

# UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I

Institut Gilbert Laustriat

UMR CNRS 7175-LC1 – Faculté de Pharmacie

**Thèse**

**Pour obtenir le grade de**

**Docteur de l'Université Louis Pasteur**

**Discipline : Sciences Pharmaceutiques**

**Spécialité : Biochimie**

Présentée par

**Papa Madièye GUEYE**

**« Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge »**

soutenue publiquement le 31 janvier 2007

## **Membres du jury**

Docteur <b>Guy DUPORTAIL,</b>	Strasbourg	Président de jury
Professeur <b>Jean-Marc LESSINGER,</b>	Strasbourg	Directeur de thèse
Docteur <b>Guy DUPORTAIL,</b>	Strasbourg	Rapporteur interne
Professeur <b>Alain LEGRAND,</b>	Paris	Rapporteur externe
Professeur <b>Jacques BIENVENU,</b>	Lyon	Rapporteur externe
Docteur <b>Christian BOUDIER,</b>	Strasbourg	Examineur

# Sommaire

	<i>Pages</i>
Remerciements .....	6
Listes des abréviations et des principaux symboles .....	8
Liste des figures et tableaux .....	10
Introduction générale .....	13
Première partie : Généralités sur le stress oxydant et ses marqueurs ...	15
I. Introduction .....	16
II. Systèmes oxydants et systèmes anti-oxydants .....	17
II. 1. Radicaux libres Biologiques .....	17
II. 1. 1. Définition .....	17
II. 1. 2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène .....	17
II. 2. Systèmes de défenses anti-oxydants .....	21
II. 2. 1. Systèmes enzymatiques .....	21
II. 2. 2. Systèmes non enzymatiques .....	24
III. Le stress oxydant .....	26
III. 1. Définition du stress oxydant .....	26
III. 2. Marqueurs biologiques du stress oxydant .....	27
III. 2. 1. Mesure des radicaux libres .....	28
III. 2. 2. Mesure des systèmes anti-oxydants .....	29
III. 2. 3. Marqueurs de la peroxydation lipidique .....	33
III. 2. 4. Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés .....	40
III. 2. 5. Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques .....	41
III. 2. 6. Quel est le meilleur marqueur pour évaluer le stress oxydant ? .....	43
III. 3. Stress oxydant et maladies .....	48
IV. Conclusion .....	50
Deuxième partie : généralités sur l'haptoglobine .....	52
I. Introduction .....	53
II. Structure de l'haptoglobine .....	54
II. 1. Structure du gène de l'haptoglobine .....	54
II. 2. Structure de la protéine .....	56
II. 2. 1. Structure primaire et structure secondaire.....	56
II. 2. 2. Analogies structurales de l'haptoglobine avec d'autres protéines .....	60
III. Propriétés physicochimiques .....	61
III. 1. Propriétés électrophorétiques .....	61
III. 2. Solubilité .....	62
III. 3. Composition en acides aminés .....	62
III. 4. Masses moléculaires .....	64
IV. Synthèse de l'haptoglobine .....	65

V.	Distribution géographique .....	70
VI.	Propriétés fonctionnelles de l'haptoglobine .....	72
VI. 1.	Fixation de l'hémoglobine .....	72
VI. 2.	Protection contre les radicaux libres .....	74
VI. 3.	Influence sur le statut en fer .....	75
VI. 4.	Inhibition de l'activité vasoconstrictrice de l'hémoglobine .....	77
VI. 5.	Inhibition de la synthèse des prostaglandines .....	78
VI. 6.	Rôle de l'haptoglobine dans la modulation du système immunitaire .....	79
VI. 7.	Haptoglobine et angiogenèse .....	81
VI. 8.	Activité antibactérienne de l'Hp .....	83
VII.	Aspects cliniques de laboratoire .....	83
VII. 1.	Détermination des concentrations d'haptoglobine .....	84
VII. 2.	Détermination des phénotypes d'haptoglobine .....	85
VII. 3.	Haptoglobine comme marqueur .....	86
VIII.	Conséquences cliniques du polymorphisme de l'haptoglobine .....	88
VIII. 1.	Maladies cardiovasculaires et polymorphisme de l'haptoglobine .....	88
VIII. 2.	Diabète et polymorphisme de l'haptoglobine .....	89
VIII. 3.	Maladies infectieuses et polymorphisme de l'haptoglobine .....	90
VIII. 4.	Polymorphisme de l'haptoglobine et autres pathologies .....	91
IX.	Conclusion .....	93

## Troisième partie : Phénotypage et Purification de l'haptoglobine ..... 94

I.	Introduction .....	95
II.	Matériels et Méthodes .....	97
II. 1.	Spécimens .....	97
II. 2.	Phénotypage de l'haptoglobine .....	98
II. 2. 1.	Tampons .....	98
II. 2. 2.	Plaques de gel de polyacrylamide .....	98
II. 2. 3.	Préparation des plasmas .....	98
II. 2. 4.	Migration .....	99
II. 2. 5.	Révélation .....	99
II. 3.	Purification de l'haptoglobine humaine .....	99
II. 3. 1.	Source utilisée pour la purification de l'haptoglobine humaine .....	99
II. 3. 2.	Choix de la matrice .....	100
II. 3. 3.	Quantification de l'Hp au cours de la purification .....	100
II. 3. 4.	Protocole de purification .....	101
II. 3. 5.	Détermination des masses moléculaires relatives des phénotypes d'haptoglobine .....	103
II. 3. 6.	Evaluation de la pureté .....	107
II. 3. 7.	Dosage de l'haptoglobine après purification .....	108
III.	Résultats .....	108
III. 1.	Identification des phénotypes d'haptoglobine .....	108
III. 1. 1.	Identification de l'Hp 1-1 .....	109
III. 1. 2.	Identification de l' Hp 2-1 .....	110
III. 1. 3.	Identification de l' Hp 2-2 .....	111
III. 2.	Fréquences des phénotypes d'haptoglobine .....	111
III. 3.	Purification de l'haptoglobine .....	112
III. 3. 1.	Rendement et degré de purification .....	112
III. 3. 2.	Masses moléculaires des phénotypes d'Hp .....	113
IV.	Discussion .....	114
V.	Conclusion .....	120

