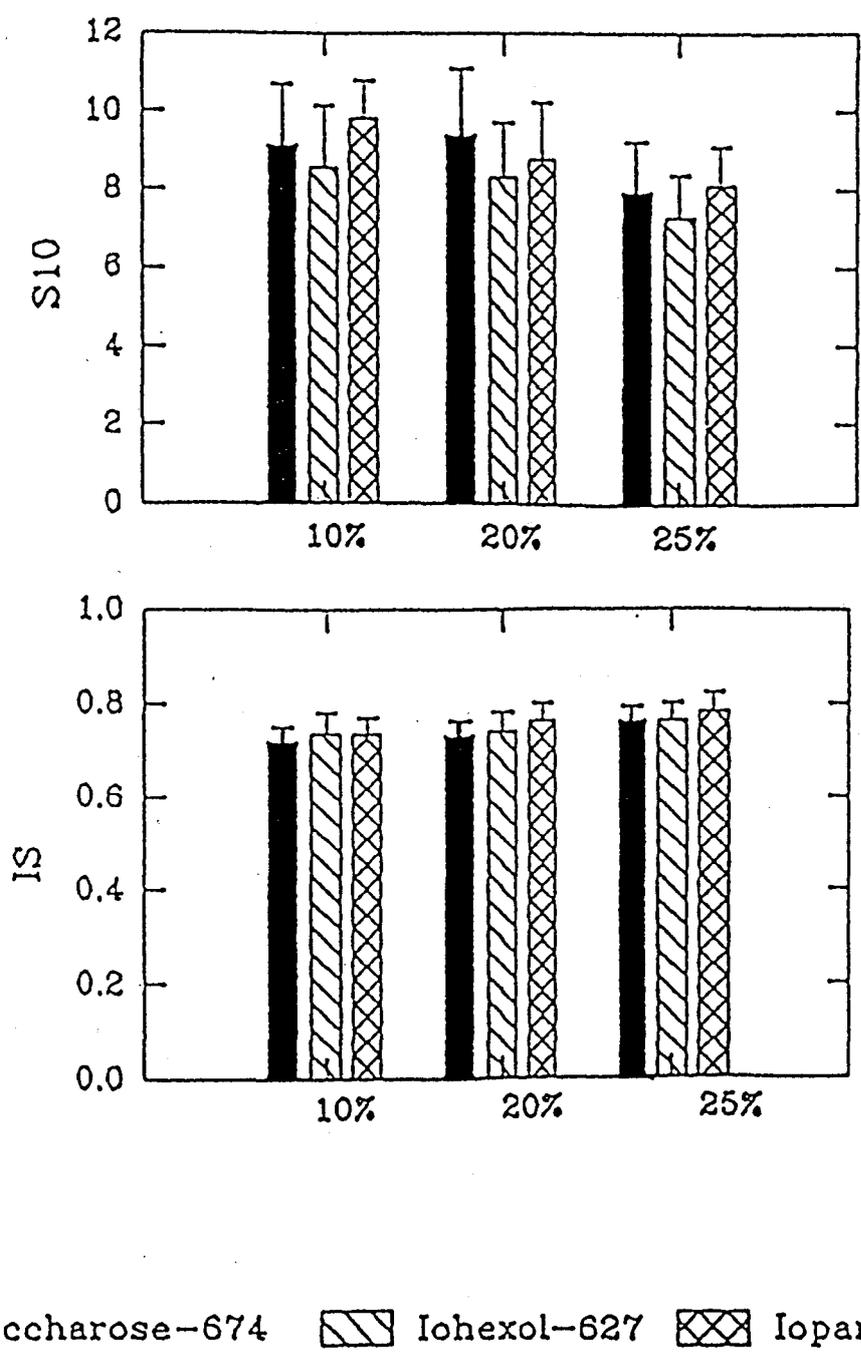
De plus, les valeurs de K sont systématiquement plus faibles pour les échantillons témoins comportant du NaCl hyperosmolaire et du Saccharose hyperosmolaire par rapport au NaCl-isotonique, traduisant une diminution de l'agrégation surtout pour le Saccharose hyperosmolaire.



Saccharose-674
 Iohexol-627
 Iopamidol-681

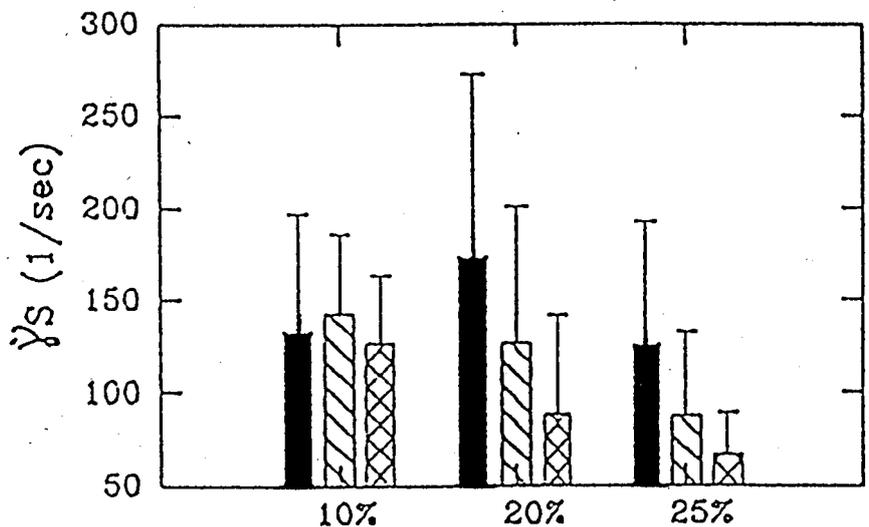
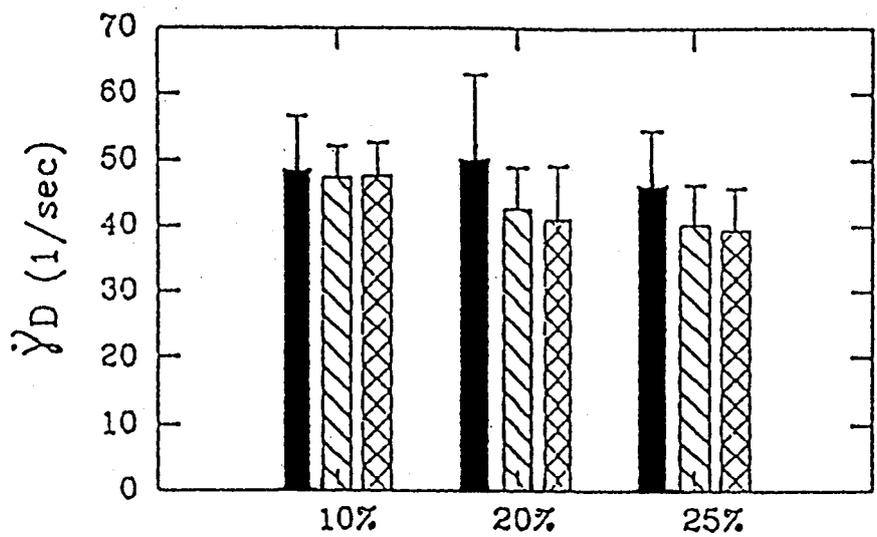
* $p < 0,05$ $n = 7$

Figure 72 : Effet de l'Iohexol et de l'Iopamidol sur la cinétique de formation des rouleaux d'hématies.



* $p < 0,05$ $n = 7$

Figure 73 : Effet de l'Iohexol et de l'Iopamidol sur l'indice d'agrégation S10 et sur l'indice de structure IS.



Saccharose-674
 Iohexol-627
 Iopamidol-681

* $p < 0,05$ $n = 7$

Figure 74: Effet de l'Iohexol et de l'Iopamidol sur la cohésion des rouleaux d'hématies.

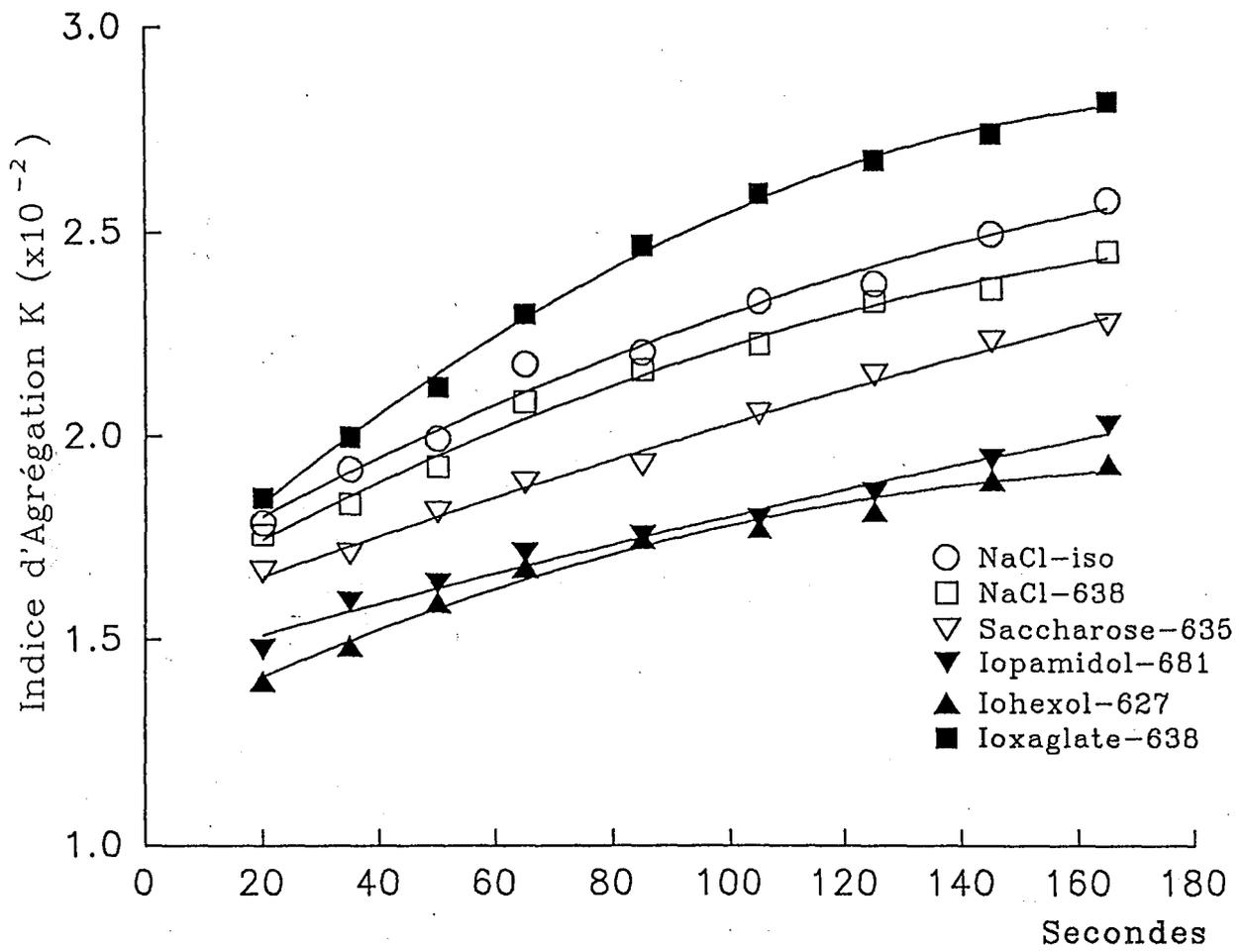


Figure 75 : Effets des produits de contraste ionique et non ioniques sur l'indice d'agrégation K en fonction du temps.

En ce qui concerne l'Iohexol et l'Iopamidol, on observe pour l'indice K des valeurs faibles reflétant l'effet hypoagregant des milieux de contraste non ioniques.

En revanche, pour l'Ioxaglate, l'indice K est plus élevé par rapport aux valeurs observées pour le NaCl hyperosmolaire et par conséquent, une augmentation de la cinétique d'agrégation provoquée par l'Ioxaglate est confirmée.

Au niveau de l'analyse morphologique, on a observé qu'il existe beaucoup d'échinocytes, de petites hématies isolées déformées et un petit nombre de rouleaux constitués de 3-4 hématies pour les échantillons contenant l'Iohexol ou l'Iopamidol (Figures 76, 77). En ce qui concerne l'Ioxaglate, cette modification de la forme des hématies existe peu. Par contre, on observe un certain nombre de rouleaux branchés et d'agrégats (Figure 78).

IV. DISCUSSION

Les produits de contraste qui sont des dérivés triodés de l'acide benzénique sont caractérisés par des propriétés physico-chimiques particulières, notamment une osmolalité et une viscosité élevées, ainsi que des propriétés ioniques et non ioniques. L'étude du rôle des produits de contraste sur l'agrégation érythrocytaire a été réalisée à hémocrite contrôlé afin d'éliminer l'influence de ce paramètre qui joue un rôle important sur l'agrégation des hématies. Par ailleurs, l'influence de l'osmolalité a été étudiée avec des groupes témoins d'osmolalité voisine de celle des produits de contraste. Les résultats observés suggèrent que l'augmentation de l'osmolalité est accompagnée d'une inhibition de l'agrégation érythrocytaire (Figure 68). Il est vraisemblable que cette modification est liée à la diminution de la déformabilité des hématies et à la formation d'échinocytes. En effet, des quantités croissantes (10% à 30%) de NaCl hyperosmolaire (703 mOsmol/kg) provoquent une diminution de l'agrégation. Cet effet est encore plus marqué pour le Saccharose (723

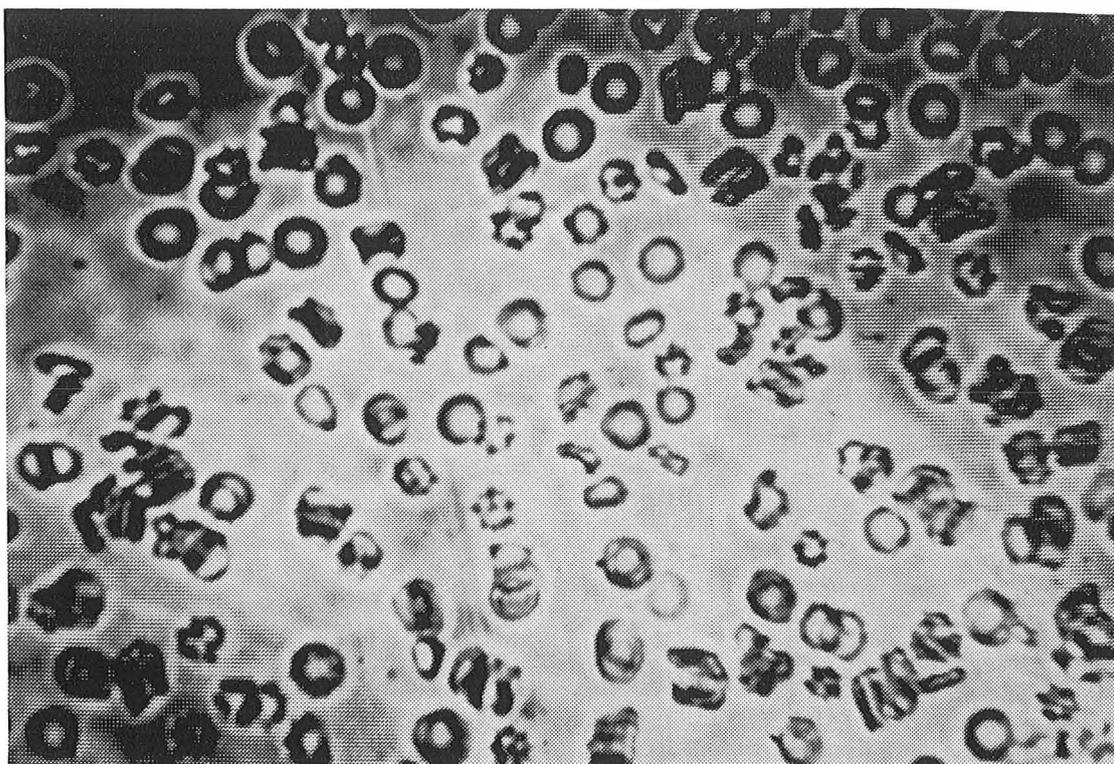


Figure 76 : Echinocytes dans l'échantillon comportant 20% V/V d'Iohexol .

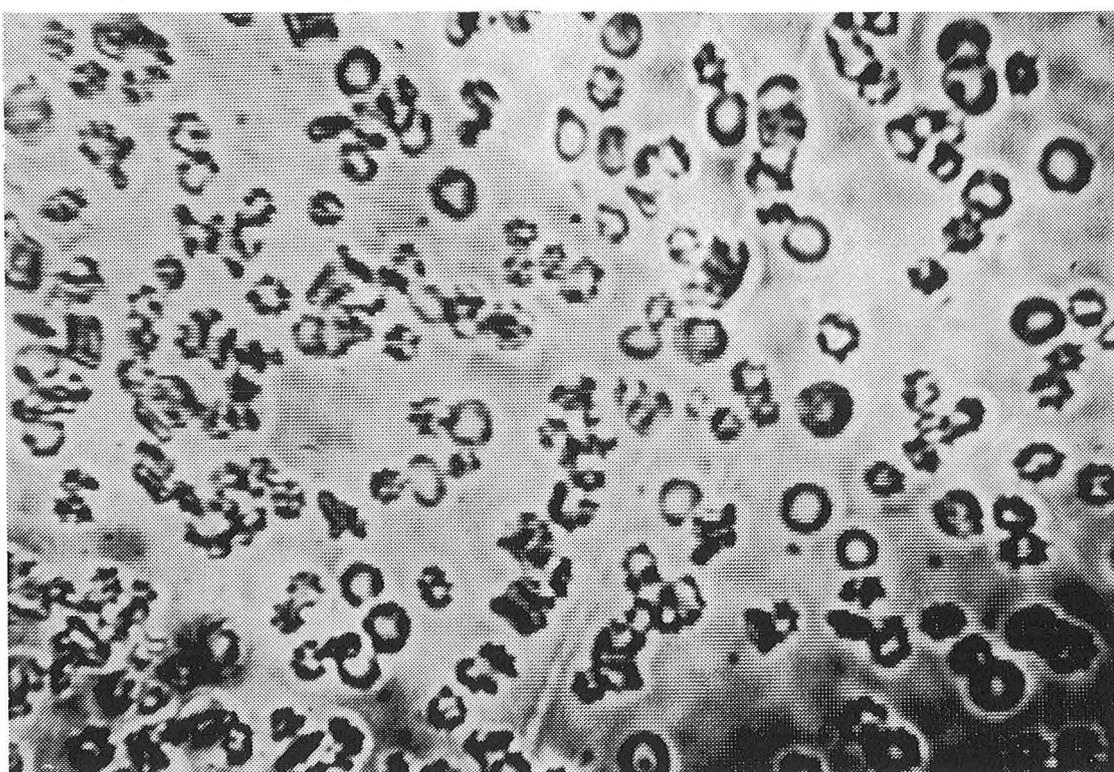


Figure 77 : Nombreux échinocytes dans l'échantillon comportant 20% V/V d'Iopamidol.