Quatrième partie : Interaction entre les phénotypes de l’haptoglobine et l’hémoglobine. Conséquences sur la détermination de l’haptoglobine en biologie médicale ..... 122

I.	Introduction .....	123
II.	Interactions de l’hémoglobine avec l’haptoglobine .....	125
II. 1.	Contexte et objectifs de l’étude .....	125
II. 2.	Matériels et Méthodes .....	127
II. 2. 1.	Détermination des constantes d’équilibre de dissociation grâce au pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb .....	128
II. 2. 2.	Calorimétrie par titration isotherme (ITC) .....	129
II. 3.	Résultats .....	133
II. 3. 1.	Détermination des constantes d’équilibre de dissociation apparentes par la méthode enzymatique .....	133
II. 3. 2.	Investigation en microcalorimétrie .....	134
III.	Conséquences de l’interaction haptoglobine/hémoglobine sur la détermination de l’haptoglobine en biochimie clinique .....	140
III. 1.	Matériels et méthodes .....	141
III. 2.	Résultats .....	142
III. 2. 1.	Effet de la coagulation sur la concentration d’Hb libre et sur la mesure d’Hp .....	142
III. 2. 2.	Effet d’une surcharge en Hb sur la mesure de l’haptoglobine .....	142
III. 2. 3.	Effet du degré d’hémolyse sur la mesure d’Hp .....	145
III. 2. 4.	Effet de l’héparinate de lithium sur la mesure d’Hp en IN .....	146
III. 3.	Discussion .....	147
IV.	Conclusion .....	148

Cinquième partie : Stress oxydant induit par l’hémoglobine libre sur le globule rouge et effet protecteur des phénotypes de l’haptoglobine humaine ..... 150

I.	Introduction .....	151
I. 1.	Auto-oxydation de l’hémoglobine .....	153
I. 2.	Réaction de l’oxyhémoglobine avec l’eau oxygénée .....	154
I. 3.	Liaison de l’hémoglobine avec le NO .....	155
II.	Contexte et objectifs de l’étude .....	155
III.	Matériels et Méthodes .....	157
III. 1.	Préparation et quantification de l’haptoglobine .....	157
III. 2.	Isolement des globules rouges conservés dans une solution SAGM .....	158
III. 2. 1.	Composition de la solution Sodium Adénine Glucose Mannitol (SAGM) .....	158
III. 2. 2.	Préparation des globules rouges en suspension dans la solution SAGM .....	159
III. 3.	Préparation de membranes de globules rouges .....	159
III. 3. 1.	Réactifs .....	159
III. 3. 2.	Collecte de sang et lavage des globules rouges .....	160
III. 3. 3.	Préparation des membranes .....	160
III. 3. 4.	Dosage des protéines membranaires .....	161
III. 4.	Marqueurs de peroxydation lipidique membranaire .....	161
III. 4. 1.	Détermination des diènes .....	161
III. 4. 2.	Détermination des TBARS .....	162

III. 5.	Marqueurs d'altération de la perméabilité des membranes de globules rouges .....	163
III. 6.	Statistiques .....	164
IV.	Résultats .....	165
IV. 1.	Effet de l'haptoglobine sur la peroxydation lipidique des membranes des globules rouges évaluée par la formation des diènes conjugués .....	165
IV. 1. 1.	Détermination des conditions optimales d'étude .....	165
IV. 1. 2.	Effet protecteur des phénotypes d'Hp .....	167
IV. 2.	Effet de l'haptoglobine sur la peroxydation lipidique des membranes des globules rouges évaluée par la formation des TBARS .....	168
IV. 2. 1.	Détermination des conditions optimales d'étude .....	168
IV. 2. 2.	Effet protecteur des phénotypes d'Hp .....	169
IV. 3.	Effet de l'haptoglobine sur la perméabilité membranaire des globules rouges conservés dans une solution de conservation (SAGM) .....	170
V.	Discussion .....	173
VI.	Conclusion .....	178

## Sixième partie : Qualité des globules rouges re-transfusés en récupération sanguine péri-opératoire .....

180

I.	Introduction .....	182
I. 1.	Principe et dispositifs techniques utilisés .....	182
I. 1. 1.	Principe .....	182
I. 1. 2.	Dispositifs techniques utilisés .....	183
I. 2.	Contexte de l'étude .....	186
I. 3.	Démarche expérimentale et paramètres étudiés .....	187
II.	Spécimens et Méthodes .....	188
II. 1.	Spécimens .....	188
II. 2.	Méthodes .....	189
II. 2. 1.	Dosage de l'hémoglobine extraérythrocytaire .....	189
II. 2. 2.	Dosages des marqueurs biochimiques dans le plasma .....	189
II. 2. 3.	Dosage des thiols non protéiques (NPSH) dans le sang total .....	190
II. 2. 4.	Préparation des membranes de globules rouges .....	191
II. 2. 5.	Marqueurs du stress oxydant dans les membranes de globules rouges .....	192
II. 2. 6.	Paramètres mécaniques du globule rouge .....	194
III.	Résultats .....	196
III. 1.	Hémoglobine extra-érythrocytaire des patients et des poches .....	196
III. 2.	Haptoglobine et orosomucoïde des plasmas de patients .....	197
III. 3.	Thiols non protéiques (NPSH) du sang des patients et des poches d'autotransfusion .....	198
III. 4.	Marqueurs de stress oxydant dans les membranes de globules rouges .....	199
III. 5.	Etude des paramètres mécaniques .....	202
III. 5. 1.	Fragilité osmotique .....	202
III. 5. 2.	Fluidité membranaire des globules rouges .....	203
III. 6.	Marqueurs de perméabilité membranaire .....	205
IV.	Discussion .....	206
V.	Conclusion .....	214