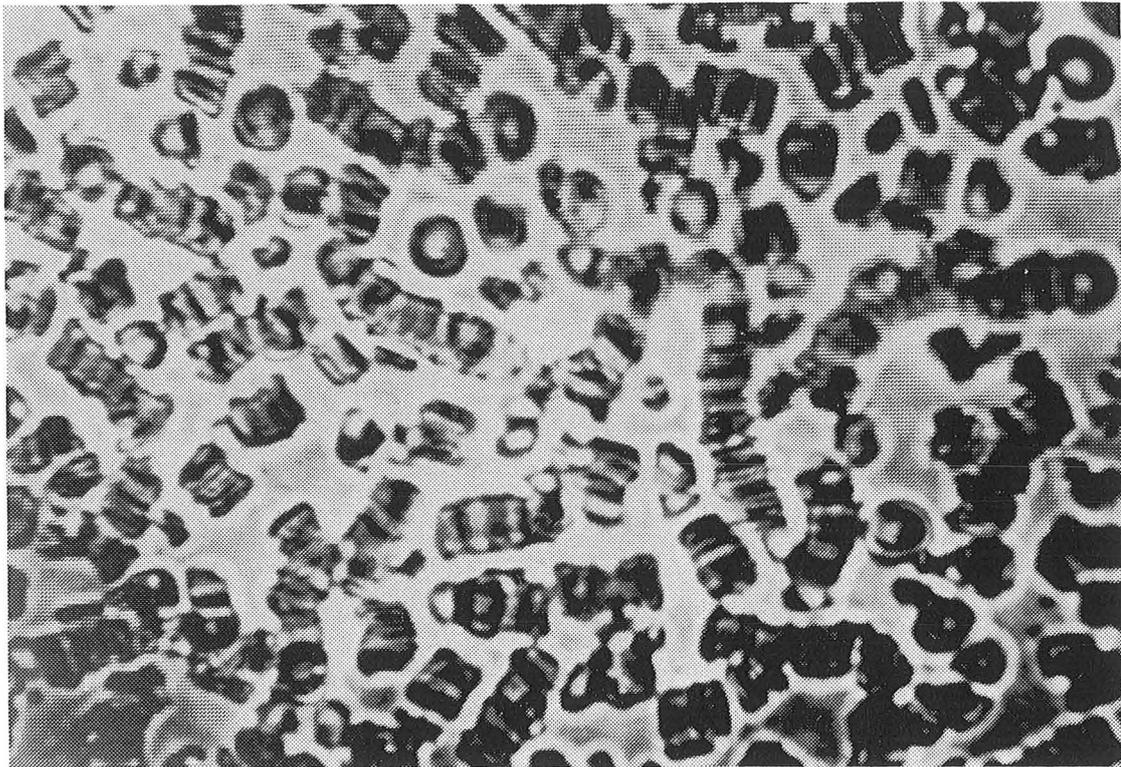


Figure 78 : Formation de rouleaux et de réseaux dans l'échantillon comportant 20 % V/V d'Ioxaglate

mOsmol/kg). C'est la raison pour laquelle du NaCl hyperosmolaire (642 mOsmol/kg) a été considéré comme témoin du produit de contraste ionique : l'ioxaglate (638 mOsmol/kg) et du Saccharose (674 mOsmol/kg) comme celui des produits de contraste non ioniques : L'Iopamidol (681 mOsmol/kg) et l'Iohexol (627 mOsmol/kg), afin de faire la part de l'osmolalité des propriétés intrinsèques des produits de contraste.

Il faut remarquer que les osmolalités des solutions de NaCl et de Saccharose ne sont pas identiques dans la série d'expériences préliminaires et les investigations avec les produits de contraste. Pour la première série d'expériences, nous nous étions basés sur les données de la littérature qui sont très variables et peuvent dépendre de la méthodologie et du système instrumental utilisé. Aussi, pour l'expérience avec les produits de contraste nous avons

déterminé l'osmolalité des produits de contraste avec un appareil et ajusté l'osmolalité des solutions témoins avec le même appareil.

Les résultats montrent que l'addition *in vitro* de produits de contraste entraîne des modifications notables de l'agrégation des hématies, les effets observés variant avec le type de produit utilisé. En ce qui concerne l'Ioxaglate, l'évolution de l'ensemble des paramètres traduit une augmentation régulière de l'agrégation des hématies avec la concentration de produit de contraste. Inversement, pour l'Iohexol et l'Iopamidol, les résultats vont dans le sens d'une diminution de l'agrégation des hématies, ces conclusions découlant des observations faites par rétrodiffusion laser et analyse d'image.

Il faut remarquer que la comparaison avec les échantillons témoins ne permet qu'une approche qualitative des mécanismes mis en jeu car, si les milieux suspendants présentent des osmolalités voisines, les viscosités sont différentes. Par conséquent, plusieurs hypothèses, prenant en compte l'osmolalité des produits de contraste, leur caractère ionique ou non ionique, ainsi que la viscosité des milieux suspendants, peuvent être avancées pour expliquer les résultats observés.

Pour l'Iohexol et l'Iopamidol, à une exception, les différences observées entre les échantillons témoins et ceux comportant des produits de contraste, sont non significatives et ceci en dépit de différences importantes au niveau de la viscosité du milieu suspendant (2,49 mPa.sec versus 1,33 mPa.sec pour 50% d'Iohexol et de Saccharose respectivement). On peut donc conclure que la diminution de l'agrégation des hématies observée avec l'Iohexol et l'Iopamidol peut être attribuée au caractère hyperosmolaire des produits de contraste, le rôle éventuel de la viscosité étant compensé par un facteur encore inconnu qui diminuerait l'agrégation des hématies.

En ce qui concerne l'Ioxaglate, l'augmentation significative de l'agrégation des hématies par rapport au témoin hyperosmolaire suggère que l'osmolalité et la viscosité ont un rôle mineur dans ce phénomène. Cette augmentation très importante de l'agrégation des hématies pourrait être liée à une interaction particulière de la molécule d'Ioxaglate avec la membrane de l'hématie.

III - 4

INTERACTIONS DES PRODUITS DE CONTRASTE AVEC LA MEMBRANE DES ERYTHROCYTES

I. INTRODUCTION

Le rôle différent des produits de contraste ionique et non ioniques sur l'agrégation des hématies nous a conduit à penser que l'interaction de ces produits au niveau de la membrane érythrocytaire pouvait être différente. La mesure de la fluorescence émise par des sondes lipophiles incorporées dans les membranes biologiques pourrait fournir des informations globales sur des modifications membranaires à la suite de l'interaction des éléments exogènes que sont les produits de contraste (65). De plus, les atomes d'iode présents dans les produits de contraste sont des inhibiteurs reconnus de la fluorescence et ce phénomène peut être mis à profit pour étudier l'interaction des produits de contraste avec la membrane érythrocytaire. C'est pourquoi une investigation de l'inhibition de la fluorescence par l'iode contenu dans le noyau benzénique des produits de contraste a été entreprise à l'aide de sondes fluorescentes lipophiles incorporées dans des régions différentes des membranes.

II. FLUORESCENCE ET INHIBITION DE FLUORESCENCE

II.1. Origine du Phénomène de Fluorescence

Certaines molécules possèdent la propriété d'émettre de la lumière lorsqu'elles reçoivent un rayonnement. Ce phénomène est appelé fluorescence.

Deux phénomènes complémentaires doivent donc se succéder pour qu'il y ait apparition de fluorescence :

- absorption du rayonnement
- émission d'énergie lumineuse sous forme de fluorescence

II.2 Absorption

L'absorption correspond à la "collision" d'un photon avec les électrons périphériques d'une molécule, ce qui entraîne la promotion d'un électron dans une orbitale inoccupée tel que l'énergie qui la sépare de l'état fondamental correspondant à l'énergie minimale représente l'énergie du photon. Les autres états, d'énergie supérieure, sont dits états excités.

II.3. Emission de fluorescence

L'émission de fluorescence correspond à un processus de relaxation radiative des molécules excitées entre états de même multiplicité après conversions internes. L'intensité de fluorescence est une fonction du temps et peut s'exprimer ainsi :

$$I_f = I_0 \times e^{-t/\tau}$$

avec I_0 : I_f au temps $t = 0$ et τ : durée de vie d'une molécule excitée.

II.4. Inhibition de fluorescence

L'inhibition de fluorescence est liée à un certain nombre de processus qui inhibent la fluorescence d'une substance, en particulier les réactions à l'état excité, le transfert d'énergie, la formation de complexes ou l'inhibition statique et l'inhibition collisionnel ou inhibition dynamique. Les phénomènes d'inhibition statique et dynamique requièrent un contact moléculaire entre le fluorochrome et l'inhibiteur. Dans le cas d'inhibition collisionnel, l'inhibiteur doit diffuser vers le fluorophore durant la durée de vie de l'état excité. A la suite du contact, le fluorochrome retrouve l'état fondamental sans émission de photons. Dans le

cas de l'inhibition statique, un complexe est formé entre le fluorochrome et l'inhibiteur et ce complexe est non fluorescent. Par conséquent, les déterminations d'inhibition de fluorescence peuvent révéler l'accessibilité du fluorochrome vis à vis de l'inhibiteur.

L'inhibition collisionnel de fluorescence peut être décrit par l'équation de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

où F_0 et F sont les intensités de fluorescence en absence ou en présence d'inhibiteur, k_q la constante d'inhibition bimoléculaire, τ_0 la durée vie du fluorochrome en l'absence d'inhibiteur, Q est la concentration d'inhibiteur, K_D la constante d'inhibition de Stern-Volmer. Les résultats sont habituellement présentés sous la forme du rapport F_0/F en fonction de $[Q]$ parce que F_0/F est supposé être une fonction linéaire de la concentration en inhibiteur. Une représentation linéaire de Stern-Volmer indique généralement une classe unique de fluorochromes, tous également accessibles au inhibiteur. Si deux populations sont présentes, et que l'une n'est pas accessible au inhibiteur, alors la représentation de Stern-Volmer dévie de la linéarité vers l'axe des x.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Prélèvement des échantillons

Le sang est prélevé chez des donneurs adultes sains (CRTS, Nancy) sur ACD (Acide Citrique Anhydre 38 mM, Citrate de Sodium Dihydrate 80 mM, Glucose Anhydre 120 mM, 0,7 ml de ACD pour 5ml du sang).

III.2. Préparation des membranes d'hématies

5ml de sang prélevé sont traités suivant la méthode décrite par HEIDRICH et LEUTNER (91). Les érythrocytes sont lavés 3 fois dans 25ml de tampon phosphate 5mM pH8 contenant 0,15M de NaCl, puis on ajoute sur le culot 60ml de tampon phosphate 5mM pH8. La suspension est maintenue sous agitation magnétique pendant 20 minutes à 4°C. Les suspensions obtenues sont ensuite lavées 3-4 fois avec le même tampon à 20000g pendant 15 minutes jusqu'à ce qu'il n'y ait plus trace d'hémoglobine. Des membranes "refermées" sont obtenues selon la méthode décrite par HEVEN et SOLOMON (94). A un culot de membranes représentant un volume de 5ml, on ajoute une solution tamponnée comportant 100ml de tampon phosphate 5mM pH8, 3ml de KCl 3,3mM, 1ml de SO₄Mg 0,1M et on porte la suspension membranaire 1 heure à 37°C. La suspension de membranes isolées est ensuite ajustée à la concentration de 50 µg de protéines/ml.

III.3. Sondes fluorescentes

L'inhibition par l'iode de la fluorescence émise par deux sondes fluorescentes a été étudiée.

Ces deux sondes fluorescentes sont les suivantes(**Figure 79**) (63) :

- le DPH (1,6 diphényl-1,3,5-hexatriène) qui est localisé dans les régions membranaires hydrophobes;
- le TMA-DPH (1-[4-(triméthylamino) phényl]-6-phényl-1,3,5-triène) qui est un analogue cationique du DPH et se localise au niveau des têtes polaires des phospholipides.

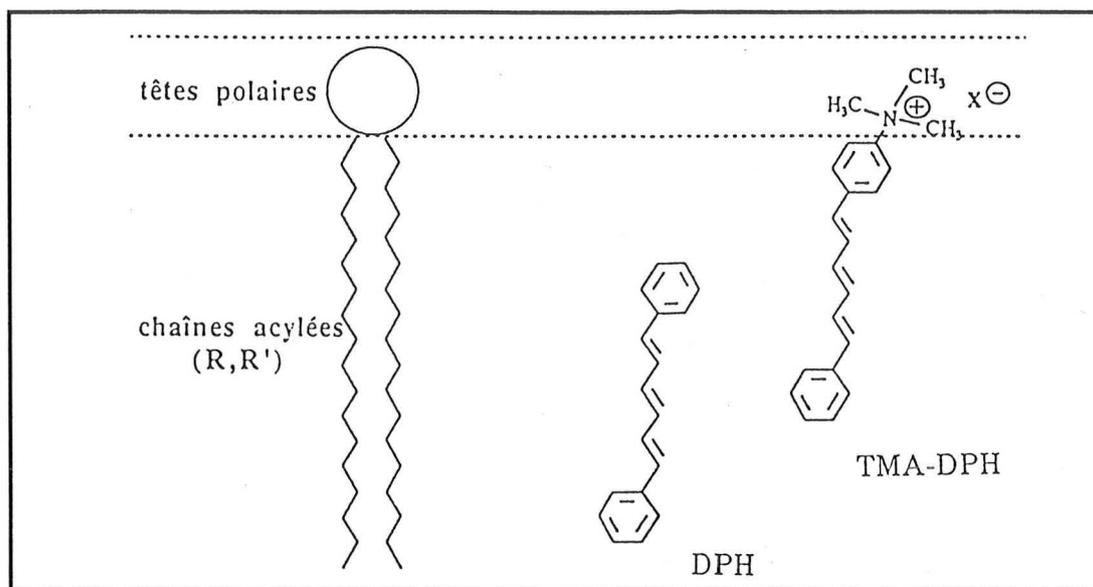


Figure 79 : Représentation de la localisation des sondes fluorescentes DHP et TMA-DPH dans la membrane.

Le DPH (Aldrich, Strasbourg, France) et le TMA-DPH (Molecular Probes, Eugene, Or, USA) sont dissous respectivement dans du tétrahydrofurane (THF) et du N,N-Diméthylformamide (DMF) à la concentration de 2×10^{-3} M. Ces solutions sont stockées dans le noir, à 4°C et renouvelées toutes les deux semaines. Pour le marquage, 3µl de ces solutions sont ajoutés à 3ml de suspensions membranaires à la concentration désirée.

III.4. Préparation des échantillons pour les mesures de fluorescence

Pour chaque échantillon, 0,75ml de milieu comportant les produits de contraste aux différentes concentrations ou les produits de référence aux mêmes concentrations ont été ajoutés à 2,25ml de suspension membranaire. La concentration finale en protéines est de 37,5µg/ml. Après addition des solutions de sondes fluorescentes, les échantillons sont incubés dans le noir à température ambiante pendant 10 minutes pour le TMA-DPH et 30 minutes pour le DPH.

III.5. Déterminations de fluorescence

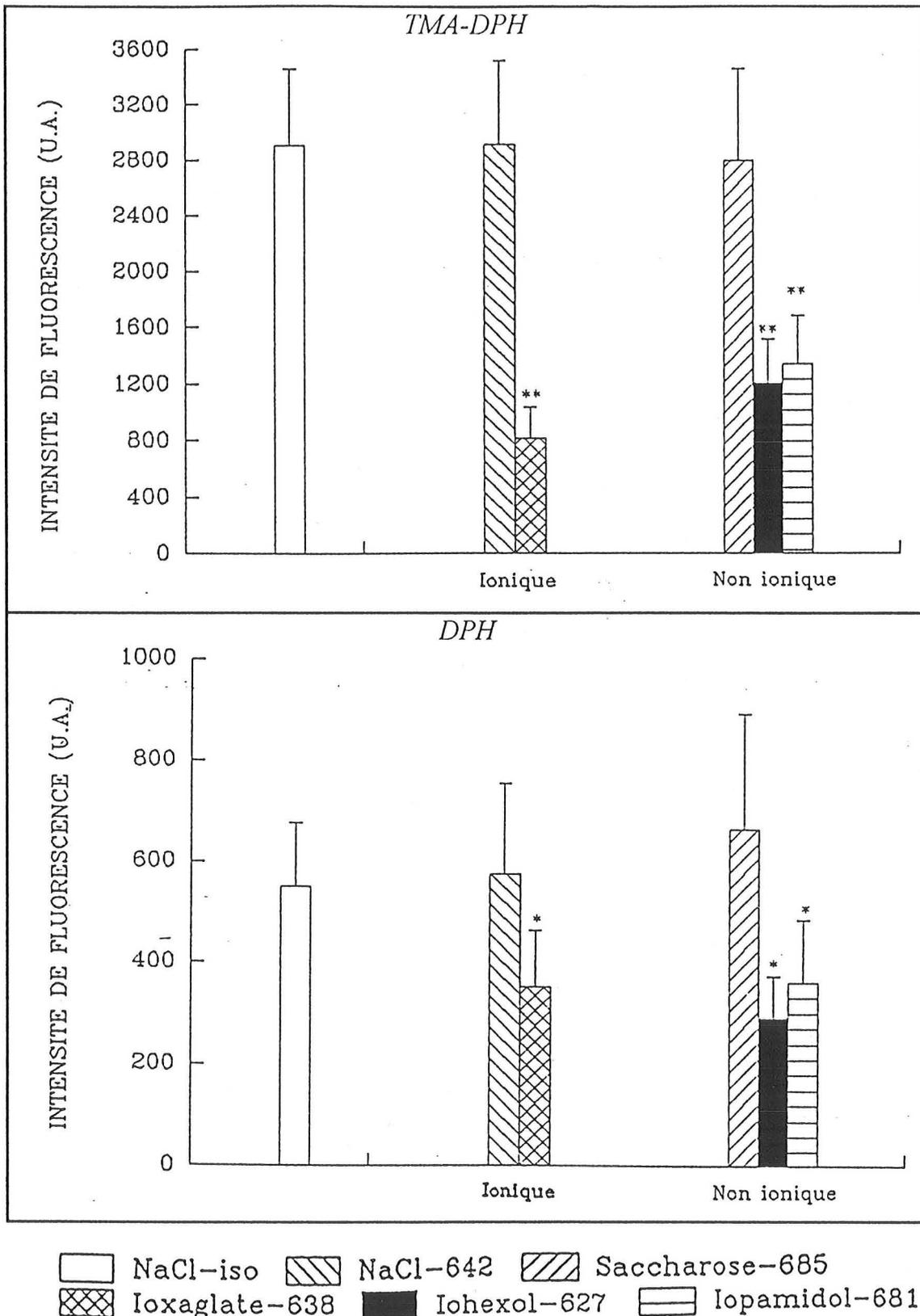
Les déterminations de fluorescence ont été effectuées à 25 °C avec un appareil de polarisation de fluorescence en excitation continu (Fluofluidimètre, Affibio, Villers les Nancy, France) Les paramètres fournis par cet appareil étant l'anisotropie de la fluorescence émise et l'intensité de la fluorescence émise. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires d'intensité de fluorescence (F) ainsi que sous la forme du rapport F_0/F où F_0 et F représente les intensités de fluorescence enregistrées en absence (F_0) et en présence (F) de produits de contraste ou de solutions de référence. L'intensité de fluorescence résiduelle en % est traduite par le rapport $(F/F_0) \times 100$.

IV. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm déviation standard. Les différences sont analysées par le test non paramétrique de rang de Wilcoxon. Les résultats sont jugés significatifs à $p < 0,05$.

V. RESULTATS

La Figure 80 illustre l'effet des trois produits de contraste (25% V/V) sur la fluorescence émise par les deux sondes TMA-DPH et DPH. Pour les deux sondes, on constate par rapport aux échantillons témoins d'osmolalité voisine une diminution significative de l'intensité de fluorescence lorsque les produits de contraste ont été ajoutés aux suspensions membranaires. Cependant, il existe des variations importantes selon la sonde fluorescente et le produits de contraste. Ainsi, pour le TMA-DPH, si l'intensité de fluorescence résiduelle est de 43% et 48% pour l'Iohexol et l'Iopamidol ($p < 0,01$), elle n'est que de 28% pour l'Ioxaglate ($p < 0,01$). Quant au DPH, l'intensité résiduelle est de 43% et



* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Figure 80 : Inhibition de la fluorescence émise par le TMA-DPH et le DPH par les produits de contraste (25% V/V). (n = 6).

54% pour l'Iohexol, l'Iopamidol ($p < 0,05$). Par contre, elle est plus élevée pour l'Ioxaglate (61%, $p < 0,05$).

Comme l'indique la **Figure 81**, l'inhibition de la fluorescence émise par les sondes apparaît proportionnelle à la concentration de produit de contraste. On peut remarquer sur la Figure que la présence de quantités croissantes de NaCl ou de Saccharose hyperosmolaires dans les groupes témoins contribue également à l'inhibition de la fluorescence émise par le DPH alors que cette contribution est nulle pour la fluorescence émise par le TMA-DPH.

La **Figure 82** représente les droites de Stern-Volmer en fonction de la concentration en Iode présent dans les différents produits de contraste. Nous avons observé que l'inhibition de la fluorescence du DPH est approximativement la même pour les trois produits de contraste. En revanche, elle est plus importante pour le TMA-DPH, l'Ioxaglate se différenciant nettement de l'Iohexol et de l'Iopamidol.

VI. DISCUSSION

Dans le cadre de ces expérimentations, il n'a pas été possible d'utiliser des hématies intactes avec des acides anthroxyloxy stéariques comme sondes fluorescents car la présence d'hémoglobine induit en elle même une forte inhibition de fluorescence. Par conséquent, l'addition de l'effet d'inhibiteur de l'iode résulterait en une perte pratiquement totale de la fluorescence. Ainsi, les expérimentations ont été effectuées sur des membranes isolées.

Les résultats obtenus avec les produits de contraste et les sondes fluorescentes TMA-DPH et DPH montrent une inhibition de fluorescence qui est une fonction linéaire de la concentration en produit de contraste. Par ailleurs, l'inhibition est fonction de la nature du produit de contraste et de la sonde fluorescente.

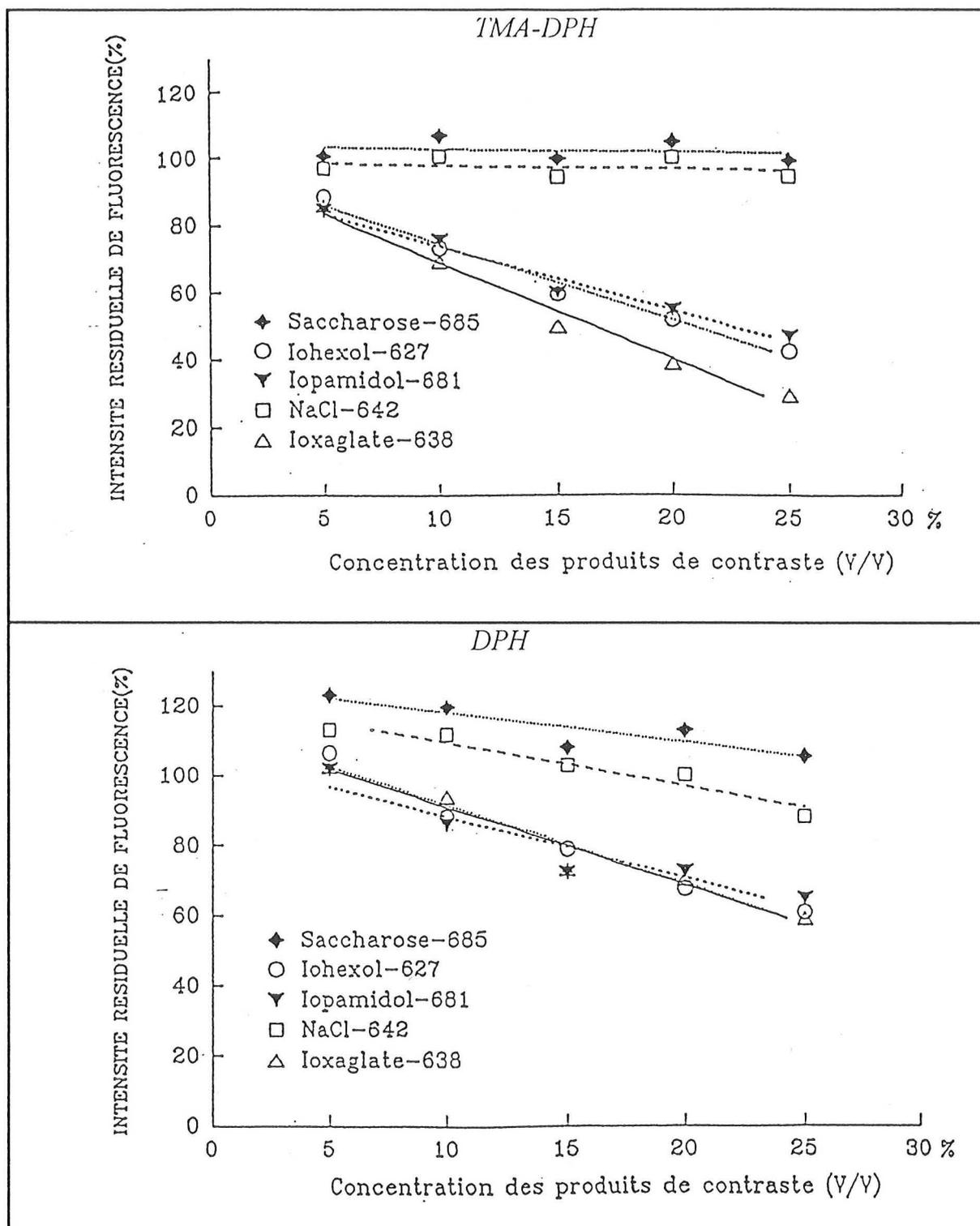


Figure 81: Inhibition de la fluorescence émise par le TMA-DPH et le DPH en fonction de la concentration en produits de contraste. Fo correspond à l'intensité de fluorescence observée avec du NaCl isotonique. (n = 3).

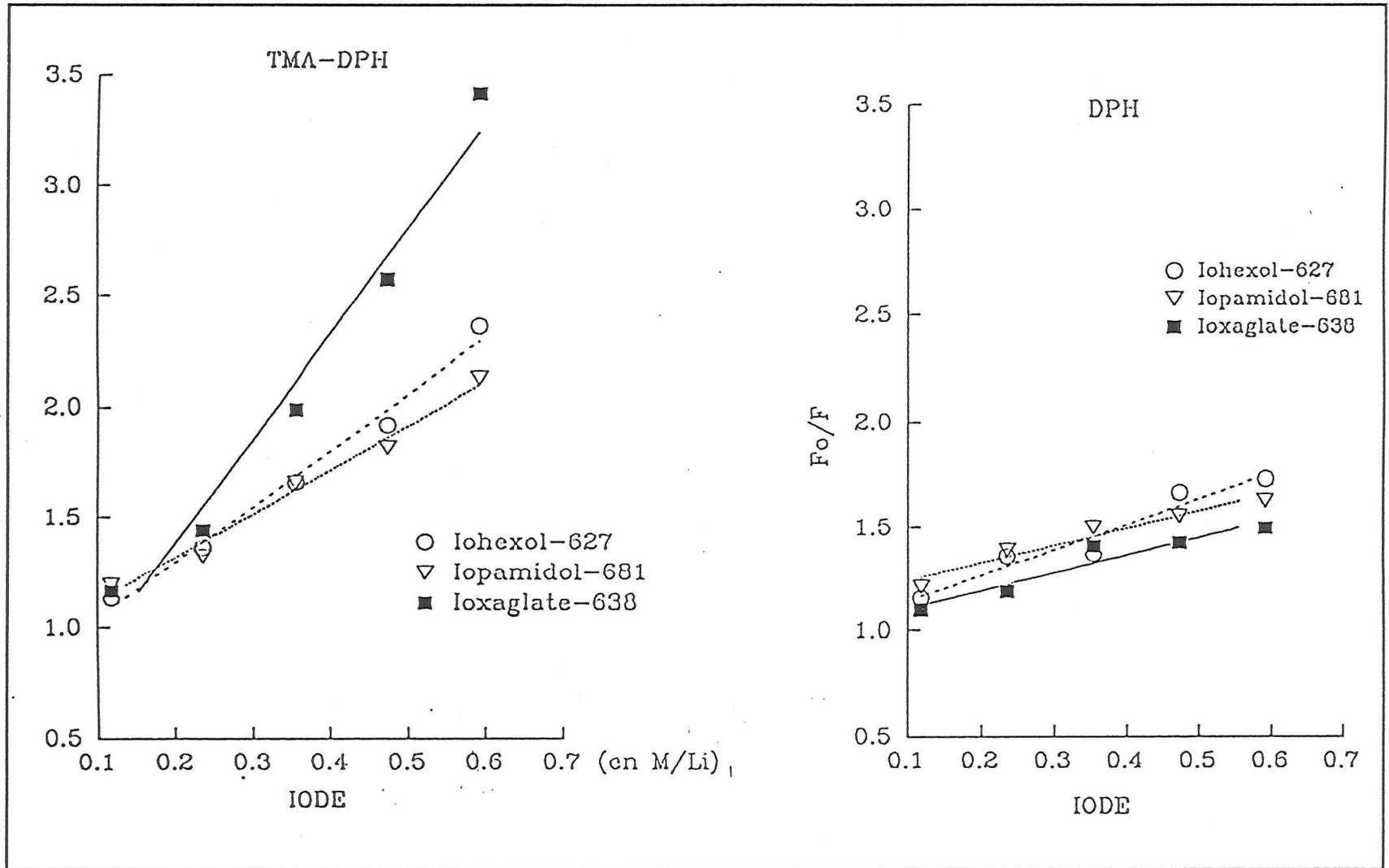


Figure 82 : Représentation des droites de Stern-Volmer pour le TMA-DPH et DPH en fonction de la concentration en Iode présent dans les différents produits de contraste. ($n = 3$)

Cette inhibition de la fluorescence est liée à l'iode présent dans les produits de contraste. Mais il est vraisemblable que les noyaux benzéniques des molécules participent également aux phénomènes observés.

L'importance de ce phénomène d'inhibition de fluorescence n'a pas permis de considérer le rôle des produits de contraste sur la cohésion lipidique membranaire (ou fluidité) qui aurait pu être approchée en déterminant l'anisotropie de la fluorescence émise par le TMA-DPH et DPH.

Toutefois, l'utilisation de ces deux sondes dont on sait qu'elles sont localisées dans des régions différentes des membranes et la seule considération des variations d'intensité de fluorescence en présence des produits de contraste ou des solutions de référence hyperosmolaires permet d'avancer des hypothèses sur l'interaction des produits de contraste avec la membrane érythrocytaire.

Une inhibition de la fluorescence du DPH et non du TMA-DPH est observée en présence de solutions témoins : NaCl et Saccharose hyperosmolaire avec un effet légèrement plus marqué pour le NaCl hyperosmolaire. On peut penser que l'osmolalité élevée de ces solutions provoque des changements dans les régions profondes des membranes et non dans les régions superficielles.

En ce qui concerne les produits de contraste, l'inhibition plus importante observée avec le TMA-DPH par rapport au DPH qui est localisé dans les régions plus profondes de la membrane, suggère que l'interaction des produits de contraste se situe principalement à proximité des régions superficielles de la membrane caractérisées par le TMA-DPH. D'autre part, les droites de Stern-Volmer montrent que l'interaction de l'Ioxaglate avec la membrane érythrocytaire est bien plus importante que celle de l'Iohexol ou de l'Iopamidol. Le caractère ionique de l'Ioxaglate pourrait favoriser cette interaction avec la membrane et ainsi être à l'origine de pontages macromoléculaires qui augmenteraient l'agrégation des hématies.

III - 5

EFFETS DES PRODUITS DE CONTRASTE SUR LA CHARGE ELECTRIQUE DE LA SURFACE CELLULAIRE

I. INTRODUCTION

La charge électrique négative de la surface de l'hématie se traduit par des forces répulsives dans le phénomène de l'agrégation érythrocytaire. La fixation éventuelle des produits de contraste sur la surface cellulaire peut entraîner des modifications de la charge électrique soit en masquant des charges électriques présentes sur la surface de l'hématie, soit en apportant des charges électriques en raison du caractère ionique de certains produits de contraste. Des modifications de la charge électrique de la surface cellulaire pourraient donc entraîner des variations de l'agrégation des hématies.

L'électrophorèse cellulaire est une méthode permettant l'investigation des propriétés biophysiques de la membrane cellulaire. Les résultats obtenus donnent des informations sur la charge électrique de la surface cellulaire. Par conséquent, une étude de l'effet des produits de contraste a été effectuée en utilisant la technique d'électrophorèse cellulaire, dans le but d'approfondir le mécanisme d'action des produits de contraste ionique et non ioniques au niveau de la charge de la surface cellulaire.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Approche Expérimentale de la Charge Electrique de Surface

Le système consiste en une cellule de mesure aux extrémités de laquelle sont placées des électrodes argent/chlorure d'argent dans un milieu constitué de chlorure de potassium (Figure 83). La cellule de mesure est un tube capillaire de rayon interne de 1,0 mm. Deux faces planes ont été taillées sur la surface externe aux deux extrémités d'un même diamètre. Elles constituent des "fenêtres optiques" qui permettent le repérage des cellules en suspension. L'épaisseur du verre entre la face interne du tube et la surface plane taillée depuis l'extérieur du tube est inférieure à 100 microns. Lorsque la chambre est remplie avec une suspension de cellules ou de particules, la migration des cellules sous l'influence d'un champ électrique peut être observée au moyen d'un microscope dans des conditions strictement définies. Un réticule préalablement étalonné est monté dans l'oculaire du microscope et permet de déterminer la vitesse de migration de chaque cellule. Les expérimentations sont effectuées à tension constante (50 volts aux bornes de la chambre d'électrophorèse) et à une température de 25°C. La vitesse atteinte dépend du champ électrique, de la viscosité, de la force ionique de la suspension et de la charge de surface des particules.

Le paramètre déterminé est la mobilité électrophorétique (μ) exprimée en microns par seconde et par volt par cm.

A 25°C, en milieu NaCl isotonique 0,145 M, la mobilité électrophorétique des hématies humaines normales est considérée comme un standard et est égale à $-1,08 \pm 0,03 \mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{cm}$.

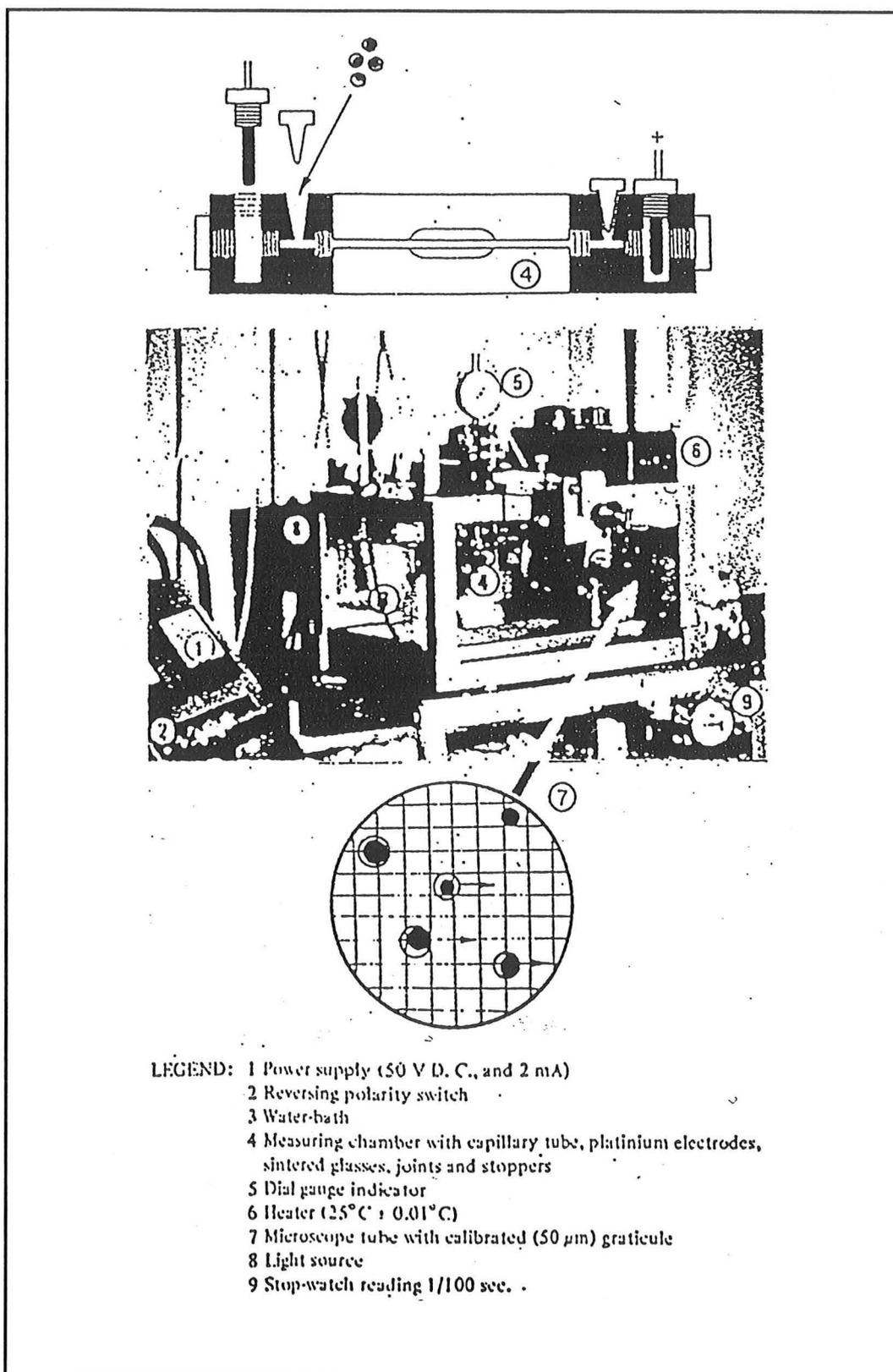


Figure 83 : Représentation schématique de la cellule d'électrophorèse cellulaire.

II.2. Préparation des échantillons

Les hématies sont lavées trois fois dans du NaCl 0,145M ajusté à pH 7,2 avec CO_3HNa et resuspendues après le dernier lavage dans le milieu comportant du NaCl 0,145M et une fraction définie (10%) de produit de contraste ou de solution de référence. La concentration cellulaire est ajustée à 10^6 cellules/ml et les déterminations de mobilité sont effectuées à 25°C.

3 types d'échantillons témoins ont été envisagés :

- 1) NaCl isotonique
- 2) Saccharose 685 milliosmoles/kg, témoin de l'Iopamidol et de l'Iohexol
- 3) NaCl 645 milliosmoles/kg, témoin de l'Ioxaglate

III. RESULTATS

Pour chaque échantillon, les suspensions d'hématies ne comportant qu'une seule population en terme de charge électrique de surface, la mobilité électrophorétique d'un minimum de 40 cellules a été déterminée.

Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau XI** et la **Figure 84** pour les caractéristiques électrocinétiques des différents échantillons et dans le **Tableau XII** en ce qui concerne la viscosité des milieux suspendants.

Tableau XI. Effet des produits de contraste sur la mobilité électrophorétique des hématies à 25°C. (n=5)

Nature de l'échantillon	Mobilité électrophorétique des hématies en $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{cm}\pm\text{déviation standard}$
NaCl isotonique	1,12 \pm 0,02 (2,40mA)
Saccharose-685 mOsmol/kg	1,07 \pm 0,04 (2,10mA)
Iopamidol	1,06 \pm 0,03 (2,02mA)
Iohexol	1,00 \pm 0,02 (2,00mA)
NaCl-642 mOsmol/kg	1,06 \pm 0,05 (2,65mA)
Ioxaglate	0,96 \pm 0,04 (2,20mA)

* Les chiffres entre parenthèses sont les intensités enregistrées lors de l'électrophorèse avec une tension constante de 50 volts aux bornes de la chambre d'électrophorèse.