## Conclusion générale .....

217

Références bibliographiques .....	219
Annexes .....	246
Publications .....	247

## Remerciements

### A mes Juges

#### - Le Professeur Jean-Marc LESSINGER

Je voudrais vous remercier de m'avoir accueilli au sein de votre équipe et de m'avoir confié ce sujet de thèse à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. Vous avez su nous transmettre, avec beaucoup de passion, tout l'amour que vous portez à la recherche. Votre compétence et vos éminentes qualités humaines nous ont séduites. Ces années passées dans votre laboratoire auront été pour nous une expérience unique et enrichissante, tant du point de vue scientifique qu'humain. Soyez assuré de notre vive reconnaissance et de notre profond attachement.

#### - Aux Docteurs Guy DUPORTAIL et Christian BOUDIER

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail nous a profondément touché. Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la recherche sont pour nous une source de motivation supplémentaire pour la suite de notre carrière. Recevez ici, toute notre gratitude et toute notre reconnaissance pour votre disponibilité cordiale, vos conseils pratiques, techniques et scientifiques durant nos travaux de thèse. Merci.

#### - Aux Professeurs Alain LEGRAND et Jacques BIENVENU

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger et d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Le seul fait de vous avoir rencontré constitue pour nous un immense privilège. Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la science forcent le respect et l'admiration. Toute notre reconnaissance.

### A tous ceux qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce travail

#### Au Professeur Georges FERARD et au Docteur Ibrahima SALL

Mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli et transmis avec beaucoup de patience, de générosité toute la passion de la recherche qui vous habite. Avec vous, nous avons pu perfectionner notre sens analytique tant sur le plan de la recherche fondamentale que dans le domaine de la biologie médicale. Vous nous avez toujours conseillé et orienté au cours de notre formation. Je ne pourrai jamais vous remercier assez pour votre apport au cours de ces travaux de thèse. Votre bureau nous a toujours été ouvert. Merci.

**Au Professeur Claude Kedinger, au Docteur Ken Takeda, au Professeur Yves Mely**

Pour nous avoir accueilli et nous avoir permis de réaliser dans de bonnes conditions nos travaux de Thèse au sein de l'institut Gilbert-Laustriat..

**Au Docteur Clarisse Maechling et Docteur Nicole Glasser**

Pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre aide si bien importante pour mes travaux de microcalorimétrie et mes analyses statistiques. Eternelle reconnaissance.

**A l'ensemble du personnel administratif et technique de L'UMR 7034 : Marylyse, Ingrid, Jean Michel Lantz.** Merci pour tout.

**Au Dr Claude Schneider,** Merci pour tout.

**Au Docteur Françoise Bertrand et à toute l'équipe d'Anesthésie -Réanimation du CTO**

Votre collaboration a été capitale. Merci.

**A tout le personnel du Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.** Pour votre patience et votre compréhension.

**Aux Prs P. Amadou Diop, Aynina Cissé, Lopez-Sall et au Dr Rokhaya Ndiaye Diallo**

**Au Pr Alioune Dièye et Dr M.S.Niang**

**A mes parents, frères et sœurs**

**A mon épouse Kiné et à mes filles Laïssa et Sora, :** pour votre patience, votre assistance et votre compréhension.

**A Papa Abdoulaye Lô, Cheikh Gning, Mansour diène, M<sup>r</sup> Kouly Mbaye et M<sup>me</sup> Aminata Diagne Mbaye, Ousmane Ka, Yacine, toute ma belle famille et tout le reste que je ne saurais nommer.**

**A tout le personnel de l'EGIDE :** Pour votre disponibilité et votre assistance.

**A tout le personnel du laboratoire du Centre de Traumatologie d'Ilkirch**

**Liliane, Alexandrine, Martine, Elisabeth, Lise, Karine, Françoise, Alain, Irène, Zineb, Denis.** Pour toutes ces années passées avec vous au niveau du laboratoire du CTO.

Aux internes (**Zak, Mor, Emmanuel, Ahmed, Gora, Christelle, Géraldine, Susie, Stéphane**) pour ce petit bout de chemin parcouru ensemble.

**A Modou Oumy kane,** pour toutes ces choses partagées ici et ailleurs.

**A Mamadou Ndiaye, Gata Y Sy et Mamadou Sarr** pour avoir bien assuré les devants.

**A Ameth Fall, Cheikh, Mbaye Diop, Astou et Famille, Bocar, Mandiaye, Saliou, Ndeye Fatou, Adia, Fama, Jean Marie et à tous les ami(e)s que je ne pourrais citer ici.**



## Listes des abréviations et des principaux symboles

AAPH	2,2' azobis (amidinopropane) dihydrochloride
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALT	Alanine aminotransférase
ALS	Amyotrophy Lateral Sclerosis (sclérose latérale amyotrophique)
ANDEM	Agence Nationale pour le Développement de l'Evaluation Médicale
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome (syndrome de détresse respiratoire aiguë)
ATP	Adénosine Triphosphate
CD	Cluster of Differentiation
CG-SM	Chromatographie en phase Gazeuse associée à une détection par Spectrométrie de Masse.
CGR	Concentrés de Globules Rouges
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CuZnSOD	Superoxyde dismutase à cuivre et zinc
DPH	1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
DNPH	2,4-dinitrophénylhydrazine
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (calorimétrie différentiel à balayage)
EDRF	Endothelium Derived Releasing Factor (facteur relaxant dérivé de l'endothélium)
EFS	Etablissement Français du Sang
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ERN	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
GPx	Glutathion peroxydase
GMPc	Guanosine 3', 5' monophosphate cyclique
GR	Glutathion réductase
HAS	Haute Autorité de Santé
Hp	Haptoglobine
Hb	Hémoglobine
Hp-Hb	Complexe haptoglobine-hémoglobine
Hp1S, HP1F, HP2	Allèles 1S, 1F, 2 du gène de l'haptoglobine
Hsp	Heat-shock protein (protéine de choc thermique)
4-HNE	4-hydroxy-2-nonéal
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry (Fédération Internationale de Chimie Clinique)
8-iso-PGF <sub>2α</sub>	8-iso-prostaglandine deux alpha