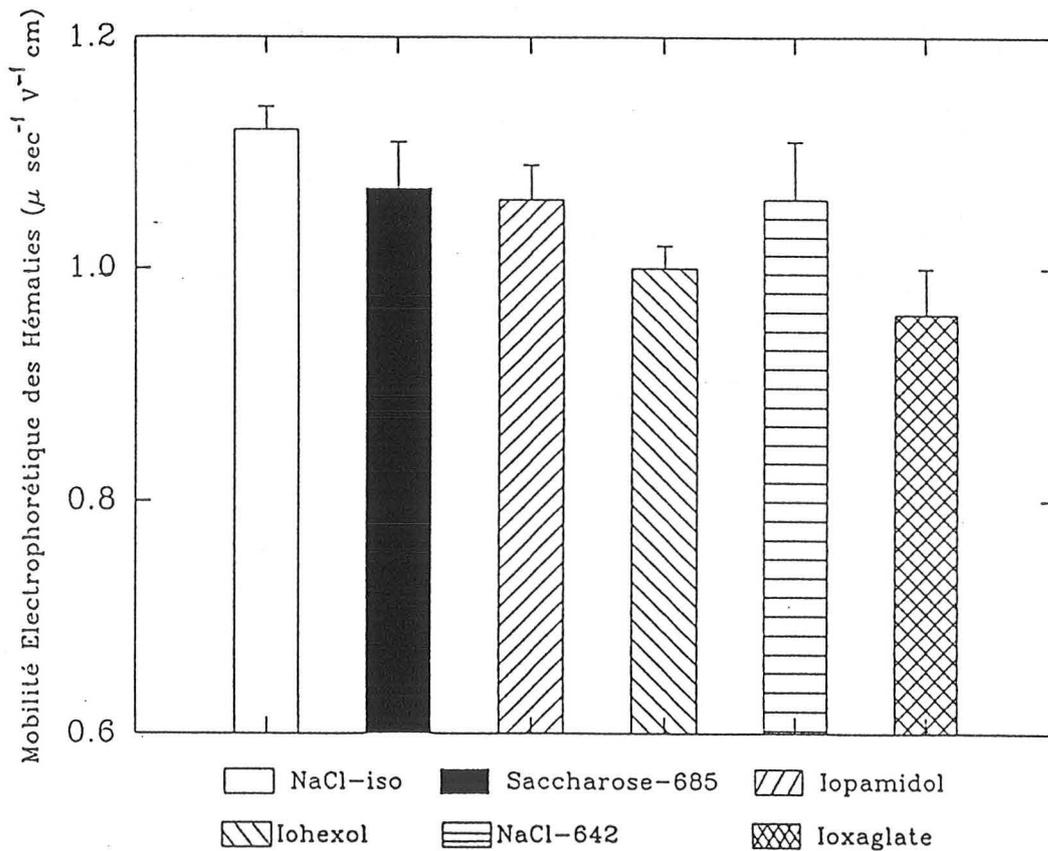


Figure 84 : Effet des produits de contraste sur la mobilité électrophorétique des hématies à 25°C. (n=5)

Tableau XII. Densité et viscosité des milieux suspendants

Nature de l'échantillon	Densité du milieu suspendant* en g/cm ³	Viscosité en cStokes	Viscosité en mPa.sec.
NaCl- isotonique	1,003	0,90	0,903
Sacch-685 mOsmol/kg	1,009	0,93	0,939
Iopamidol	1,029	1,00	1,029
Iohexol	1,030	0,99	1,019
NaCl-642 mOsmol/kg	1,003	0,92	0,923
Ioxaglate	1,027	0,97	0,996

**La densité et la viscosité ont été déterminées sur les mélanges NaCl isotonique + 10% de solution de référence ou NaCl isotonique + 10% de produits de contraste utilisés pour les déterminations de mobilité électrophorétique.*

On constate que la présence de Saccharose ou de NaCl hypertonique entraînent une diminution de la mobilité électrophorétique par comparaison avec les échantillons témoins constitués par du NaCl isotonique.

Par rapport aux solutions de références, l'Iopamidol ne semble pas altérer la mobilité électrophorétique des hématies. Par contre, elle est diminuée pour l'Iohexol et l'Ioxaglate, les valeurs les plus faibles étant enregistrées pour l'Ioxaglate.

Il faut remarquer que les milieux dans lesquels sont suspendus les hématies présentent des viscosités différentes ainsi qu'une force ionique variable comme (Tableau XII) en témoigne les valeurs des intensité enregistrées lors de l'électrophorèse (Tableaux XI).

IV. DISCUSSION

Les résultats montrent que l'interaction des produits de contraste avec les hématies entraîne une diminution de la mobilité électrophorétique des hématies, en particulier avec l'Ioxaglate.

Toutefois, il n'est pas possible, à partir des seules données de mobilités électrophorétiques, d'interpréter les résultats, en termes de variations de la charge électrique de la surface cellulaire. En effet, les solutions de produits de contraste présentent des viscosités différentes. Par ailleurs, des variations de la force ionique des milieux suspendants sont liées au caractère ionique ou non ionique des solutions de référence ou des produits de contraste. Or ces deux paramètres, viscosité et force ionique jouent un rôle sur la mobilité électrophorétique et par conséquent sur le potentiel zêta. Le calcul du potentiel zêta à partir des déterminations de mobilité électrophorétique peut être effectué suivant l'équation de Von Smoluchowski avec:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{D} \mu$$

ou η et D sont la viscosité et la constante diélectrique du milieu suspendant et μ la mobilité électrophorétique exprimée en $\mu\text{m}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{cm}$.

En fait, le potentiel zêta étant proportionnel au produit viscosité x mobilité ($\eta \times \mu$) et la mobilité électrophorétique diminuant lorsque la viscosité augmente (toutes choses égales par ailleurs), il nous a paru intéressant de représenter les variations du produit $\eta \times \mu$ (afin de prendre en compte le facteur viscosité) en fonction de la force ionique du milieu suspendant.

Les résultats sont rassemblés sur la **Figure 85**. En prenant comme référence l'évolution de $\eta \times \mu$ pour les solutions témoins en fonction de la force ionique, on peut avancer l'hypothèse que l'Iohexol n'a pas d'effet sur la charge électrique de la surface

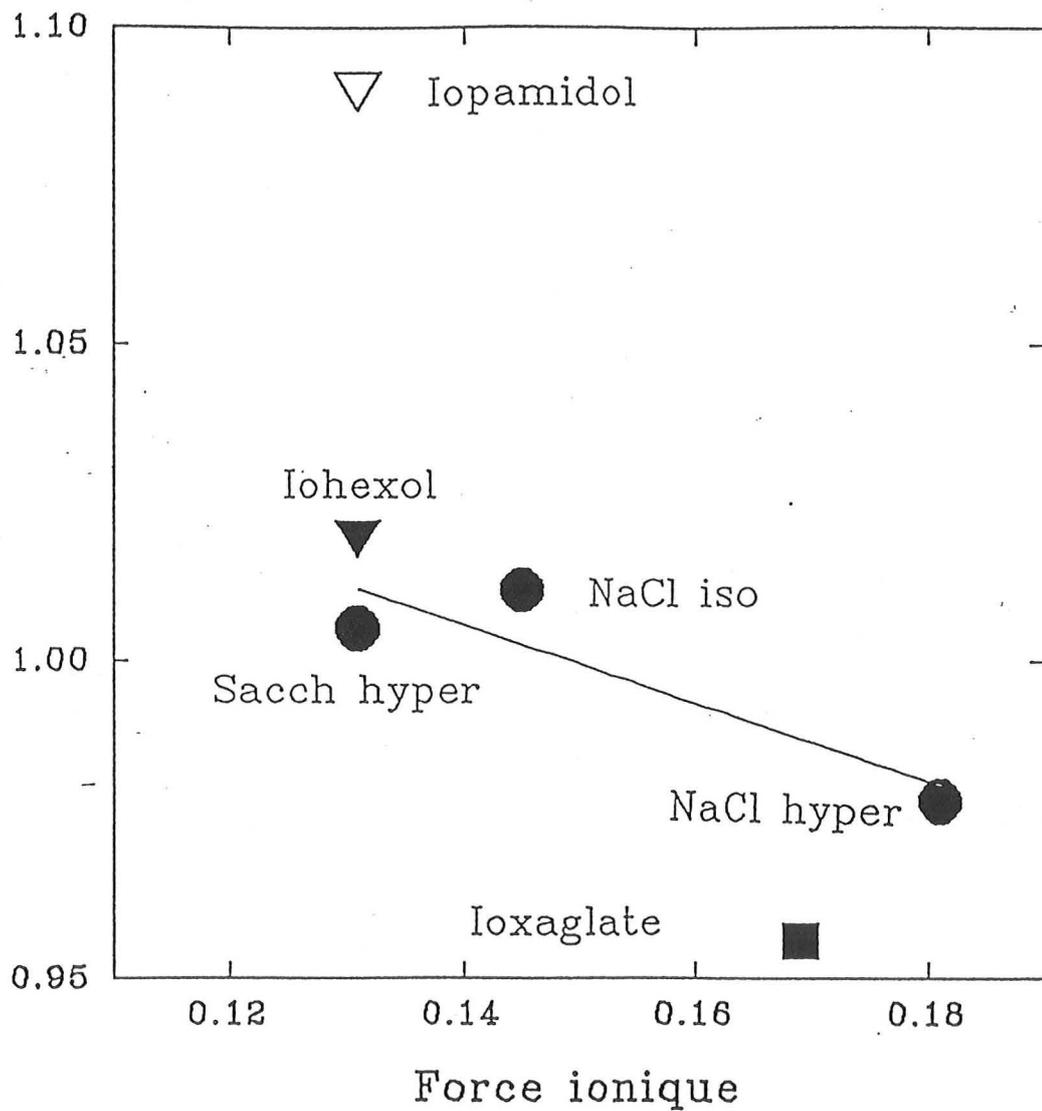


Figure 85 : Variation de η_{sp}/c en fonction de la force ionique du milieu suspendant.

cellulaire. Par contre, l'Iopamidol aurait tendance à augmenter la charge de surface et l'Ioxaglate à la diminuer.

Il est surprenant de constater que les produits de contraste non ioniques n'ont pas le même effet sur la charge de surface. Néanmoins, ces résultats peuvent être dus au fait que les chaînes greffées sur le noyau benzénique sont différentes.

En ce qui concerne l'Ioxaglate qui est un dimère ionique, on peut penser que l'adsorption de ce produit de contraste sur la surface de l'hématie peut masquer des charges préexistantes et négatives, et que le masquage de ces charges ne sera pas compensé par les charges apportées par l'Ioxaglate. Une autre hypothèse serait que ces charges électriques apportées par l'Ioxaglate ne sont pas spatialement distribuées de la même façon par rapport à la surface cellulaire.

III - 6

CONCLUSIONS SUR LES EFFETS DES PRODUITS DE CONTRASTE SUR L'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE

L'étude entreprise a montré que l'effet des produits de contraste sur l'agrégation érythrocytaire variait de façon importante avec la nature du produit. Si la vitesse de formation des rouleaux décroît avec la concentration relative des produits de contraste monomères non ioniques, l'effet inverse est observé avec le produit de contraste dimère ionique. Il en est de même pour les vitesses de cisaillement nécessaires à la dissociation des rouleaux d'hématies qui augmentent ou diminuent selon la nature (ionique ou non ionique) du produit de contraste, respectivement.

L'effet des produits de contraste sur l'agrégation des hématies peut dépendre de nombreux facteurs : la viscosité, l'osmolalité et le caractère ionique et non ionique des molécules.

En ce qui concerne la viscosité, les différents milieux utilisés présentent pour des concentrations identiques de produits de contraste des valeurs voisines de viscosité. Par conséquent, on ne peut pas attribuer à ce paramètre les différences observées entre les produits de contraste.

Pour l'osmolalité, on peut arriver à une conclusion similaire. En effet, un des deux monomères non ioniques (Iohexol) et le dimère ionique (Ioxaglate) présentent des osmolalités voisines et ont toutefois un effet différent sur l'agrégation des hématies.

En revanche, le caractère ionique et non ionique des molécules ainsi que les différences dans la masse moléculaire peuvent jouer un rôle sur l'effet des produits de contraste. Les investigations en fluorescence suggèrent que l'Ioxaglate présente une interaction importante avec la surface cellulaire provoquant en particulier une diminution de la charge électrique de la surface cellulaire.

La seule diminution des forces répulsives entre hématies peut augmenter l'agrégation des hématies. De plus, la masse moléculaire importante du dimère ionique pourrait en modifiant la surface cellulaire favoriser les pontages inter-hématies.

En ce qui concerne les monomères non ioniques, la mise en évidence d'échinocytes et des cellules déformées dans les suspensions sanguines en présence de ces produits de contraste permet d'expliquer l'inhibition de l'agrégation des hématies. L'altération morphologique des hématies peut être en relation avec une interaction des monomères non ioniques avec les régions profondes de la membrane érythrocytaire. En effet, les expérimentations d'inhibition de fluorescence laissent à penser que les molécules de produits de contraste pénètrent dans les membranes. Toutefois, si les droites de Stern-Volmer observées pour le DPH sont pratiquement identiques pour les trois produits de contraste étudiés, à concentration d'iode identique, on a deux fois plus de molécules de monomère non ionique que de dimère ionique. Une présence importante de molécules non ioniques dans les membranes pourrait entraîner des altérations de la morphologie érythrocytaire et affecter les fonctions érythrocytaires.

Il faut noter que les altérations morphologiques des hématies sont peu observées avec le dimère ionique ce qui pourrait être un élément supplémentaire expliquant l'effet agrégant de ce produit.

Ces résultats ont été observés dans un milieu comportant des quantités définies d'albumine, de fibrinogène et d'Immunoglobulines. Il est possible que les produits de contraste présentent une interaction non seulement avec les membranes des hématies mais, également avec les protéines plasmatiques responsables de l'inhibition ou de l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire.

Dans ce cas, il serait indispensable de vérifier si la modulation des quantités respectives des protéines majeures de l'agrégation peut avoir une incidence sur l'action des produits de contraste.

CONCLUSION

Pour ce travail, nous avons mis en oeuvre des étapes multidisciplinaires nécessaires à l'étude du mécanisme d'action de molécules exogènes sur l'agrégation érythrocytaire.

La première étape a porté sur deux études de type informatique menées dans le but d'améliorer la qualité des informations fournies par des méthodes optiques et microscopiques sur l'agrégation érythrocytaire.

Dans un premier temps, nous avons été amené à étudier l'intérêt d'un logiciel permettant l'étude de l'agrégation en régime pulsé, ce type d'écoulement se rencontrant "*in vivo*". Le logiciel était associé à un système d'analyse de l'agrégation érythrocytaire par rétrodiffusion laser préalablement conçu pour soumettre les hématies à un cisaillement continu.

De notre étude, il ressort qu'un régime pulsé induit par rapport à un écoulement continu des variations de la cinétique de formation des rouleaux pour des cisaillements inférieurs à 30 sec^{-1} . Par ailleurs, la fréquence du régime pulsé semble jouer un rôle sur le caractère agrégant ou désagrégant du régime pulsé. Toutefois, les différences entre les paramètres caractérisant la cinétique d'agrégation en régime continu et pulsé sont peu importantes. Par ailleurs, la vérification des hypothèses avancées sur la signification des variations observées en régime pulsé par rapport au régime continu nécessite une modélisation des phénomènes observés

Dans un deuxième temps, nous avons envisagé une quantification de l'approche de la morphologie des rouleaux et agrégats d'hématies lors de leur formation. Dans ce but, nous avons utilisé un rhéoscope que nous avons couplé à un système informatique équipé d'un logiciel de traitement d'images (JAVA, Jandel Scientific). Après avoir adapté ce logiciel à la détermination de l'agrégation des hématies, nous avons étudié ses potentialités. Il résulte des investigations entreprises, qu'en dépit d'un artefact introduit dans le calcul du paramètre

d'agrégation, le traitement des images présente une bonne reproductibilité. Le paramètre choisi pour caractériser l'agrégation des hématies permet la mise en évidence de degrés différents d'agrégation et pourrait apporter des informations supplémentaires par rapport aux paramètres de l'analyse de la diffusion laser.

Toutefois, pour donner au traitement d'image tout son intérêt, la résolution tridimensionnelle des images devrait être abordée. Des travaux récents dans d'autres systèmes biologiques laissent à penser que ces projets pourraient être concrétisés prochainement.

La deuxième étape de ce travail a été l'étude du mécanisme d'action des produits de contraste ionique et non ioniques au niveau des hématies. Ces produits utilisés à des fins diagnostiques pour visualiser les tissus lors d'examens radiologiques peuvent entraîner des réactions secondaires dont la nature fait penser à un impact rhéologique des produits de contraste.

Cette partie de notre travail a comporté les approches méthodologiques rhéologiques classiques pour caractériser en particulier l'agrégation des hématies mais également des approches spectroscopiques et biophysiques.

Les différentes investigations ont montré que l'effet des produits de contraste sur l'agrégation des hématies variait de façon importante avec la nature ionique ou non ionique du produit. Un effet légèrement hypoagrégant a été observé pour les produits de contraste monomères non ioniques (l'Iohexol et l'Iopamidol). Inversement, une augmentation significative de l'agrégation érythrocytaire a été constatée pour un dimère ionique (l'Ioxaglate). La technique d'analyse d'image a confirmé les résultats obtenus par rétrodiffusion laser. Des investigations en fluorescence en utilisant l'inhibition de l'iode contenu dans les milieux de contraste ont montré que les interactions des produits de contraste ionique et non ioniques avec les régions superficielles et profondes de la membrane

étaient différentes. La mesure de la charge électrique de surface par électrophorèse cellulaire a révélé une diminution de la charge électrique après interaction des hématies avec le produit de contraste ionique. Ces résultats pourraient expliquer l'augmentation de l'agrégation des hématies observée avec le produit de contraste ionique.

L'agrégation érythrocytaire est un phénomène physiologique. Le fait qu'elle soit augmentée par le produit de contraste ionique ne représente pas un élément pouvant expliquer d'éventuelles réactions secondaires. Il faut noter que dans le cas du produit de contraste ionique, la morphologie des hématies est peu modifiée alors que des altérations très importantes sont observées avec les monomères non ioniques. Une modification des fonctions érythrocytaires pourrait en résulter et l'exploration au niveau moléculaire de ces fonctions pourrait apporter des éléments supplémentaires aux conclusions de notre travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. **ADAIR G.S.** The osmotic pressure of hemoglobin in the absence of salts. Proc Roy Soc, 1925, 109A : 292-300.
2. **ANDERSON R.A., MARCHESI V.T.** Regulation of the association of membrane skeletal protein 4.1 with glycophorin by a polyphosphoinositide. Nature, 1985, 318 : 295-298.
3. **ANDRE J.C., DONNER M.** Mouvements de translation dans les membranes biologiques. Dans : Techniques Avancées en Hémoreologie 2^e Congrès Institut National Polytechnique de Lorraine Université de Nancy, M.L. Viriot, J.C, André, M. Lucius, J.F. Stoltz eds., DPIC-INPL Ed., 1983, 361-401.
4. **ASAKURA S., OOSAWA F. J.** On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. Chem. Phys., 1954, 22 : 1255-1256.
5. **ASPELIN P., SCHMID-SCHÖNBEIN H.** Effect of ionic and non ionic contrast media on red cell aggregation in vitro. Acta Radiol Diagn., 1978, 19 : 766-784.
6. **ASPELIN P., BRIKA A., ALMEN T., KIESEWETER H.** Effect of iohexol on human erythrocytes. II Red cell aggregation in vitro. Acta Radiologica, 1980, 362 : 123-126.
7. **ASPELIN P., SCHMID-SCHÖNBEIN H., MALOTTA H.** Do nonionic contrast media increase red cell aggregation and clot formation? Invest Radiol, 1988, 23 (Suppl. 2) : 326-333.
8. **AUCLERC G.** Dans : Hématologie, G.Auclerc ed., Maloine S.A. 1980, 240p.
9. **BABACAR A.T.** Agrégation érythrocytaire par le fibrinogène : Comparaison entre les globules rouges humains et bovins. Thèse de doctorat de l'université Paris VII, 1988.
10. **BAUERSACHS R.M., WENBY R.B, MEISELMAN H.J.** An automated system for the determination of specific red blood cell aggregation parameters. Clin Hemorheol, 1987, 7 : 431.
11. **BAUMLER H., DONATH E., PRATSCH L., LERCHE D.** Aggregation and disaggregation of human red blood cells in neutral polymer electrolyte solutions. Dans : Hémoreologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz, M. Donner et A.L. Copley eds., E. M. I.; 1989, 3 : 24-37.
12. **BERLING C., HALL C.D.** RBC aggregation by nuclear magnetic resonance. Dans : Hémoreologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz, M. Donner et A.L. Copley eds., E M I., 1989, 3 : 78-84.
13. **BERNARD S.M.D., JULIO C.U., COMLHO M.D., M.S., STANLEY G., SCHADE M.D., JEFFERY J., DIMITRIOS G.** Effect of plasma protein and temperature on echogenicity of blood. Invest. Radiol, 1982, 7 : 29-33.
14. **BESSIS M.** Dans : Cellules du sang (normal et pathologie), M. Bessis ed., Masson, (Paris) 1972, 815p.

15. **BOISSEAU M.R.** Microcirculation and microrheology. Dans : *Microcirculation*, M.R. Boisseau ed., John Libbey Eurotexte, Paris, 1992, 1-20.
16. **BOYNARD M., LELIEVRE J.C.** Approche de l'agrégation érythrocytaire par méthode ultrasonore. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz ed. E.M.I., 1988, 2 : , 95-101.
17. **BOYNARD M., LELIEVRE J.C., GUILLET R., HAMM E.** Ultrasonic evaluation of red blood cell aggregation size a stationary flow. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz, M. Donner et A.L. Copley eds., E. M. I., 1989, 3 : , 65-70.
18. **BRANEMARK P.I.** Intracapillary rheological phenomena. Dans : *Proc. 4. Internal. Congr. Rheology*, Providence, R.I., USA, 1963, Part 4. Symposium on Biorheology. A.L. Copley ed., New York, London, Interscience Publ., John Wiley et Sons, 1965, 459-473.
19. **BRANEMARK P.I.** Rheological aspects of flow states. Dans : *Microcirculation as Related to Shock*, D. Shepro et G.P. Fulton eds., New York, London, Academic Press, 1968, 161-180.
20. **BRETSCHER I.S.** Mammalian plasma membrane. *Nature*, 1975, 258 : 43-49.
21. **BROOKS D.E., SEAMAN G.V.F.** Role of mutual cellular repulsions in the rheology of concentrated red blood cell suspensions. Dans : *Theoretical and Clinical Hemorheology*, H.H. Hartet and A.L. Coley eds. Springer Verlag, Berlin, New York, 1971, 127-135.
22. **BROOKS D.E.** The effect of neutral polymers on the electrokinetic potential of cells and other charged particles. IV-Electrokinetic effects in dextran mediated cellular interactions. *J. Colloid Interface Sci.*, 1973, 43 : 714-726.
23. **BROOKS D.E., GOODWIN J.W., SEAMAN G.V.F.** Rheology of erythrocyte suspensions : eletrostatic factors in the dextran-mediated aggregation of erythrocytes. *Biorheology*, 1974, 11 : 69-77.
24. **BROOKS D.E., GREIG R.G., JANZEN J.** Mechanisms of erythrocytes aggregation. Dans : *Erythrocyte Mechanics and Blood Flow*, G.R.Cokelet, H.J.Meiselman, D.E. Brooks eds., Alan. Liss. Publ., New York, 1980, 119-140.
25. **BUNN H.F., FORGET B.G., RANNEY H.M.** Dans : *Human Hemoglobins*, H.F. Bunn, B.G. Forget and H.M. Ranney eds., W.B. Saunders company, Philadelphia/London/Toronto, 1977, 432p.
26. **CARO C.D., PEDLEY T.J., SCHROTER R.C., SEED W.A.** The mechanics of the circulation. Oxford University Press, Oxford, Great-Britain, 1978, 350p.
27. **CASSON N.** A flow equation for pigment-oil suspension of printing in K type. Dans : *Rheology of disperse system*, C.C. Mills ed., PERGAMON London, 1959, 84-102.

28. **CATHIGNOL D., FOURCADE C., PAPANICOLAOU P., GAILLARD S, STOLTZ J.F.** Measurement of the aggregation size of erythrocytes during sedimentation by an ultrasonic method : comparaison with a bio-electric impedance method. Dans : Hemorheology and Disease, 1979, J.F.Stoltz et P.Drouin eds., DOIN, Paris, 1980, 177-184.
29. **CHATURANI P., PALANISAMY V.** Casson fluide model for pulsatile flow of blod under periodic body acceleration. *Biorheology*, 1990, **27** : 619-630.
30. **CHATURANI P., PONNALAGAR SAMY P.** Pulsatile flow of Casson's fluide through stenosed arteries with applications to blood flow. *Biorheology*, 1986, **23** : 499-511.
31. **CHIEN S., USAMI S., TAYLOR H.M., LUNDBERG L., GREGERSEN M.I.** Effects of hematocrit and plasma proteins on human blood rheology at low shear rates. *J. Appl. Physiol.*, 1966, **21** : 81-87.
32. **CHIEN S., USAMI S., BERTLES J.F.** Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle-cell anemia *J. Clin. Invest.*, 1970, **49** : 623-634.
33. **CHIEN S., USAMI S., DELLENBACK R.J., GREGERSEN M.I.** Shear dependent interaction of plasma proteins with erythrocytes in blood rheology. *Amer J Physiol*, 1970, **219** : 143-153.
34. **CHIEN S.** Shear-dependent deformation of erythrocytes in rheology of human blood. *Amer J Physiol*, 1970, **219** : 136-142.
35. **CHIEN S., USAMI S., DELLENBACK R.J., GREGERSEN M.I.** Influence of fibrinogen and globulins on blood rheology at low shear rates : comparaison among elephant, dog and man. Dans : *Theoretical and Clinical Hemorheology*, H.H. Hartet and A.L. Copley eds., 1971, Springer Verlag, Berlin, New York, 136-143.
36. **CHIEN S., LUSE S.A., JAN K.M., USAMI S., MILLER L.H., FAIMOUNT H.** Effects of macromolecules on the rheology and ultrastruture of red cell suspensions. Dans : *Proc.6th Europ. Conf. Microc.*, J. Ditzel and D.H. Lewis eds., Basel, Karger, 1971, 29-34.
37. **CHIEN S.** Comparative hemorheology-hematological implications of species differences in blood viscosity. *Biorheology*, 1971, **8** : 35-57.
38. **CHIEN S., JAN K.M.** Red cell aggregation by macromolecules : roles of surface adsorption and electrostatic repulsion. *J. Sup. Structure*, 1973, **1** : 385-409.
39. **CHIEN S., JAN K.M.** Ultrastructural basis of the mechanism of rouleau formation. *Microvascular. Res*, 1973, **5** : 155-166.
40. **CHIEN S.** Biophysical behavior of red cells in suspension. Dans : *Red Blood Cells*, D.M. Surgenor ed., N.Y. Academic Press, 2nd. ed., 1975, **2** : 1031-1133.
41. **CHIEN S.** Electrochemical interactions between erythrocyte surfaces. *Thromb Res*, 1976, **8** : Suppl. 2 : 189-202.

42. **CHIEN S., SIMCHON S., ABBOTT R.E., JAN K.M.** Surface adsorption of dextrans on human red cell membrane. *J. Colloid Interface Sci.*, 1977, **62** : 461-470.
43. **CHIEN S., KING R.G. SCHUESSLER G.B., SKALAK R., TOZEREN A., USAMI S, COPLEY A.L.** Role of red cell deformability and aggregation in blood viscoelasticity. *Biorheology, Aiche Symposium Series 182*, 1978, **74** : 56-60.
44. **CHIEN S.** Electrochemical interactions and energy balance in red blood cell aggregation. Dans : *Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, G. Milazzo ed., John Wiley, N.Y., 1981, 73-80.
45. **CHIEN S.** Synthèse et conclusion. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz ed., E. M. I., 1986, 172-176.
46. **CHIEN S., SUNG L.A.** Bases physiochimiques et implications cliniques de l'agrégation des globules rouges. dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, 1986, J.F. Stoltz ed., E. M. I., 122-147.
47. **CHIEN S., SUNG L.A.** Molecular basis of red cell membrane rheology. *Biorheology*, 1990, **27** : 327-344.
48. **CLOUTIER G., SHUNG K.K.** Study of red cell aggregation in pulsatile flow from ultrasonic Doppler power measurements. *Biorheology*, 1993, **30** : 443-461.
49. **COPLEY A.L.** Discussion of paper by R. Fåhræus : "die intravaskuläre erythrozytenaggregation und ihre einwirkung auf die rheologie des blutes". *Rheologica Acta*, 1961, **1** : 656.
50. **COPLEY A.L.** On red blood cell filterability, presented in 1958 by Robin Fåhræus, his controversy to knisely's blood sludge and copley's concepts on blood cellular clumping. *Clin Hemorheol*, 1981, **1** : 219-227.
51. **COPLEY A.L., KING R.G.** Agrégation érythrocytaire, stase de compactage, phénomène de compactage de Cohnheim et inflammation. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz ed. E.M. I., 1988, **2** : 127-139.
52. **COPLEY A.L.** The Robin-Fåhræus memorial lecture. *Biorheology*, 1989, **26** : 423-461.
53. **COULTER N.A., SINGH M.** Frequency dependance of blood viscosity in oscillatory flow. *Biorheology*, 1971, **8** : 115-124.
54. **DACIE J.V, LEWIS S.W.** *Practical Haematology*, Edinburgh, London, Melbourne and New York, Churchill Livingstone, Seventh Edition, 1991, 547p.
55. **DAVELOOSE D., FABRE G. BERLEUR F. TESIYLIER G., LETERRIER F.** A new spin label method for the measurement of erythrocyte internal microviscosity. *Biochim Biophys Acta*, 1983, **763** : 41-49.

56. **DENG H.L., BARBENEL J.C, LOWE G.D.O.** Influence of hematocrit on erythrocyte aggregation kinetics for suspensions of red blood cells in autologous plasma. *Biorheology*, 1994, **31** : 193-205.
57. **DICKSON P.W., HOWLETT G.J., SCHREIBER G.** Metabolism of prealbumin in rats and changes induced by acute inflammation., *Eur J Biochem*, 1982, **129** : 289-293.
58. **DINTENFASS L.** Inversion of the Fåhræus-Linqvist phenomenon in blood flow through capillary of diminishing radius. *Nature*, 1967, **215** : 1099-1100.
59. **DINTENFASS L., SOMER T.** On the aggregation of the red cells in Waldenström's macroglobulinaemia and multiple myeloma. *Microvascular. Res.*, 1975, **9** : 279-286.
60. **DOGNON A., LOEPER J., HOUSSET E.** Etude optique de l'agrégation réversible des hématies. *Crit Rev Soc Biol*, 1949, **143** : 769-771.
61. **DOGNON A., SUQUET P.** Diffuse reflection factor of suspensions of colored particles. *J. Chim. Phys.*, 1957, **54** : 815-821.
62. **DOGNON A.** Méthode optique de mesure de l'agrégation des hématies. Applications générales. Exemple d'application à l'étude des plasma artificiels. Dans : Communication séance du 4 février 1969 de l'Académie Nationale de Médecine, 1969, 85-88.
63. **DONNER M, STOLTZ J.F.** Comparative study on fluorescent probes distributed in human erythrocytes and platelets. *Biorheology*, 1985, **22** : 385-397.
64. **DONNER M., STOLTZ J.F.** L'Electrophorèse cellulaire. Dans : *Techniques en Biorhéologie*, J.F. Stoltz, M. Donner et E. Puchelle eds., Séminaire INSERM, 1986, **143** : 143-156.
65. **DONNER M., BOUCHY M, ANRE J.C., STOLTZ J.F.** La polarisation de fluorescence : application aux éléments figurés du sang. Dans : *Techniques en Biorhéologie*, J.F. Stoltz, M. Donner et E. Puchelle eds., Séminaire INSERM, 1986, **143** : 313-326.
66. **DONNER M., MILLS P., STOLTZ J.F.** Influence des protéines plasmatiques sur l'agrégation erythrocytaire. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz. ed., E. M. I., 1988, **2** : 3-8.
67. **DONNER M., SIADAT M., STOLTZ J.F.** Erythrocyte aggregation approach by light scattering determination. *Biorheology*, 1988, **25** : 367-375.
68. **DONNER M., WACHTER P. DE, CAUCHOIS G., GENTILS M., KURTZ M., LAXENAIRE M.C., STOLTZ J.F.** Effets in vivo de substituts plasmatiques sur les propriétés rhéologiques du sang. *Journal des Maladies Vasculaire*, (Paris) Masson, 1993, **18** : 16-133.
69. **DRICKAMER L.K.** Fragmentation of the 95 000 dalton transmembrane polypeptide in human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.*, 1976, **251** : 5115-5123.

70. **EHRLY A.M.** Quelques remarques concernant l'agrégation érythrocytaire. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz ed. E.M. I., 1988, **2** : 124-126.
71. **ELOY R., COROT C., BELLEVILLE J.** Contrast media for angiography : physicochemical properties, Pharmacokinetics and Biocompatibility. Review Paper, (*Clinical Materials*) 1991, **7** : 89-197.
72. **EVANS E., KUKAN B.** Free energy potential for aggregation of erythrocyte and phosphatidylcholine/phosphatidylserine vesicles in dextran (36 500 MW) solution and in plasma. *Biophys. J.*, 1983, **44** : 255-260.
73. **FAGRELL B.** Changes of capillary morphology and blood flow in ischemic skin areas and the effect of treatment. Dans : *Capillary Functions and White Cell Interaction*, Prog Appl Microcirc., K. Messmer ed., Karger, Basel, 1991, **18** : 9-21.
74. **FAHRAEUS R., LINDQVIST T.** The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *Am. J. Physiol.*, 1931, **96** : 562-568.
75. **FAHRAEUS R.** The suspension stability of the blood. *Physiol. Reviews*, 1929, **9** : 241-274.
76. **FAIRBANKS G., STECK T.L., WALLACK D.F.H.** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 1971, **10** : 2606-2610.
77. **FOWLER V.M., BENNETT V.** Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259** : 5978-5989.
78. **FUKUSHIMA T., MATSUZAWA T., HOMMA T.** Visualization and finite element analysis of pulsatile flow in models of the abdominal aortic aneurysm. *Biorheology*, 1989, **26** : 109-130.
79. **FUNG Y.C., TSANG W.C.O., PATITUCCI P.** High-resolution data on the geometry of red blood cells. *Biorheology* 1981, **18** : 369-385.
80. **GAST A.P., LEIBLER L.** Interactions of sterically stabilized particles suspended in a polymer solution. *Macromolecules*, 1986, **19** : 686-691.
81. **GERARD S.** *Hématologie*, S.GERARD ed, Auckland, Bogotas, Paris : Medsi/MacGrawHill 1990, 478p.
82. **GIRAUDET P., FAURE A., FROTJ.C.** Dans : *La réaction inflammatoire (Physiopathologie et exploration clinique)*, P. Giraudet, A. Faure et C. Frotj eds., Vigot, 1984, 260p.
83. **GOLDSMITH H.L.** The microrheology of red cell suspensions. *J. of Gen. Physiol.*, 1968, **52** : 5-28.
84. **GOLDSTONE J., SCHMID-SCHONBEIN H., WELLS R.** The rheology of red cell aggregates. *Microvasc. Res.*, 1970, **2** : 273-286.

85. **GOLLUB S., VANICHONAN C., SCHAEFER D.C.** A study of safer plasma substitutes. *Surg. Gyneacol.*, 1969, **128** : 1235-1243.
86. **GOODFELLOW T.** Fatal acute vasculitis after highdose urogrphy with iohexol. *Brit J_Radiol*, 1986, **56** : 620-621.
87. **HAAVALDSEN I., NORDAL V., KELLY M.** X ray contrast agents. I. Synthesis of some derivatives of 5-amino-2,4,6-triiodoisophthalamide. *Acta Pharm. Suec.* 1983, **20** : 219-232.
88. **HANSS M., BOYNARD M., PERRIN J.** Erythrocyte sedimentation studied by an echographic method. *Biomedicine* , 1976, **25** : 81-82.
89. **HAYNES R.H., BURTON A.C.** Role of the non-Newtonian behavior of blood in hemodynamics. *Amer J Physiol*, 1959, **197** : 943-950.
90. **HEALY C.R., JOLY M.** Rheological behaviour of blood in transient flow. *Biorheology*, 1975, **12** : 335-340.
91. **HEIDRICH H.G., LEUTNER G.** Two type of vesicles from the erythrocyte ghost membrane differing in surface charge. *Eur. J. Biochem.*, 1974, **41** : 37-43.
92. **HERBST M., GOLDSTEIN J.H.** Measuring red cell aggregation kinetics with nuclear magnetic resonance. Dans : *Kinetics of Aggregation and Gelation*, F.Family, D.P. Landau eds., Elsevier Sciences Publishers BV, 1984, 53-55.
93. **HEUSER G.** Sekundarbewegungen in kegel-platte. *Rheometer. Biomedicine. Technik.*, 1977, **22** : 157-158.
94. **HEVEN S., SOLOMON A.K.** Permeability of human erythrocytes membrane vesicles to alkali cations. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, **550** : 393-406.
95. **HIGGINS C.B. SOVAK M., SCHMIDT W.S.** Direct myocardial effects of intracoronary administration of new contrast materials with low osmolality. *Invest. Radiol.*, 1980, **15** : 39-46.
96. **HIRUMA H, ITO M., SHIO H, UYESKA N.** Effect of contrast media on RBC filterability studied with nickel mesh filtration. *Clin Hemorheol*, 1991, **11** : 91-105.
97. **HOEY G.B, SMITH K.R.** Chapitre 1 : Chemistry of X-ray contrast media. dans : *Radiocontrast Agents*, M. Sovak ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, 1984, **73** : 23-125.
98. **HUANG C.R, FABISIAK W.** Thixotropic parameters of whole human blood. *Thrombosis Res*, 1976, **8** : 1-8.
99. **ICSH.** Guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response. *J Clin Pathol*, 1988, **41** : 1203-1212.

100. IMAIZUMI K, SHIGA T. Effect of immunoglobulins and IgG-fragments on the human erythrocyte aggregation, studied by a rheoscope combined with image analyzer. *Biorheology*, 1983, 20 : 569-577.
101. JAN K.M., CHIEN S. Role of the surface electric charge in RBC interactions. *J. Gen. Physiol.*, 1973, 61 : 638-654.
102. JAN K.M. Role of hydrogen bonding in red cell aggregation. *J Cell Physiol*, 1979, 101 : 49-56.
103. JAN K.M. Red cell interactions in macromolecular suspension *Biorheology*, 1979, 16 : 137-148.
104. JAN K.M., USAMI S., CHIEN S. The disaggregation effect of dextran 40 on cell aggregation in macromolecular suspensions. *Biorheology*, 1982, 19 : 543-554.
105. JI T.H., KIEHM D.J, MIDDAUGH C.R. Presence of spectrin tetramer in the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255 : 2990-2993.
106. JOANNY J.F., LEIBLER L, DE GENNES P.G. Effects of polymer solutions on colloid stability. *J Polym Sci*, 1979, 17 : 1073-1084.
107. JORN DITZEL M.D. The nature of the intravascular erythrocyte aggregation in disease with particular reference to diatetes mellitus. *Acta Med. Scand*, 1955, 152 : 371-378.
108. KALLIO T., ALANEN A., KORMANO M. The effect of radiographic contrast media on ultrasonically detectable red blood cell aggregation in vitro. *Invest Radiol.*, 1989, 24 : 789-793.
109. KATCHALSKY A., DANON D., NEVO A., DE VRIES A. Interaction of basic polyelectrolytes with the red blood cells II : Agglutination of basic polyelectrolytes by polymeric bases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 33 : 120-138.
110. KIMBALL J.P., SANSONE V.J., DITERS L.A., WISSEL P.S. Red blood cell aggregation versus blood clot formation in ionic and nonionic contrast media. *Invest Radiol.*, 1988, 23 : 334-339.
111. KLOSE H.J., VOLBER E., BRECHTELSBAUER H., HEINICH L., SCHMID-SCHONBEIN H. Microrheology and light transmission of blod. I-The photometric effects of red cell aggregation and red cell orientation. *Plügers Arch.*, Spring Verlag, 1972, 333 : 126-139.
112. KNISELY M.H. Intravascular erythrocyte aggregation. dans : *Handbook of Physiology*. W.F. Hamilton and P. Dow eds., Washington D.C., Amer. Physiol. Soc., 1965, 3 : 2249-2292.
113. KOJ A. Acute-phase reaction - Their synthesis, turnover and biological significance. Dans : *Structure and function of plasma proteins*. A.C. Auison ed., Plenum Press, 1974, 1 : 73-125.