IL	Interleukine
IL-6DBP	Interleukin-6 - dependent-binding protein (protéine de liaison dépendante de l'interleukine-6)
IN	Immunonéphélométrie
ITC	Isothermal Titration Calorimetry (calorimétrie isotherme à titration)
IgG	Immunoglobuline G
K <sub>a</sub>	Constante d'équilibre d'association
K <sub>as</sub>	Constante de vitesse d'association
K <sub>d</sub>	Constantes d'équilibre de dissociation
K <sub>dis</sub>	Constantes de vitesse de dissociation
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low density lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)
LOOH	Hydroxyde lipidique
MDA	Malonedialdéhyde (dialdéhyde malonique)
MnSOD	Superoxyde dismutase à manganèse
mRNA	Acide ribonucléique messenger
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH,H <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
NPSH	Non-protein thiols (thiols non protéiques)
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superoxyde (anion superoxyde)
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxygène singulet
ONOOH	Nitroperoxyde
•OH	Radical hydroxyle
PBS	Phosphate Buffer Saline
PG	Prostaglandine
pro-Hp	Pro-haptoglobine
RO <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical peroxyde
RPE	Résonance para-électronique
RSPO	Récupération sanguine péri-opératoire
SAGM	Sodium-Adénine-Glucose-Mannitol
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SOD	Superoxyde dismutase
SPR	Surface plasmon résonance (résonance plasmonique de surface)
TEMED	N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine
TBARS	Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
TNF-α	Tumor necrosis factor- α (facteur nécrosant de tumeur α)
TRAP	Total radical trapping parameter (pouvoir total anti-oxydant du plasma)
Trx	Thiorédoxine
UV	Ultraviolet
VEGF	vascular endothelial growth factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

## Listes des Figures

- Figure 1 : Principales sources cellulaires des radicaux libres.
- Figure 2 : Déséquilibre de la balance entre anti-oxydants et pro-oxydants.
- Figure 3 : Principaux marqueurs de la peroxydation et leurs méthodes de dosage.
- Figure 4 : Réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique.
- Figure 5 : Structures de la PGF2  $\alpha$  et de l'isoprostane iso-PGF2  $\alpha$ .
- Figure 6 : Mesure des dommages de l'ADN par la méthode des comètes.
- Figure 7 : Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant.
- Figure 8 : Polypeptides codés par les allèles de l'haptoglobine.
- Figure 9 : Représentation schématique de la structure des 3 phénotypes de l'haptoglobine.
- Figure 10 : Représentation schématique des phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine.
- Figure 11 : Modèle électrophorétique typique des phénotypes d'haptoglobine.
- Figure 12 : Schéma illustrant la stimulation de la synthèse de l'haptoglobine par l'IL6.
- Figure 13 : Synthèse de l'haptoglobine 1 (Hp1).
- Figure 14 : Représentation schématique de la fixation de l'hémoglobine par l'Hp 1-1 et l'élimination du complexe par fixation sur le récepteur CD163.
- Figure 15 : Rôle du génotype de l'haptoglobine dans la modulation de la réponse des macrophages dans un contexte d'hémorragies.
- Figure 16 : Séquences de purification de l'haptoglobine.
- Figure 17 : Droite d'étalonnage de la colonne pour la détermination des masses moléculaires.
- Figure 18 : Profils électrophorétiques des phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine.
- Figure 20 : Microcalorimètre ITC.
- Figure 21 : Exemple d'une courbe obtenue par ITC.
- Figure 22 : Variation d'absorbance des complexes de l'hémoglobine avec les phénotypes d'haptoglobine.
- Figure 23 : Courbes de titration des phénotypes d'Hp par l'hémoglobine.
- Figure 24 : Effet d'une surcharge en hémoglobine sur le dosage de l'Hp en immunonéphélométrie selon les phénotypes.
- Figure 25 : Relation entre la différence des concentrations sériques (Se) et plasmatiques (Pl) en hémoglobine libre et en haptoglobine.

- Figure 26 : Représentation schématique de l'oxydation et de la réduction de l'hémoglobine dans le globule rouge et dans l'environnement extracellulaire.
- Figure 27 : Oxydation des lipides membranaires par l'hémoglobine suivie par la formation des diènes conjugués.
- Figure 28 : Formation des diènes conjugués en fonction des concentrations en hémoglobine.
- Figure 29 : Effets protecteurs des phénotypes d'haptoglobine sur la formation des diènes conjugués induite par l'hémoglobine sur les membranes de globules rouges.
- Figure 30 : Influence de la concentration d'Hb sur la formation des TBARS.
- Figure 31 : Effets protecteurs des phénotypes d'haptoglobine sur la formation des TBARS induite par l'hémoglobine sur les membranes de globules rouges.
- Figure 32 : Inhibition de la libération de potassium et de LDH par les globules rouges en présence de chaque phénotype d'haptoglobine.
- Figure 33 : Principe de fonctionnement d'un récupérateur de sang sans lavage dont le système aspiratif utilise une pompe.
- Figure 34 : Principe de fonctionnement d'un récupérateur de sang avec concentration-lavage.
- Figure 35 : Hémoglobine libre chez les patients et dans les poches d'autotransfusion.
- Figure 36 : Haptoglobine et orosomucoïde chez les patients avant et après autotransfusion.
- Figure 37 : Thiols non protéiques chez les patients et dans les poches d'autotransfusion.
- Figure 38 : Diènes conjugués dans les membranes de globules rouges des patients et des poches d'autotransfusion.
- Figure 39 : TBARS dans les membranes de globules rouges des patients et des poches d'auto-transfusion.
- Figure 40 : Protéines carbonylées dans les membranes des globules rouges des patients et des poches d'autotransfusion.
- Figure 41 : Fragilité osmotique des globules rouges des patients et des poches à re-transfuser.
- Figure 42 : Anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans les membranes de globules rouges.
- Figure 43 : Anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans les membranes de globules rouges des patients et des poches à re-transfuser.
- Figure 44 : Dosage du potassium dans le milieu extracellulaire des différents spécimens.
- Figure 45 : Dosage de la LDH dans le milieu extracellulaire des différents spécimens