114. **KON K., MURAKAMI J., TAKAOKA K., SHIGA T.** Frequency response of erythrocyte deformation to oscillatory shear stress. Dans : Progress and New Directions of Biomechanics, Fung, Hayashi, Seguchi eds., MITA PRESS, 1989, 53-62.
115. **KOPITO R.R., ANDERSSON M, LODISH H.F.** Structure and organization of the murine band 3 gene. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262** : 8035-8040.
116. **LACOMBE C.** Rheological study in transient flow of diabetic blood. Dans : Hemorheology and Diseases, 1979, J.F. Stoltz e and P. Drouin eds., DOIN, Paris 1980, 419-424.
117. **LACOMBE C, LELIEVRE J.C.** Interprétation des rhéogrammes: relation avec l'agrégation et la déformabilité érythrocytaire. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz ed. E.M.I., GENEVE 1986. 33-46.
118. **LAPREVOTE-HEULLY M.C., LARCAN A., BOLLAERT P.E., MULLER S., DONNER M., STREIFF F, STOLTZ J.F.** Viscosité sanguine au cours d'agressions thromboemboliques diverses. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz ed. E.M.I. 1986, 155-163.
119. **LEEUWENHOEK A.V.** Microscopical observations concerning blood, milk, bones, the brain, spittle and cuticula. *Philos. Trans Roy Soc, London*, 1674, **9** : 121-128.
120. **LEFORT F.** Les effets secondaires des produits de contraste non ioniques. Dans : Thèse en Pharmacie, Université de Nancy I, 1992.
121. **LELIEVRE J.C., LACOMBE C., QUEMADA D.** Caractérisation rhéologique du sang humain. *J. Biophys. et Méd. Nucl.*, 1982, **6** : 117-120.
122. **LEMAIRE R.** Les propriétés rhéologiques du sang. Dans : L'écoulement du sang dans les artères. R. Lemaire ed., SANDOZ, 1978, 181p.
123. **LERCHE D., BAUMLER H.** Moderate heat treatment of only red blood cells slows down the rate of RBC-RBC aggregation in plasma. *Biorheology*, 1984, **21** : 393-403.
124. **LERCHE D.** Spontaneous aggregation of washed human erythrocytes in isotonic media of reduced ionic strength. Conclusions about the spatial arrangement of the N-terminal part of the glycophorins. *Biorheology*, 1982, **19** : 587-598.
125. **LERCHE D., HENNICKE G.** The effects of different ionic and nonionic X-ray contrast media on the morphological and rheological properties of human red blood cells., *Clin. Hemorheol.*, 1992, **12** : 341-355.
126. **LESSNER A., ZAHAVI J., SILBERG A., FREI E.H, DREYFUS F.** The viscoelastic properties of whole blood. Dans : Theoretical and Clinical Hemorheology, H.H. Hartet and A.L. Copley eds., Springer Verlag, Berlin, New York, 1971, 194-205.
127. **LETO T.L., MARCHESI V.T.** A structural element of human erythrocyte protein 4.1. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259** : 4603-4608.

128. LISIER J. On the early stages of inflammation. *Phil Trans Roy Soc*, 1858, **148** : 645-653.
129. LÖW M.K., PERKTOLD K., RAUNIG P.R. Hemodynamics in rigide and distensible saccular aneurysms : A numerical study of pulsatile flow characteristics. *Biorheology*, 1993, **30** : 287-298.
130. LUCIUS M., LÉBOUCHE M., RAVEY J.C., STOLTZ J.F. Les techniques de viscosimétrie. Dans : *Techniques Avancées en Hémoreologie*, M.L. Viriot, J.C, André, M. Lucius, J.F. Stoltz eds., DPIC-INPL Ed., 1983, 405-434.
131. LUNDGER R. A study of the physical nature of the sedimentation of blood-corpuses. *Acta. Med. Scand.*, 1927, **67** : 63-104.
132. LUX S.E. Disorders of the red cell membrane. Dans : *Hemetological Disorders of the Infancy and Childhood*. D. Nathan and F. Oski eds., SAUNDERS, Philadelphia, second ed. 1988, 1 : 443-544.
133. LY D.P., QUEMADA D. Ecoulements sanguins dans des tubes de faibles diamètres. Dans : *Techniques Avancées en Hémoreologie* M.L. Viriot, J.C, André, M. Lucius, J.F. Stoltz eds., DPIC-INPL Ed., 1983, 184-195.
134. MAEDA N., IMAIZUMI K., SEKIYA M., SHIGA T. Rheological characteristics of desialylated erythrocytes in relation to fibrinogen-induced aggregation. *Biochim. Biophys Acta*, 1984, **776** : 151-158.
135. MAEDA N., SHIGA T. Inhibition and acceleration of erythrocyte aggregation induced by small macromolecules. *Biochim. Biophys Acta*, 1985, **843** : 128-136.
136. MAEDA N., SEIKE M., KUME S., TAKAKU T., SHIGA T. Fibrinogen-induced erythrocyte aggregation : erythrocyte-binding site in the fibrinogen molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **1(6)** : 473-488.
137. MALPIGHI M. De pulmouibus observationes anatomicae. Bonaniae, B. Ferronius. 1661.
138. MARETZKI D. REIMANN B., RAPOPORT S.M. A reappraisal of the binding of cytosolic enzymes to erythrocyte membranes. *Trends Biochem Sci.*, 1989, **14** : 93-96.
139. MARY A., BERLAN J., BOUSQUET C., SENAC J.P. Effects of two osmolality contrast media on red blood cell filterability and aggregation in vitro. *Eur. J. Radiol.*, 1991, **13** : 134-137.
140. MCHEDLISHVILI G., BERITASHVILI N., LOMINADZE D., TSINAMDZVRISHVILI B. Technique for direct and qualitative evaluation of erythrocyte aggregability in blood samples. *Biorheology*, 1993, **30** : 153-161.
141. McMILLAN D.E. Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. *Metabolism*, 1989, **38** : 1042-1046.

142. MEHRISHI J.N. Molecular aspects of the mammalian cell surface. Dans : Progress in Biophysics and Molecular Biology, J.A.V. Butler and D. Noble eds. Pergamon Press - Oxford and New York, 1972, 25 : 1-70.
143. MEISELMAN H.J., MERRILL E.W., SALZMAN E.W., GILLILAND E.R., PELLETIER G.A. Effect of dextran on rheology of human blood : low shear viscosimetry. J. Appl. Physiol., 1967, 22 : 480-486.
144. MERRILL E.W., COKELET G.R., BRITTEN A., WELLS R.E. Non-Newtonian rheology of human blood - Effect of fibrinogen deduced by "subtraction". Circ. Res., 1963, 13 : 48-55.
145. MERRILL E.W., PELETIER G.A. Viscosity of human blood: transition from newtonian to non-newtonian. J. Appl. Physiol., 1967, 23 : 178-182.
146. MILLS P., QUEMADA D., DUFAUX J. Mesure par rétrodiffusion laser des temps caractéristiques intervenant dans la rhéologie de suspensions sanguines. J. Mal Vasc., 1981, 6 : 125-127.
147. MILLS P. Structure et rhéologie des suspension de particules déformables susceptibles de s'agréger-Application à la suspension sanguine. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Paris VII., 1982.
148. MILLS P., SNABRE P. Agrégamètre optique de la suspension sanguine. dans : Techniques avancées en hémorhéologie. M.L. Viriot, J.C, André, M. Lucius, et J.F. Stoltz eds., DPIC-INPL Ed (Nancy), 1983, 580-598.
149. MILLS P., SNABRE P. L'agrégation érythrocytaire. Dans : Techniques en Biorhéologie, J.F. Stoltz, M. Donner, E. Puchelle eds., INSERM Ed., 1986, 143 : 157-166.
150. MOHANDAS N. Regulation of red cell membrane deformability and mechanical stability by skeletal protein network. Biorheology, 1989, 26 : 507-507.
151. MONNIER L., LAURENT A., OTHMANE A., DUFAUX J., MILLS P., MOYSE D., MERLAND J.J. Produits de contraste et microcirculation étude de l'agrégation et de la déformation érythrocytaire. Rev. Im. Med., 1991, 3 : 237-242.
152. MUNN L.L., GLACKEN M.W., MCINTYRE B.W., ZYGOURAKIS K. Analysis of lymphocyte aggregation using digital image analysis. J Immunol Method, 1993, 166 : 11-25.
153. NASH G.B., MEISELMAN H.J. Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and in vivo aging. Biophys. J., 1983, 43 : 63-73.
154. NASH.G.B., WENBY R.B., SOWEMIMO COKER S.O., MEISELMAN H.J. Influence des propriétés cellulaires sur l'agrégation de globules rouges. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz ed., E.M.Inter., 1986, 65-83.
155. NGUYEN P., JOLLY D., DEVIE B., MARCUS C., ADJIZIAN J.C., MENANTEAU B., POTRON G. Influence des produits de contraste sur l'agrégation et la déformabilité érythrocytaire in vitro. J. Mal. Vasc., 1990, 15 : 347-352.

156. **NGUYEN P., MARCUS C., PETITFRERE E., MENANTEAU B. et POTRON P.** Influence des produits de contraste sur les paramètres hémorhéologiques de l'agrégation érythrocytaire : une étude in vitro et vivo. Dans: Hémorhéologie et Agrégation érythrocytaire théorie et applications cliniques. J.F. Stoltz, M. Donner, A.L. Copley eds., E.M.I, Paris, 1987, 3 : 298-307.
157. **OP den KAMP J.A.F.** Lipid asymmetry in membrane. *Ann. Rev. Biochem.*, 1979, **48** : 47 -71.
158. **OTHMANE A.** Influence des facteurs membranaires sur l'agrégation érythrocytaire. Dans : Thèse doctorat d'université Paris VII, 1987.
159. **PACKHAM M.A., GUCCIONE M.A., GREENBERG J.P., KINLOUGH-RATHBONE R.L., MUSTARD J.F.** Release of ¹⁴C-serotonin during initial platelet changes induced by thrombin, Collager, or A 23187., *Blood*, 1977, **50** : 915-926.
160. **PALMER A.A., JEDRZEJCZYK M.J.** The influence of rouleaux on the resistance to flow through capillary channels at various shear rates. *Biorheology*, 1975, **12** : 265-270.
161. **PAULLUS F., DIXNEUF P., STOLTZ J.F.** Approche de la cinétique d'agrégation des hématies par analyse d'image. Dans : Techniques en Biorhéologie, J.F. Stoltz, M. Donner, E. Puchelle. eds. INSERM Ed., 1985, **143** : 245-249.
162. **PAULUS F.** Approche de l'agrégation érythrocytaire : Etude par traitement d'images. Thèse de Doctorat d'état es-sciences de l'INPL 1987 157p.
163. **PERONNEAU P., NAKACHE M, CAPRANI A.** Ecoulements artériels et phénomènes interfaciaux. Dans : Techniques Avancées en Hémoréologie M.L. Viriot, J.C, André, M. Lucius, J.F. Stoltz eds., DPIC-INPL Ed., 1983, 258-273.
164. **PIGNON B., MULLER S., JOLLY D., SIADAT M., PETITFRERE E., VESSEL B., DONNER M., POTRON G, STOLTZ J.F.** Validation d'une méthode d'approche de l'agrégation érythrocytaire. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz ed., E.M.I., 1988, 65-74.
165. **PIGNON B., ADJIZIAN J.C., DONNER M., STOLTZ J.F., POTRON G.** Mesure de l'agrégation érythrocytaire par rétrodiffusion laser. Détermination des valeurs normals. Influence de différents facteurs. Dans : Hémorhéologie et agrégation érythrocytaire J.F. Stoltz, M. Donner, A.L. Copley eds., E. M. I., 1989, **3** : 53-63.
166. **PINDER J.C., GRATZER W.B.** Structure and dynamic states of actin in the erythrocyte. *J. Cell. Biol.*, 1983, **99** : 768-775.
167. **POTRON G. NGUYEN P., ADJIZIAN J.C.** Les thromboses en pratique quotidienne. De la physiologie au traitement Laboratoire FOURNIER et laboratoire INERGIE eds. DIJON. 1993, 119P.
168. **QUEMADA D.** Rheology of concentrated disperse system III. General features of the proposed non-Newtonian model. Comparison with experimental data. *Rheol. Acta*, 1978, **17** : 643-653.

169. **QUEMADA D., DROZ R.** Blood viscoelasticity and thixotropy from stress formation and relaxation measurements : a unified model. *Biorheology*, 1983, **20** : 635-654.
170. **QUEMADA D.** Lois de comportement. Modélisation macroscopique : viscosité, thixotropie, visco-élasticité, Dans : *Techniques Avancées en Hémoreologie* M.L. Viriot, J.C, André, M. Lucius, J.F. Stoltz eds., DPIC-INPL Ed., 1983, 132-156.
171. **RAININKO R., YLINEN S.L.** Effect of ionic and non ionic contrast media on aggregation of red blood cells in vitro. *Acta Radiologica*, 1987, **28** : 87-92.
172. **RAKOW A., SIMCHON S., SUNG L.A., CHIEN S.** Aggregation of red cells with membrane altered by heat treatment. *Biorheology*, 1981, **18** : 3-8.
173. **RALSTON G.B.** Physico-chemical characterization of the spectrin tetramer from bovine erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **455** : 163-172.
174. **RAMPLING M. W., SIRRS J.A.** The interactions of fibrinogen and dextran with erythrocytes. *J. Physiol.*, 1972, **223** : 199-212.
175. **RAMPLING M.W.** The binding of fibrinogen and fibrinogen degradation products to the erythrocyte membrane and its relationship to haemorheology. *Acta Biol. Med. Germ.*, 1981, **40** : 373-378.
176. **RAMPLING M. W.** The effects of fibrinogen and its plasmic degradation products on the rheology of erythrocyte suspensions. *Clin hemorheol*, 1984, **4** : 533-541.
177. **RAMPLING M.W.** Rouleaux formation - its causes, estimation and consequences. *Doga - Tr.J. of Medical Sciences*, 1990, **14** : 447-453.
178. **RIBITSCH V.** Determination of red blood cell suspensions rheological properties in oscillatory flow (Microsymposium : dynamic rheologic measurements in the clinic). *Clin Hemorheol*, 1989, **9** : 313-317.
179. **RIHA P., DONNER M., STOLTZ J.F.** Effect of blood flow pulsatility on RBC Aggregation. Dans : *Physiological Fluid dynamic*, NVC Swamy - Mcgha Singh ed. Norosa pib (New Dehli), 1992 **III** : 270-277.
180. **ROBERTSON H.J.F.** Blood clot formation in angiographic syringes containing non ionic contrast media. *Radiology*, 1987, **163** : 621-622.
181. **ROURKE M.D., ERNSTENE A.C.** A method for correcting the erythrocyte sedimentation rate for variation in the cell volume percentage of blood. *J.Clin. Invest.* 1930, **8** : 545-559.
182. **SATHO M., IMAZUMI K., BESSOHO T., SHIGA T.** Increased erythrocyte aggregation in diabetes mellitus and its relationship to glycosylated haemoglobin and retinopathy. *Diabetologia*, 1984, **27** : 517-521.

183. **SCHACHTER D.** Aggregation of liposomes by dextrans of high molecular weight. *Biochim. Biophys Res Commun*, 1978, **84** : 840-844.
184. **SCHMID-SCHONBEIN H., GAEHTGENS P., HIRSCH H.** On the shear rate dependence of red cell aggregation in vitro. *J Clin Invest*, 1968, **47** : 1447-1454.
185. **SCHMID-SCHONBEIN H., WELLS R., GOLSTONE J.** Influence of deformability of human red cells upon blood viscosity. *Circ. Res.*, 1969, **25** : 131-143.
186. **SCHMID-SCHONBEIN H., VOLGER E., KLOSE H.J.** Microrheology and light transmission of blood. II- The photometric quantification of red cell aggregate formation and dispersion in flow. *Pflügers Arch.*, Springer-Verlag, 1972, **333** : 140-155.
187. **SCHMID-SCHONBEIN H., GOSEN J.V. HEINICH L., KLOSE H.J., VOLGER E.** A counter-rotating "rheoscope chamber" for the study of the microrheology of blood celled aggregation by microscopic observation and microphoto-metry. *Microvascular Research*, 1973, **6** : 366-376.
188. **SCHMIDT-SCHÖBEIN H., RIEGER H., GALLASCH G., SCHACHTRER H.** Pathological red cell aggregation (dum aggregation). *Bibl. Anat.*, 1977, **16** : 484-489.
189. **SCHMID-SCHONBEIN H., VOLGER E., TEITEL P., KIESEWETTER H., DAVER U, HEILMANN L.** New hemorheological techniques for the routine laboratory. *Clin. Hemorrh.*, 1982, **2** : 93-105.
190. **SCHNEDITZ D., RIBITSCH V., KENNER T.** Rheological discrimination between native, rigid and aggregated red blood cells in oscillatory flow. *Biorheology*, 1985, **22** : 209-219.
191. **SCHOEMAKER W.C., MORSON D.O.** The effect of whole blood plasma expansion on volume flow relationships in critically ill patients. *Surg. Gynaecol.*, 1973, **137** : 453-457.
192. **SCHREIBER G., HOWLETT G., NAGASHIMA M., MILLERSHIP A., MARTIN H., URMAN J., KOTLER L.** The acute phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation. *J. Biol. Chem.*, 1982, **257** : 10271-10277.
193. **SCHULMAN G., HAKIM R.M.** Recent advances in biocompatibility of haemodialysis membranes. *Nephrol Dial transplant*, 1991, **Suppl 2** : 10-13.
194. **SEAMAN G.V.F.** Electrochemical properties of peripheral zone of erythrocytes. Dans : *Surface phenomena in hemorheology*, A.L. Copley, G.V.F. Seaman eds., *Annals of the New York, Academy of Sciences*. 1983, **416** : 176-189.
195. **SECOMB T.W., FLEISCHMAN G.F, PAPPENFUSS H.D.** Effects of reduced perfusion and hematocrit on flow distribution in capillary networks. In Messmer K, 1978, 205-211.
196. **SEIGNEURET M, DEVAUX P.F.** ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane : Relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81** : 3751-3755.

197. SEWCHAND L.S., MASRI M.A., FRATZ O.G, ROWLANDS S. Fibrinogen and the ultralong-range interaction of human erythrocytes. *Cell. Biophys.*, 1984, **61** : 215-221.
198. SHECHTER E. Dans : *Biochimie et biophysique des membranes. (aspects structuraux et fonctionnels)* E. Shechter ed., MASSON, 1990, 414p.
199. SHIGA T, MAEDA N. Kinetic study on aggregation of red blood cells by successive analysis of moving video-image. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz, M. Donner, A.L. Copley eds., E. M. I., 1989, **3** : 38-45.
200. SKALAK R, CHIEN S. Capillary flow : history, experiments and theory. *Biorheology*, 1981, **18** : 307-330.
201. SNABRE P. Effect of dextran polydispersity on red blood cell aggregation. *Colloid and Polymer. Sci.*, 1985, **263** : 478-493.
202. SNABRE P., MILLS P. Rôle des interactions électrostatiques dans le phénomène d'agrégation érythrocytaire. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, 1986, J.F. Stoltz ed., E. M. I. Paris, 98-110.
203. SNABRE P. Agrégation des globules rouges en présence de dextrane. *Rhéologie des suspensions des globules rouges.* dans : *Thèse de Doctorat d'Etat Paris VII*, 1988.
204. SOVAK M. Radiographic contrast media, function and future reassessed. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum [B]*, 1988, **15** : 3-7.
205. SOVAK.M. New developments in radiographic contrast media. Dans : *Contrast Media : Biologic Effects and Clinical Application*, Z. Parvez ed., CRC Press, Florida. 1987; 27-46.
206. SPECK U. Newer perspectives in contrast media chemistry. dans : *Contrast Media : Biologic Effects and Clinical Application.*, Z.Parvez ed., CRC, Press, Florida, 1987, 47-57.
207. STECK T.L., DAWSON R.M.C. Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, 1974, **249** : 2135-2142.
208. STOLTZ J.F., GAILLARD S., LARCAN A. Macromolécules et hémorhéologie. *Anesth. Anal. Réan.*, 1976, **33** : 553-572.
209. STOLTZ J.F., GAILLARD S., LUCIUS M. A study of the viscoelastic properties of blood in transient flow. *J. Biomech*, 1980, **13** : 341-346.
210. STOLTZ J.F., GAILLARD S., PAULUS F., HENRI O, DIXNEUF P. Experimental approach to rouleau formation. Comparison of three methods. *Biorheology*, 1984, **Suppl. 1** : 221-226.
211. STOLTZ J.F. Rappels concernant les paramètres contrôlant les processus fondamentaux en hémorhéologie : importance de l'agrégation érythrocytaire. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz ed., E. M. I., 1986, 22-32.