## Liste des Tableaux

- Tableau I : Principaux marqueurs biologiques du stress oxydant.
- Tableau II : Composition en acides aminés des chaînes alpha et bêta de l'haptoglobine.
- Tableau III : Principales propriétés physiques et valeurs de référence des phénotypes d'Hp.
- Tableau IV : Distribution géographique des phénotypes d'haptoglobine.
- Tableau V : Propriétés fonctionnelles des phénotypes d'haptoglobine.
- Tableau VI : Conséquences cliniques liées au polymorphisme de l'haptoglobine.
- Tableau VII : Masses moléculaires des marqueurs utilisés pour l'étalonnage de la colonne.
- Tableau VIII : Proportion des trois phénotypes dans une population de 312 patients.
- Tableau IX : Résultats de la purification de l'haptoglobine.
- Tableau X : Masses moléculaires apparentes des phénotypes d'haptoglobine déterminées par gel filtration.
- Tableau XI : Constantes d'équilibre de dissociation des complexes formés entre les phénotypes d'haptoglobine et l'hémoglobine.
- Tableau XII : Concentrations sériques et plasmatiques d'hémoglobine libre et d'haptoglobine chez 27 adultes.
- Tableau XIII : Effet de l'héparinate de lithium sur la mesure de l'Hp en IN.

## Introduction générale

L'hémoglobine extra-érythrocytaire est apparue ces dernières années comme un médiateur important de maladies du système vasculaire. La toxicité et la nature inflammatoire de l'hémoglobine libre sont liées à sa capacité à diminuer la disponibilité du monoxyde d'azote et à médier la production de composés hautement réactifs comme les radicaux superoxydes et hydroxyles. Le premier mécanisme de défense de l'organisme contre les effets délétères de l'hémoglobine est constitué par l'haptoglobine. Cette protéine fixe de manière stable l'hémoglobine et inhibe en grande partie sa capacité oxydante. La formation du complexe de l'hémoglobine avec l'haptoglobine favorise son élimination, essentiellement par sa fixation sur un récepteur macrophagique qui a été récemment caractérisé. L'haptoglobine présente trois phénotypes majeurs (Hp 1-1, Hp 2-1 et Hp 2-2), entre lesquels il existe des différences, tant sur le plan structural que sur le plan fonctionnel. Ces différences sont en rapport avec d'importantes conséquences sur l'évolution de certaines pathologies. Bien que l'haptoglobine ait été découverte depuis 1938 et son complexe avec l'hémoglobine cristallisé trente ans plus tard, la nature des interactions entre les deux protéines et l'influence du phénotype d'haptoglobine ne sont à ce jour pas clairement élucidées.

Dans certaines circonstances s'accompagnant de la présence d'hémoglobine extra-érythrocytaire (épisodes hémolytiques, transfusion), le potentiel oxydant de l'hémoglobine extracellulaire s'affirme lorsque le pouvoir anti-oxydant de l'haptoglobine est dépassé. La production de radicaux libres par l'hémoglobine extra-érythrocytaire par le biais de la réaction de Fenton va être à l'origine de dommages cellulaires, notamment au niveau des membranes de globules rouges, pouvant se traduire par une transfusion inefficace.

Les objectifs généraux de ce travail de thèse ont été de caractériser les effets délétères de l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge, d'étudier les interactions entre chaque phénotype majeur de l'haptoglobine et l'hémoglobine et d'en évaluer les conséquences en terme de protection contre le stress oxydant induit par l'hémoglobine sur le globule rouge *in vitro*.

Les deux premières parties de ce mémoire seront consacrées à une revue de la littérature concernant le stress oxydant et ses marqueurs d'une part, et l'haptoglobine d'autre part. Pour atteindre nos objectifs, il s'est avéré indispensable de disposer de préparations purifiées de chacun des trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine, afin de pouvoir étudier *in vitro* les interactions hémoglobine-haptoglobine. Le phénotypage et la séquence de purification retenue feront l'objet de la troisième partie de ce mémoire. Nous aborderons dans la partie suivante l'étude des interactions *in vitro* entre les phénotypes majeurs de l'haptoglobine et l'hémoglobine par la mesure du pouvoir peroxydasique du complexe haptoglobine-hémoglobine et par microcalorimétrie, ainsi que les conséquences de ces interactions sur la détermination de l'haptoglobine par immunonéphélométrie. Par la suite, dans une cinquième partie, les travaux portant sur les effets délétères de l'hémoglobine sur le globule évalués en terme de stress oxydant, ainsi que l'effet protecteur des phénotypes *in vitro*, seront présentés à partir de deux modèles. Le premier utilise des préparations de membranes de globules rouges et le second des globules rouges intacts maintenus dans une solution de conservation couramment utilisé en transfusion érythrocytaire. Enfin, dans la dernière partie de ce mémoire, nous présenterons les résultats appliqués à l'autotransfusion utilisant la récupération sanguine périopératoire, qui peut s'accompagner d'une hémolyse importante susceptible d'exposer les cellules destinées à être ré-injectées à un stress oxydant.