212. **STOLTZ J.F., PAULUS F., DONNER M.** Techniques d'approches de l'agrégation érythrocytaire. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz ed. E. M. I., 1986, 3 : 111-121.
213. **STOLTZ J.F., PAULUS F., DONNER M.** Agrégation des hématies: Approches méthodologiques et limites. Dans : Techniques en Biorhéologie, J.F. Stoltz, M. Donner, E. Puchelle eds., INSERM Ed., 1986, 143 : 167-182.
214. **STOLTZ J.F.** Perspectives et conclusion. dans : Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz ed., E.M. Int., 1988, 2 : 210-211.
215. **STOLTZ J.F.** Hemodilution in acute disorders. Proceedings of the 5th European Conference on Clinical Hemorheology, Arnette, Paris, 1988, 86p.
216. **STOLTZ J.F., DONNER M.** L'agrégation érythrocytaire Aspects thérapeutiques. Dans : Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire, J.F. Stoltz, M. Donner et A.L. Copley eds., E M Intern, 1989, Vol.3, 279-284.
217. **STRAIN W.** Historical development of contrast media for medical imaging. Dans : Contrast Media : Biologic Effects and Clinical Application, Z. Parvez ed., CRC Press, Florida, 1987, 3-26.
218. **STRAUB-BLATTER.** Effect of low fibrinogen concentrations on the rheology of human blood in vitro. Amer J Physiol., 1979, 263 : H447-450.
219. **TETTA C., SEGOLONI G., MARIANO F., MONTRUCCHIO G., TURELLO E, CAMUSSI G.** Leukocyte-derived mediators and biocompatibility. Nephrol Dial Transplant, 1991, Suppl. 2, 24-30.
220. **THOMAS M.L.** Contrast agent-induced thrombophlebitis following leg phlebography: meglumine ioxaglate versus meglumine iothalamate. Radiology, 1983, 147 : 399-400.
221. **THRUSTON G.B.** Rheological parameters for the viscosity, Viscoelasticity and thixotropy of blood. Biorheology, 1979, 16 : 149-162.
222. **VOLGER E., SCHMID-SCHONBEIN H., GOSEN J.V, KLOSE H.J.** Microrheology and light transmission of blood. III-The velocity of red cell aggregate formation. Plügers Arch., Spring Verlag, 1975, 354 : 299-337.
223. **WAJCMAN H., LANTZ B, GIROT R.** Dans : Les Maladies du globule rouge, H. Wajcman, B. Lantz et R. Girot eds., Editions INSERM, Médecine-Science Flammarion, Paris, 1992, 515p.
224. **WANG X.** Influence de l'agrégation érythrocytaire sur les propriétés mécaniques du sang Application a certains pathologie. Thèse de Doctorat de l'INPL, Nancy, 1990.
225. **WESTERGREN A.** The technique of the red cell sedimentation reaction. Ann. Rev., Tuberc., 1926, 14 : 94-101.

226. **ZANNAD F., IDEE M.J., NAIN-DIT-DUCRET M., BALUT C., HUNTSMAN A., Le MIGNON M.M., DONADIEU A.M., PIKON A., DOUCET D.** Effects of ioxaglate and nonionic contrast media on erythrocytes filtrability and morphology. Review of previous studies and evaluation of clinical relevance. *Clin Hemorheol*, 1992, **12** : 357-368.
227. **ZHAO T.X, LOCKNER D.** Electrical impedance and erythrocyte sedimentation rate of blood. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, **1153** : 243-248.
228. **ZWAAL R.F.A., ROELFSEN B., COMFURIUS P, VAN DEENEN L.L.M.** Organization of the phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, **406** : 83-96.
229. **POTRON G., PIGNON B., MAILLIOT J.L., NGUYEN P.** Erythrocyte aggregation and sedimentation : influences of acute phase mediators. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz ed., E M Intern, 1992, Vol.4, 51-56.
230. **ANTONIOW J.S., MARX J., EGEE M., MERIENNE E., DROULLE C., POTRON G.** Study of the erythrocyte sedimentation by photothermal radiometry under random noise excitation. Dans : *Hémorhéologie et Agrégation Erythrocytaire*, J.F. Stoltz ed., E M Intern, 1992, Vol.4, 81-86.

ANNEXE

I. INTRODUCTION

Cette annexe comporte la description de la méthodologie utilisée préalablement aux détermination d'agrégation érythrocytaire, qu'elles soient effectuées en mode continu, en mode pulsé ou par analyse d'image.

Par ailleurs, le système d'analyse par rétrodiffusion laser ayant été largement utilisé au cours de notre travail de recherche, nous avons souhaité au début de notre recherche, tester la sensibilité de cette méthode par rapport à un certain nombre de paramètres et à une autre méthode d'approche de l'agrégation érythrocytaire.

C'est ainsi qu'ont été pris en compte :

- 1) le vieillissement de l'échantillon, la préparation de certains échantillons étant parfois très longue;
- 2) l'accélération au cours d'une centrifugation, la préparation des échantillons nécessitant des lavages;
- 3) la contribution d'hématies rigidifiées aux modifications des paramètres cinétiques et rhéologiques d'agrégation.

II. ORIGINE ET PRELEVEMENT DU SANG

Le sang provenant de donneurs adultes sains (CRTS, Nancy) est prélevé à la veine antécubitale et recueilli sur EDTA (5mg/ml). Dans certaines expériences, des échantillons de sang de patients diabétiques et atteints d'un choc septique ont été utilisés.

III. DETERMINATION ET AJUSTEMENT DE L'HEMATOCRITE

L'hématocrite est contrôlé par centrifugation avec une micro méthode (centrifugeuse ADAMS AUTOCRIT) pendant 10 minutes. Généralement l'hématocrite final est ajusté soit par addition ou soustraction de plasma autologue, soit par addition d'albumine, immunoglobulines, fibrinogène, produits de contraste et/ou solutions de référence après élimination d'un volume défini de plasma.

IV. DETERMINATION DE LA VISCOSITE DU SANG TOTAL

La viscosité du sang total a été déterminée avec un volume du sang total de 1,5ml avec le Viscosimètre Low Shear 30 (Contraves, Zürich, Suisse) qui est un rhéomètre rotatif basé sur le principe d'un viscosimètre de Couette. Le sang est soumis à des vitesses de cisaillement variables entre 0,204 et 128,5 sec^{-1} avec sept vitesses fixées. Les valeurs de la viscosité apparente correspondant aux sept vitesses sont exprimées en milli Pascal. Seconde.

V. DETERMINATION D'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE

Dans cette étude, la détermination de l'agrégation érythrocytaire a été effectuée avec deux appareils basés sur un principe différent. La majorité des expérimentations a été réalisée avec l'Erythroagrégamètre. Toutefois, dans le cadre d'expérimentations préliminaires, nous avons été amené à effectuer des mesures avec l'agrégamètre Myrenne.

V 1. Erythroagrégamètre

Le principe de l'Erythroagrégamètre (Affibio, Villers- lès-Nancy, France) est basé sur l'analyse des variations de la lumière rétrodiffusée par une suspension sanguine (voir première partie). 1,7 ml de sang recueilli sur EDTA à l'hématocrite 0,4 l/l sont préchauffés

dans un bain-marie à 37 °C pendant 5 minutes. Ensuite, ils sont placés dans le viscosimètre et deux séries de mesure sont effectuées.

Dans la première série de mesure, les paramètres de la cinétique d'agrégation et de structure, qui reflètent la formation de rouleaux et agrégats, sont déterminés :

tA - temps primaire d'agrégation;

tF - temps final d'agrégation;

S₁₀ - Indice d'agrégation à 10 secondes;

IS - Indice de structure.

Dans une deuxième série de mesure, les paramètres rhéologiques qui sont liés à la cohésion de rouleaux d'hématies sont déterminés :

$\dot{\gamma}$ S - vitesse de cisaillement nécessaire pour entraîner la dissociation totale;

$\dot{\gamma}$ D - vitesse de cisaillement nécessaire pour entraîner la dissociation partielle des rouleaux et agrégats..

V.2. Analyse par lumière transmise

Le système Myrenne (Myrenne, GmbH, Allemagne) est un agrégamètre photométrique dont le principe repose sur l'analyse de la lumière transmise (infrarouge) traversant une suspension sanguine. Il est utilisé pour mesurer un indice d'agrégation. Pratiquement, on soumet 0,02ml de sang total à l'hématocrite 0,40l/l à une vitesse de cisaillement élevée (600 sec^{-1}) pendant 10 secondes pour que les hématies soient complètement dissociées. La température de la mesure est la température ambiante. Après l'arrêt du rotor, les hématies commencent à s'agréger et le flux transmis diminue puis augmente en fonction du temps. Le paramètre déterminé est un index d'agrégation.

VI. PARAMETRES FIXES DES DETERMINATIONS D'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE ET DE VISCOSITE SANGUINE

VI.1. Hématocrite

L'hématocrite est un paramètre influençant de façon significative l'agrégation érythrocytaire. De nombreux travaux ont démontré que l'augmentation de l'hématocrite entraîne un accroissement de la viscosité sanguine aux faibles vitesses de cisaillement (31, 224), une accélération de la vitesse de sédimentation (212) et une variation des paramètres de cinétique d'agrégation et des seuils de désagrégation (165). Dans le cadre de notre travail, l'hématocrite a été fixé à 0,40 l/l pour les mesures d'agrégation érythrocytaire par l'analyse la lumière rétrodiffusée et transmise et les mesure de viscosité sanguine.

Par contre, pour l'analyse d'image, l'hématocrite a été fixé à 0,20 l/l pour des raisons liées à la détermination des caractéristiques de périmètre et de surface des objets.

On peut ajuster l'hématocrite Ht selon formule :

$$\pm V_p = \frac{Ht \text{ (original)} - Ht \text{ (final)}}{Ht \text{ (final)}} \times V_s$$

où $\pm V_p$ représente le volume de plasma en ml à ajouter ou à soustraire pour obtenir l'hématocrite souhaité à partir de la valeur Ht (original) et V_s le volume de sang total en ml.

VI.2. Température de mesure

Une étude du rôle de la température de mesure des paramètres d'agrégation par l'analyse de la lumière rétrodiffusée par la suspension sanguine entre 25°C et 37°C a mis en évidence une diminution de la cinétique d'agrégation érythrocytaire, ainsi qu'une faible diminution des seuils de désagrégation lorsque la température varie de 37 à 25 °C (164).

Pour ces raisons, les déterminations d'agrégation ont été effectuées à 37 °C pour les analyse faites par rétrodiffusion laser et les échantillons ont été préincubés dans un bain-marie à 37°C pendant 5 minutes avant la mesure.

VII. INFLUENCE DE L'ACCELERATION LORS D'UNE CENTRIFUGATION D'UNE SUSPENSION ERYTHROCYTAIRE

Les déterminations ont été effectuées après une centrifugation à 600g, 1300g et 2500g pendant 10 minutes.

La centrifugation d'une suspension sanguine ne provoque pas de variations notables des paramètres de l'agrégation érythrocytaire et de la viscosité sanguine, tout au moins dans la gamme d'accélération étudiées. Le test de Wilcoxon n'a montré aucune différence entre les échantillons non centrifugés et ceux qui ont été centrifugés à 2500g pendant 10 minutes (Tableau XIII).

VIII. INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DE L'ECHANTILLON SUR LA VISCOSITE SANGUINE ET LES PARAMETRES D'AGREGATION

Les déterminations ont été effectuées peu après le prélèvement (dans un délai d'une heure maximum) et après avoir séjourné 8 et 24 heures à température ambiante.

Les résultats de 10 expériences sont exprimés sous forme de moyennes \pm déviation standard. La comparaison est effectuée par le test t de Wilcoxon entre les échantillons mesurés après le prélèvement et les échantillons ayant séjourné 24 heures à température ambiante.

Le vieillissement du prélèvement entraîne une augmentation très significative de la viscosité sanguine total, en particulier aux vitesses de cisaillement de 0,204 sec⁻¹ à 20,4sec¹

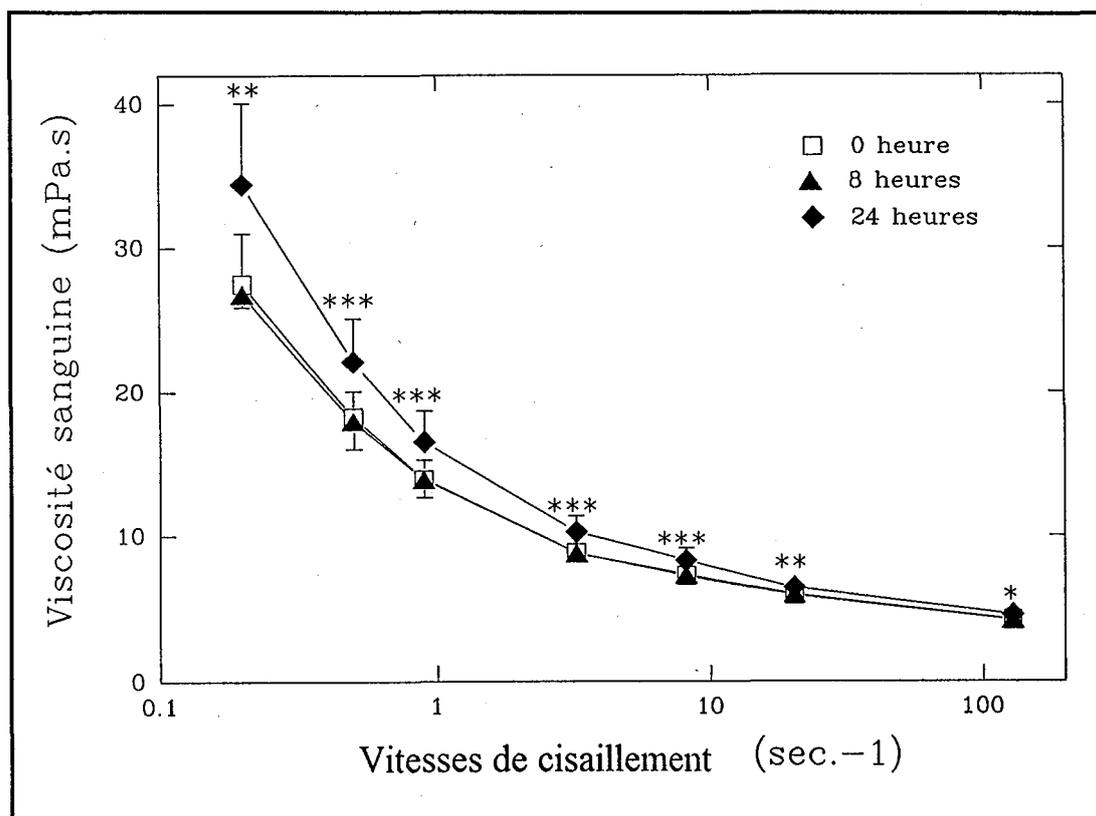
et une diminution très significative de l'indice de Myrenne. Les variations paraissent s'amplifier avec le temps. (Figures 86, 87)

En ce qui concerne les paramètres donnés par l'analyse de la rétrodiffusion laser, les résultats vont dans le sens de la diminution de l'agrégation avec en particulier une diminution très significative des seuils de désagrégation (Figure 88).

Tableau XIII : Influence de l'accélération lors d'une centrifugation (n=10)

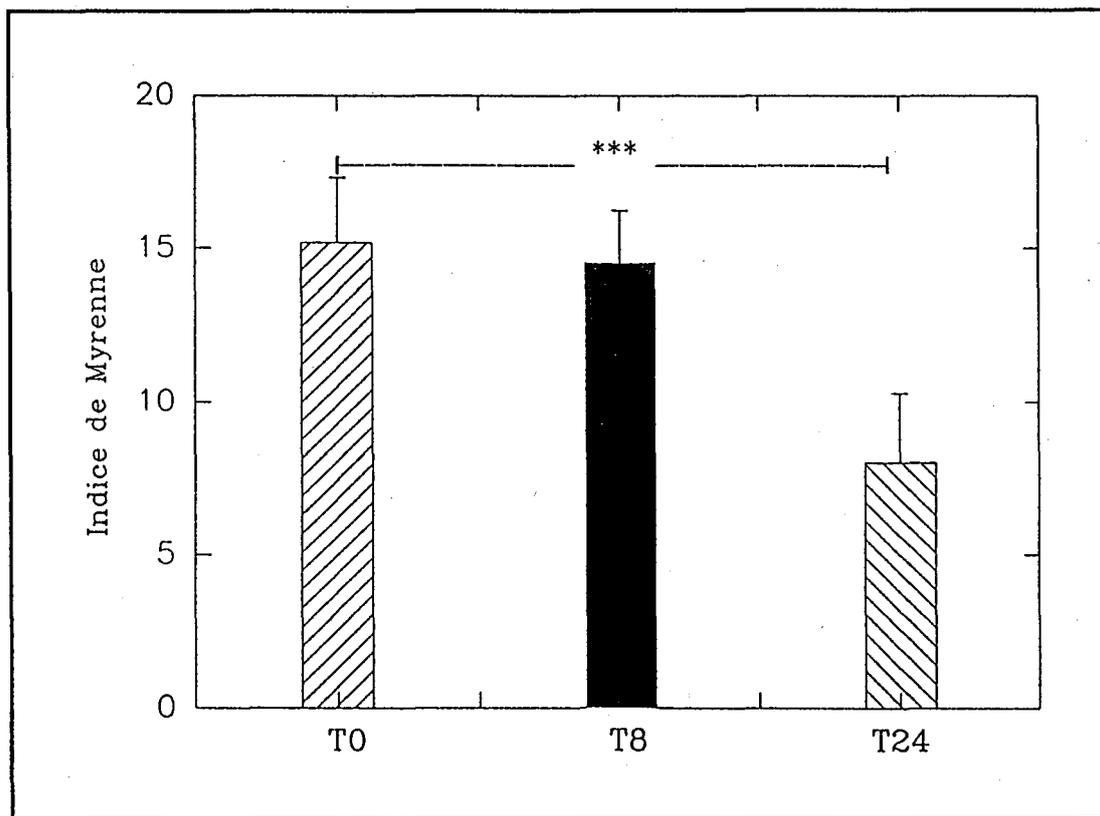
		0g (1)	600g	1300g	2500g (4)	test de Wilcoxon (1):(4)
Paramètre d'agrégation	tA (sec.)	2,57 ± 0,47	2,58	2,55	2,53 ± 0,47	NS
	tF (sec.)	29,7 ± 7,0	29,3	29,1	29,2 ± 6,6	NS
	S10	26,1 ± 3,7	26,4	26,3	26,4 ± 3,8	NS
	$\dot{\gamma}_D(\text{sec}^{-1})$	58,3 ± 10,6	58,8	58,5	58,6 ± 10,6	NS
	$\dot{\gamma}_S(\text{sec}^{-1})$	155 ± 38,9	142	144	143 ± 46,8	NS
Myrenne		15,66 ± 2,56	16,47	16,16	16,26 ± 2,57	NS
Vitesse de cisaillement (sec ⁻¹)	0,2	28,47 ± 5,11	27,30	26,67	28,85 ± 6,15	NS
	0,5	18,61 ± 2,16	18,25	18,19	18,91 ± 2,55	NS
	0,9	14,17 ± 1,66	14,16	14,15	14,55 ± 1,71	NS
	3,2	8,87 ± 0,67	8,92	8,92	9,07 ± 0,72	NS
	8,1	7,27 ± 0,46	7,33	7,36	7,54 ± 0,49	NS
	20,4	5,91 ± 0,35	5,96	6,02	6,11 ± 0,40	NS
	128,5	4,30 ± 0,30	4,37	4,44	4,40 ± 0,40	NS