**Première partie : Généralités sur le stress oxydant  
et ses marqueur**



## **I. Introduction**

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie. Il est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction de réduction implique quatre électrons et est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes) localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Cette réaction est cruciale, puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses fonctions vitales. Ce processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 5 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives oxygénées (ERO) (Cadenas et Davies, 2000 ; Pincemail et coll., 2001).

Dans les circonstances quotidiennes normales, ces ERO sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents (Favier, 2003). Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydants/anti-oxydants est en équilibre. Cette dernière peut être rompue pour diverses raisons en faveur du système pro-oxydant et est alors à l'origine d'un stress oxydant.

## **II. Systèmes oxydants et systèmes antioxydants**

### **II. 1. Radicaux libres biologiques**

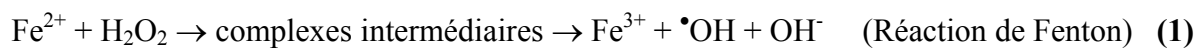
#### ***II. 1. 1. Définition***

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante (Halliwell et Gutteridge, 1999a). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (ERN). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. Cette instabilité rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques ; leurs constantes de vitesse réactionnelles variables selon leurs natures, sont très élevées et peuvent aller de  $10^5$  à  $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$  (Bonfont-Rousselot et coll., 2003).

#### ***II. 1. 2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène***

Parmi les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer celles dites "primaires", qui jouent un rôle particulier en physiologie, et de celles dites "secondaires" qui dérivent des premières par réaction avec des composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et le radical hydroxyle  $\bullet\text{OH}$  (Yoshikawa et coll., 2000). D'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , le peroxyde

d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou le nitroperoxyde ( $\text{ONOOH}$ ) ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (Favier, 2003). En effet, le peroxyde d'hydrogène, qui n'est pas un radical libre mais une molécule avec tous ses électrons appariés, présente une toxicité par l'intermédiaire des réactions de type Fenton auxquelles il peut participer sous l'influence de cations métalliques comme  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$  (Wardman et Candeias, 1996).

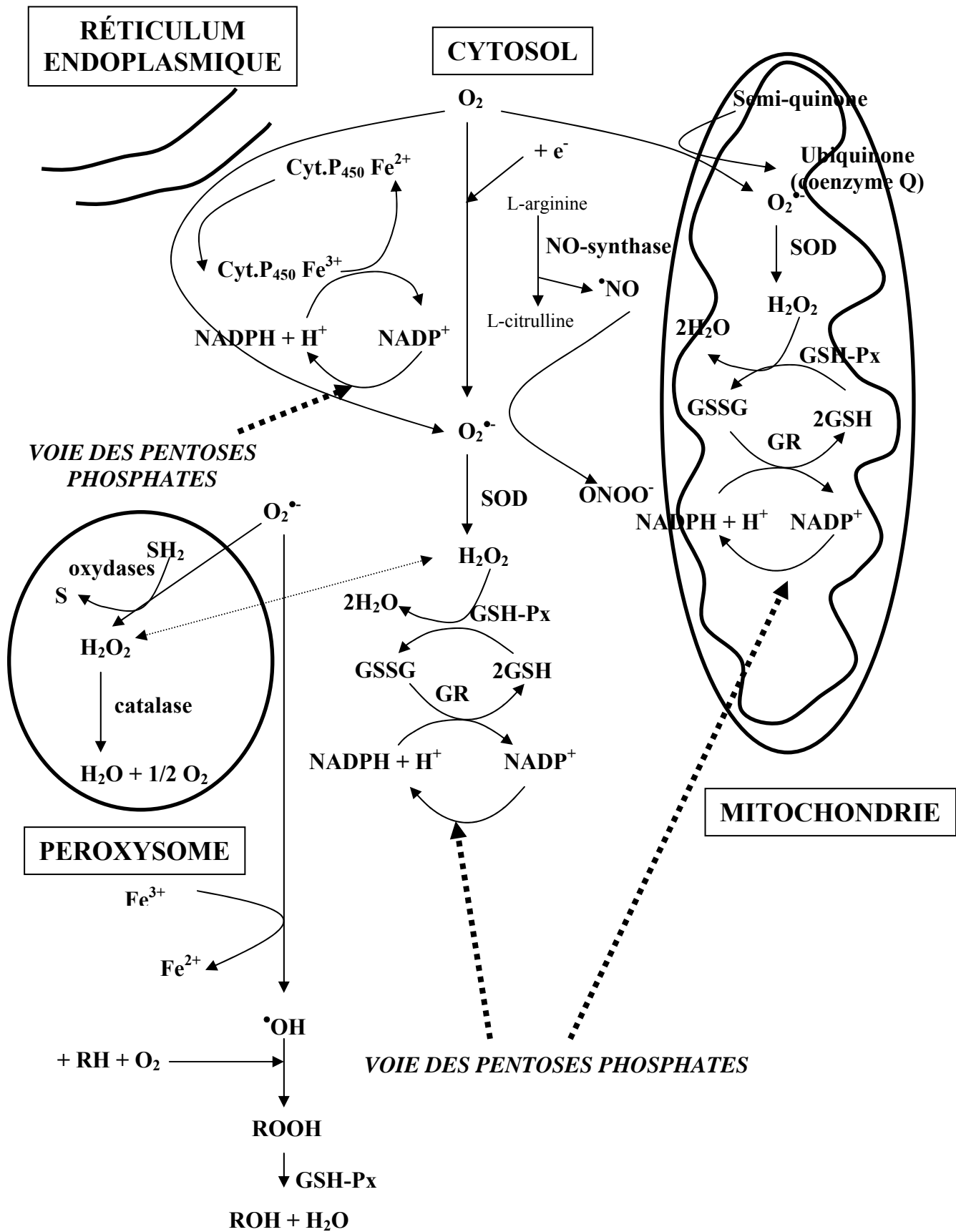


Certains radicaux formés chez les êtres vivants tels que l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ou le monoxyde d'azote ( $\bullet\text{NO}$ ) ne sont pas très réactifs, ce qui explique d'ailleurs leur utilisation par l'organisme en tant que médiateurs régulant des fonctions biologiques comme la vasodilatation, la prolifération de neurones. Par contre, des espèces comme les radicaux peroxy ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) et surtout le radical hydroxyle ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) sont particulièrement réactifs avec la plupart des molécules biologiques. Leur réactivité n'a cependant pas que des conséquences toxiques pour l'organisme ; au contraire ils peuvent être utilisés dans divers mécanismes aboutissant à la destruction de bactéries au sein des cellules phagocytaires ou dans la régulation de fonctions cellulaires létales comme l'apoptose.

Les origines cellulaires des ERO sont essentiellement enzymatiques et découlent de plusieurs sources. Deux sources majeures sont principalement concernées. La première résulte d'imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale qui produit par réduction monoélectronique des ERO. La deuxième source majeure de production des ERO est constituée par la NAD(P)H oxydase, essentiellement localisée au niveau de la membrane plasmique. L'orientation de cette enzyme au niveau de la membrane plasmique lui permet

d'interagir avec le substrat intracellulaire ( $\text{NADH,H}^+$ , ou  $\text{NADPH,H}^+$ ) et de libérer l'ion superoxyde de façon préférentielle à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule en fonction de son caractère phagocytaire ou pas (Souza et coll., 2001 ; Beaudoux et Vasson, 2005). A côté de ces deux sources majeures d'ERO, d'autres sources cytosoliques ou présentes dans divers organites cellulaires peuvent jouer un rôle dans la modulation de la signalisation cellulaire, telles que la xanthine oxydase, les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes  $\text{P}_{450}$ ), les NO synthases et les enzymes de la voie de l'acide arachidonique. Les principales sources d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont représentées dans la Figure 1.

L'auto-oxydation des monoamines (dopamine, épinéphrine et norépinéphrine), des flavines et de l'hémoglobine, en présence de traces de métaux, peut également être à l'origine de la production d'ERO (Thérond et Denis, 2005). Les ERO apparaissent donc comme des molécules produites par divers mécanismes physiologiques. A certaines doses, elles sont utiles à l'organisme, mais leur production peut devenir excessive ou résulter de mécanismes toxiques exogènes à l'organisme.



**Figure 1 : Principales sources cellulaires de radicaux libres** (Bonnefond-Rousselot et coll., 2003).  
 RH : acide gras polyinsaturé, ROOH : hydroperoxyde lipidique, SH<sub>2</sub> : substrat réducteur, S : substrat oxydé, SOD : superoxyde dismutase, GSH-Px : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé.

## **II. 2. Systèmes de défenses anti-oxydants**

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO et de ERN. Le terme d'anti-oxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 1990). Les cellules utilisent ainsi de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes anti-oxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Bonnefont-Rousselot et coll., 2003). Dans le système de défense anti-oxydant de notre organisme, on distingue des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques.

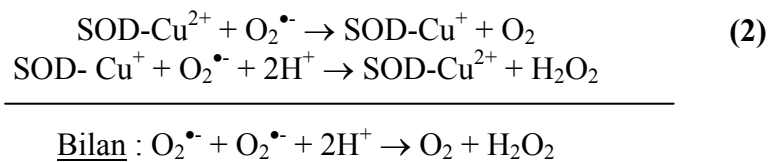
### ***II. 2. 1. Systèmes enzymatiques***

Ces systèmes sont composés d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase, capables d'éliminer les radicaux libres et d'autres espèces réactives.

#### ***\* Les superoxyde dismutases (SOD)***

Les superoxyde dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko et coll., 2002). La structure des

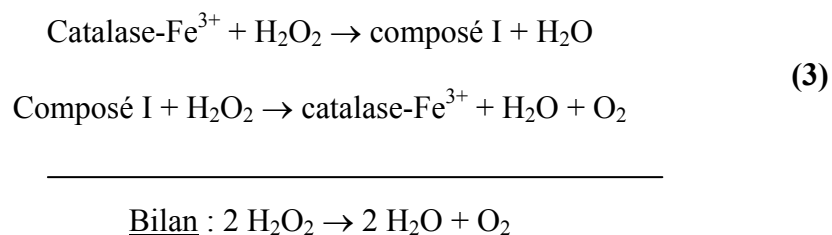
superoxyde dismutases est bien conservée lors de l'évolution et présente un puit hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde (Zelko et coll., 2002). La nature du métal situé au centre de l'enzyme permet de distinguer les superoxyde dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, de celles à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD), la face externe de la membrane des cellules épithéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (Zelko et coll., 2002). Les superoxyde dismutases à cuivre-zinc catalysent les réactions suivantes :



Le peroxyde d'hydrogène formé est pris en charge par les catalases (présentes en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques) et les glutathion peroxydases à sélénium.

**\* La catalase**

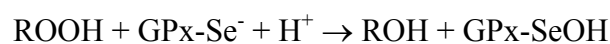
La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène :



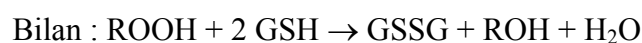
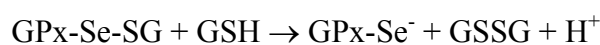
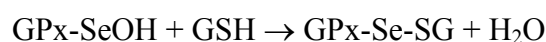
La catalase est composée de 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement héminique avec  $\text{Fe}^{3+}$  lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de  $\text{NADPH}_2\text{H}^+$  qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité catalase (Bonfont-Rousselot et coll., 2003).