* NS : non significatif



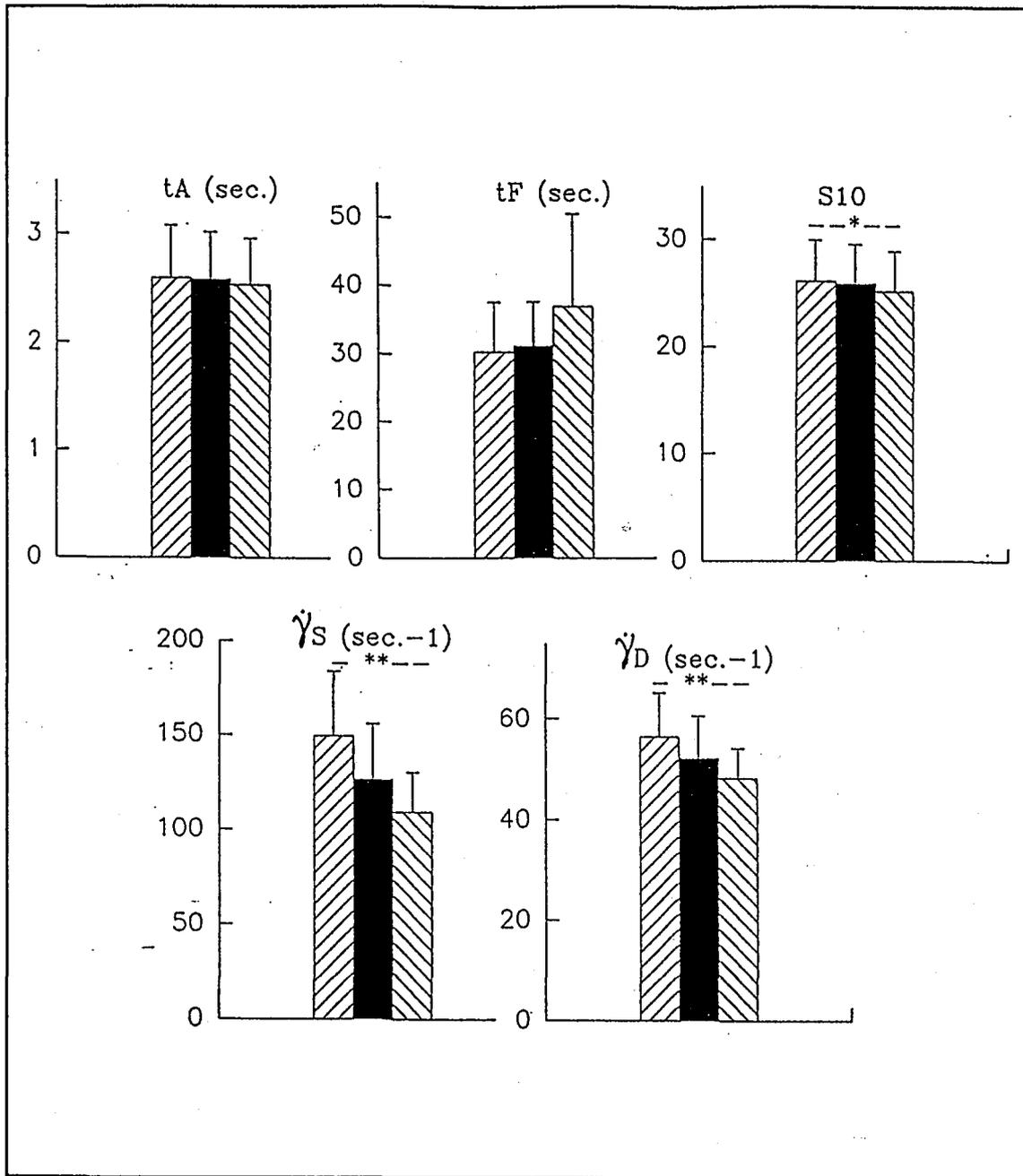
* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ($n = 10$)

Figure 86 : Influence du vieillissement de l'échantillon sur la viscosité sanguine en fonction de la vitesse de cisaillement.



*** $p < 0,001$ (n = 10)

Figure 87 : Influence du vieillissement de l'échantillon sur l'indice d'agrégation (Myrenne).



▨ 0 heure
 ■ 8 heures
 ▩ 24 heures

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ (n = 10)

Figure 88 : Influence du vieillissement de l'échantillon sur la cinétique et la cohésion des rouleaux d'hématies (Erythroagrégamètre).

IX. INFLUENCE DU TRAITEMENT D'HEMATIES PAR LA CHALEUR

Pour le traitement des hématies par la chaleur, une partie du sang est centrifugée à 1300g pendant 10 minutes. Le plasma est enlevé (et conservé) et est remplacé par le même volume de PBS afin que les protéines du plasma ne soient pas altérées par le chauffage. Les hématies suspendues dans le PBS sont incubées dans un bain - marie à 45°C pendant 30 minutes. Après une nouvelle centrifugation, le PBS est éliminé et les hématies traitées sont resuspendues dans le plasma de départ. L'hématocrite est ajusté à 0,40 l/l. L'échantillon ainsi préparé contenant 100% des hématies traitées par la chaleur, est mélangé avec le même prélèvement du sang non traité ajusté à hématocrite 0,40 l/l avec des proportions variables : 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% d'hématies traitées. Les mesures sont réalisées à 37°C.

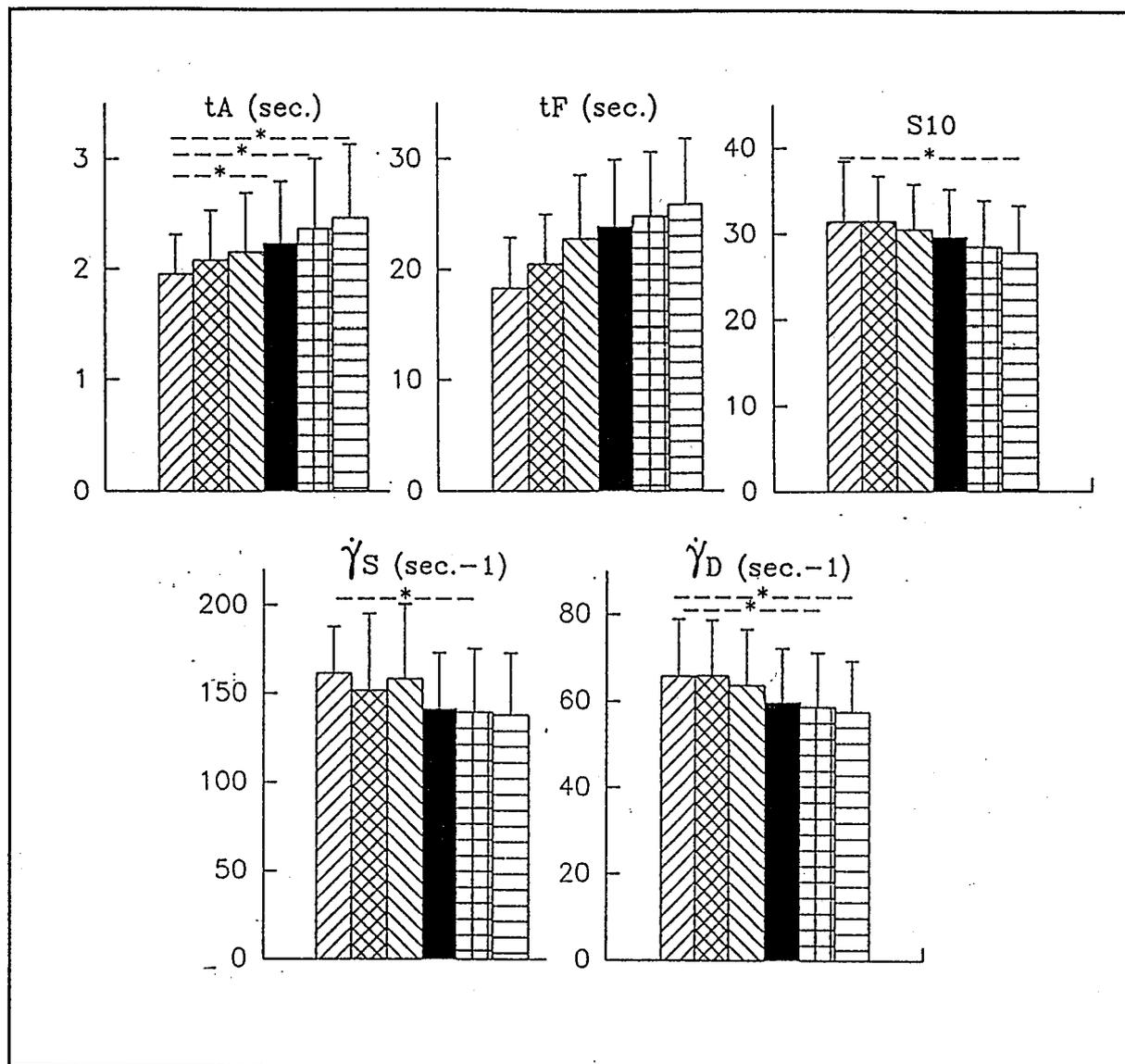
Les résultats de 5 expériences sont exprimés sous forme de moyenne \pm déviation standard. Le test t de Wilcoxon a été appliqué pour les comparaisons des échantillons de 0% des hématies traitées et les échantillons de 10%, 20%, 30%, 40% ou 50% des hématies traitées respectives.

Ils sont rassemblés sur le **Tableau XIV** et la **Figure 89**. On constate que le traitement des hématies par la chaleur provoque une augmentation du temps d'agrégation, une diminution du seuil de désagrégation et une légère diminution de l'indice de Myrenne qui traduisent une diminution d'agrégation des hématies. Les variations paraissent s'amplifier avec la proportion d'hématies chauffées, en particulier pour des proportions supérieures à 30%. Nous avons observé également une diminution de la viscosité sanguine, surtout aux vitesses de cisaillement entre $0,2 \text{ sec}^{-1}$ et $0,9 \text{ sec}^{-1}$.

Tableau XIV : Effet du traitement des hématies par la chaleur sur l'agrégation et sur la viscosité sanguine (n = 5)

hématies traitées (%)	0% (1)	10% (2)	20% (3)	30% (4)	40% (5)	50% (6)	(2):(1)	(3):(1)	(4):(1)	(5):(1)	(6):(1)	
Paramètre d'agrégation	tA (sec)	1,95 ±0,36	2,07 ±0,46	2,15 ±0,54	2,23 ±0,56	2,36 ±0,64	2,46 ±0,67	NS	NS	*	*	*
	tF (sec)	18,2 ±4,65	20,4 ±4,56	22,7 ±5,80	23,8 ±6,04	24,7 ±5,83	25,8 ±5,99	NS	NS	NS	NS	NS
	S10	31,36 ±7,11	31,44 ±5,30	30,48 ±5,32	29,66 ±5,55	28,52 ±5,41	27,82 ±5,54	NS	NS	NS	NS	*
	$\dot{\gamma}_D$ (sec ⁻¹)	65,7± 13,1	65,8 ±12,8	63,6 ±12,9	59,8 ±12,4	58,6 ±12,5	57,5 ±11,6	NS	NS	NS	*	*
	$\dot{\gamma}_S$ (sec ⁻¹)	161 ±26	151 ±43	158 ±42	141 ±31	139 ±36	138 ±34	NS	NS	NS	*	NS
Myrenne	17,38 ±3,19	17,78 ±2,24	17,54 ±3,04	17,94 ±3,99	16,68 ±3,11	16,50 ±3,11	NS	NS	NS	NS	NS	
Viscosité de cisaillement (sec ⁻¹)	0,204	29,02 ±2,40	28,46 ±3,58	28,04 ±1,75	27,18 ±2,79	25,50 ±2,48	25,80 ±2,77	NS	NS	*	**	**
	0,512	20,08 ±2,35	19,56 ±2,67	19,56 ±1,59	18,38 ±2,09	17,66 ±1,87	17,56 ±1,98	*	*	**	**	***
	0,945	15,50 ±1,72	15,14 ±1,98	15,26 ±1,44	14,44 ±1,51	13,88 ±1,37	13,74 ±1,37	NS	NS	**	**	**
	3,200	9,48 ±0,86	9,36 ±0,84	9,60 ±0,85	9,32 ±0,89	9,08 ±0,73	8,80 ±0,59	NS	NS	NS	NS	*
	8,100	7,60 ±0,44	7,58 ±0,44	7,78 ±0,40	7,46 ±0,29	7,54 ±0,50	7,30 ±0,35	NS	*	NS	NS	NS
	20,40	6,12 ±0,26	6,18 ±0,29	6,26 ±0,23	6,04 ±0,22	6,10 ±0,32	5,92 ±0,31	NS	*	NS	NS	*
	128,5	4,46 ±0,27	4,48 ±0,29	4,54 ±0,27	4,24 ±0,51	4,46 ±0,26	4,34 ±0,27	NS	NS	NS	NS	*

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; NS : non significatif



* p < 0,05 n = 5

- 0% des hématies traitées
- 10% des hématies traitées
- 20% des hématies traitées
- 30% des hématies traitées
- 40% des hématies traitées
- 50% des hématies traitées

Figure 89 : Influence du traitement des hématies par la chaleur sur les paramètres d'agrégation (Erythroagrégamètre)

X. DISCUSSION

Ces expérimentations préliminaires nous ont permis de nous familiariser avec les techniques rhéologiques.

Nous avons mis à profit cet apprentissage pour envisager l'influence d'un certain nombre de paramètres et tester la sensibilité des méthodes.

Dans un certain domaine ($\leq 2,500$ g) l'accélération n'induit pas des modifications notables de l'agrégation érythrocytaire et de la viscosité sanguine.

Par conséquent, les différentes centrifugations exigées par la préparation des échantillons n'altèrent pas les hématies.

En ce qui concerne le rôle du vieillissement de l'échantillon, une diminution de l'agrégation est observée avec une sensibilité du système Myrenne apparemment supérieure à celle de l'Erythroagrégamètre. Toutefois, ce système permet de préciser que la cinétique d'agrégation est peu affectée. Par contre, la cohésion des rouleaux reflétée par les seuils de désagrégation est diminuée. Paradoxalement, la viscosité sanguine au cours du vieillissement de l'échantillon apparaît significativement augmentée et nous n'avons pu expliquer ce résultat.

Quoi qu'il en soit, étant donné l'influence du vieillissement de l'échantillon sur les paramètres d'agrégation, nous avons effectué les déterminations dans un délai de 4 heures après le prélèvement.

En ce qui concerne l'influence d'une proportion croissante d'hématies rigidifiées par la chaleur dans une suspension sanguine, une diminution progressive de l'agrégation est

observée. L'Erythroagrégamètre montre une sensibilité supérieure à celle du Myrenne, la cinétique de formation des rouleaux étant essentiellement affectée. Il est possible que ces différences soient liées au fait que l'indice Myrenne est global et traduit non seulement la cinétique d'agrégation mais également d'autres facteurs.

Ces résultats sont en accord avec les observations de PIGNON et coll (164) qui ont observé une diminution de l'agrégation érythrocytaire lors du vieillissement de l'échantillon et lors du traitement des hématies par la chaleur.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur POTRON Gérard, Professeur , CHUR HOPITAL-REIMS.

**Madame LACOMBE Catherine, Maître de Conférence, CHU Pitié
Salpêtrière PARIS.**

Madame PAULUS Francine, Docteur Sciences, BLENOD les TOUL.



Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame WENG Xiaoduan

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Mécanismes d'action des produits de contraste sur l'agrégation
erythrocytaire - étude in vitro par des méthodes optiques."**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"GÉNIE BIOLOGIQUE"**

Fait à Vandoeuvre le, **13 Septembre 1994**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS

A handwritten signature in black ink is written over a circular stamp. The stamp contains the text 'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE NANCY' around the perimeter and a small star at the bottom.

ABSTRACT

The red blood cell aggregation is an essential parameter determining the non-Newtonian rheological behavior of blood and it has been widely studied within the fields of methodological, experimental and clinical aspects. However, the mechanisms of the red cell "rouleaux" and aggregates formation are very complex and many points remain to be elucidated in both fundamental aspects and methodological approaches.

Our work consisted of several actions which have been conducted simultaneously :

Two methodological actions with the aim to improve the quantification of erythrocyte aggregation and to approach, in the case of "*in vitro*" investigations , the conditions of aggregation which could be observed "*in vivo*".

First, we have studied the role of a pulsatile flow on the kinetics of RBC aggregation at different amplitudes, frequencies and shear rates.

Second, we have undertaken the adaptation and the validation of an image analysis software to quantify aggregation in terms of aggregate structures. We have evaluated the possible relations between the parameters obtained by image analysis and by laser backscatter measurements.

Finally, an action has been devoted to investigate the role of radiographic ionic and nonionic contrast media on the red blood cell aggregation. These products induce some severe side effects : thrombophlebits or hemorrhagical accidents which may be due to alterations of rheological properties. Some complementary approaches by spectroscopical methods were carried out at the microscopic and molecular levels and allowed to precise the role of contrast media.

Key-words : Erythrocyte aggregation. Pulsatile flow. Image analysis. Ionic and nonionic contrast media. Laser backscatter. Fluorescence quenching. Cellular electrophoresis.

RESUME

L'agrégation des hématies est un paramètre essentiel du comportement rhéologique non-newtonien du sang et a fait l'objet d'un grand nombre de recherches méthodologiques, expérimentales et cliniques. Toutefois, les mécanismes de formation des rouleaux et des agrégats en présence de macromolécules endogènes ou exogènes sont très complexes et de nombreux points restent encore à élucider tant sur le plan des aspects fondamentaux que des approches méthodologiques.

Notre travail de thèse a comporté plusieurs types d'action qui ont été menées parallèlement :

- Deux actions méthodologiques visant à améliorer la quantification de l'agrégation érythrocytaire et à approcher lors d'investigations "*in vitro*" les conditions d'agrégation qui pourraient être observées "*in vivo*".

C'est ainsi que nous avons été amené à étudier le rôle d'un cisaillement pulsé sur la cinétique de formation des rouleaux dans des conditions d'amplitude, de fréquence de pulsation et de vitesses de cisaillement variables.

La sensibilité du système expérimental mis en jeu a permis de mettre en évidence des modifications discrètes de la cinétique d'agrégation dans des conditions de cisaillement bien précises. Toutefois, les mécanismes qui conditionnent ces variations de la cinétique de formation des rouleaux doivent être approfondis.

Par ailleurs, les méthodes optiques telles que la rétrodiffusion laser ne permettent pas d'apprécier la morphologie des rouleaux et agrégats d'hématies, paramètre qui peut avoir une importance fondamentale au niveau de l'écoulement sanguin dans la microcirculation. Aussi, nous avons entrepris l'adaptation et la validation d'un logiciel d'analyse d'images pour la quantification de l'agrégation en termes de structure des rouleaux et agrégats et l'étude des relations possibles entre le paramètre donné par l'analyse d'images et ceux obtenus avec l'analyse de la rétrodiffusion laser.

- Le deuxième type d'action a été consacré à l'étude du rôle des produits de contraste ionique et non ioniques sur l'agrégation érythrocytaire, l'administration de ces produits pouvant entraîner des effets secondaires sévères : accidents thromboemboliques ou hémorragiques. L'interaction *in vitro* des hématies avec des produits de contraste monomères non ioniques a montré un effet légèrement hypoagrégant de ces milieux. Par contre, un produit de contraste dimère ionique entraîne une augmentation de l'agrégation des hématies. La technique d'analyse d'images a confirmé les résultats obtenus par rétrodiffusion laser. Des investigations en fluorescence en utilisant le quenching de l'iode contenu dans les milieux de contraste ont montré que l'interaction des produits de contraste ionique et non ioniques avec la membrane de l'hématie était différente. Enfin, la mesure de la charge électrique de surface par électrophorèse cellulaire a révélé une diminution de la charge électrique après interaction avec le produits de contraste ionique, phénomène qui pourrait expliquer en partie l'augmentation de l'agrégation des hématies. Ainsi, des approches par des méthodes spectroscopiques au niveau microscopique et moléculaire ont permis de préciser le rôle des produits de contraste.

Mots Clefs : agrégation des hématies, cisaillement pulsé, analyse d'image, produits de contraste ionique et non ioniques, rétrodiffusion laser, inhibition de fluorescence, électrophorèse cellulaire.