**\* Les glutathion peroxydases**

Les glutathion peroxydases constituent sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion, le cytochrome c (cytochrome c peroxydases), le NADH (NADH peroxydases) (Thérond et Denis, 2005). Toutes les glutathion peroxydases contiennent dans leurs sous-unités un à quatre atomes de sélénium selon l'isoenzyme. Des glutathion peroxydases à sélénium sont retrouvées dans le plasma (pGPx), dans le cytosol (cGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et on retrouve une isoenzyme qui est spécifique aux cellules digestives (GIGPx) (Ganther, 1999). Elles fonctionnent toutes selon le mécanisme catalytique suivant :



(4)





La première étape consiste en une oxydation du groupement séléniol de l'enzyme par un hydroperoxyde (ROOH), suivie de la liaison successive de deux molécules de glutathion avec régénération de l'enzyme sous sa forme réduite. L'activité anti-oxydante de ces peroxydases est cependant très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (Thérond et coll., 2000 ; Favier, 2003). Le glutathion oxydé sera régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH,H<sup>+</sup>, formé principalement par la voie des pentoses phosphates (Figure 1) (Bonnefont-Rousselot et coll., 2003 ; Thérond et Denis, 2005).

D'autres enzymes comme la glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases et l'hème oxydase présentent également une activité anti-oxydante relativement importante.

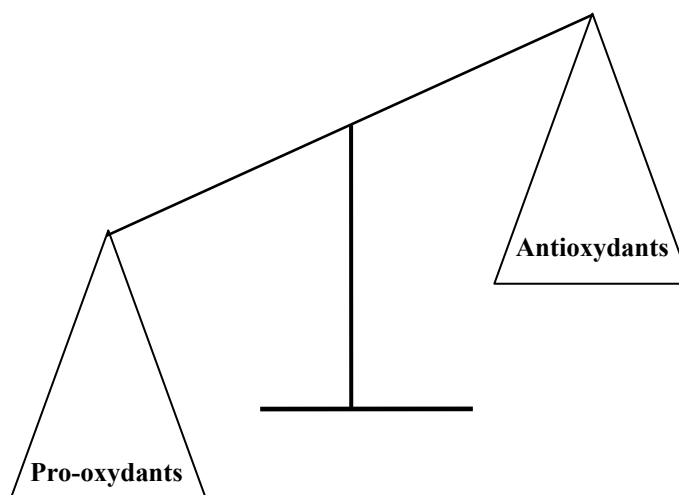
## ***II. 2. 2. Systèmes non enzymatiques***

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le •NO (Favier, 2003). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger des radicaux peroxyles RO<sub>2</sub>• et l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993). Les hormones sexuelles femelles, grâce à la présence d'un hydroxyle phénolique au niveau de leur

structure chimique, peuvent inhiber la peroxydation lipidique des LDL *in vitro*, à des concentrations micromolaires (Keaney et coll., 1994). Des composés comme les thiorédoxines, les glutarédoxines et les métallothionéines, joueraient sans doute un rôle protecteur, même si l'importance de leur action n'a pas été encore clairement établie (Favier, 2003). D'autres composés, tels que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes, apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Krinsky, 1989). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Packer, 1991). Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et les phytates, apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (Bors et coll., 1990). Des protéines comme l'haptoglobine, la transferrine, l'hémopexine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}/Cu^{+}$ . Les protéines du choc thermique ("heat shock protein" 90, HSP 90, HSP 70) agissent en protégeant les biomolécules contre les agressions, notamment les oxydations (Conconi et coll., 1996 ; Conconi et Friguet, 1997 ; Conconi et coll., 1998 ; Wirth et coll., 2003).

### III Le stress oxydant

#### III. 1 Définition du stress oxydant.



**Figure 2 : Déséquilibre de la balance entre anti-oxydants et pro-oxydants**

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses anti-oxydants et la production d'ERO, en faveur de ces dernières (Figure 2). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Favier, 1997). Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique.

### **III. 2. Marqueurs biologiques du stress oxydant**

En absence de systèmes anti-oxydants suffisamment efficaces, une surproduction de radicaux libres est capable de provoquer des lésions directes de molécules biologiques telles que l'oxydation des acides nucléiques, des lipides, des glucides et des protéines, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites issus du stress oxydant, notamment de l'oxydation des lipides. Les molécules biologiques cibles, sous l'effet direct des radicaux libres, peuvent être soit oxydées sur des sites spécifiques, soit être clivées, soit au contraire être polymérisées. Ces mêmes molécules biologiques peuvent être attaquées, par exemple par les produits issus de l'oxydation des lipides (peroxydes ou aldéhydes) et entraîner la formation de composés d'addition antigéniques responsables de la formation d'auto-anticorps (Favier, 1997). Ces différentes altérations biochimiques peuvent être utilisées pour évaluer le stress oxydant (Slater, 1984).

Le stress oxydant est impliqué dans les processus de vieillissement et dans de nombreuses pathologies. Ainsi, de nombreuses techniques ont été développées pour l'évaluer. Le problème de disposer de marqueurs spécifiques, sensibles, fiables et d'exécution analytique aisée, ainsi que le manque de standardisation et d'optimisation des méthodes, compliquent l'interprétation des résultats. Dans ces conditions, il conviendra, pour identifier un stress oxydant, de choisir des marqueurs adaptés au phénomène à étudier et à sa localisation (marqueurs d'oxydation lipidique pour une agression extracellulaire, ou marqueur d'oxydation de l'ADN pour une irradiation attaquant le noyau cellulaire). De plus, une combinaison d'au moins 2 marqueurs différents est souvent indiquée pour pallier l'absence d'un marqueur idéal (Gutteridge, 1992 ; Favier, 1997).

Le stress oxydant peut être évalué par trois grandes voies d'approches (Bonfont-Rousselot et coll., 2003 ; Favier, 2003) :

- la mesure de la production des ERO
- la mesure des capacités de défense (statut anti-oxydant)
- la mesure des désordres biochimiques spécifiques créés par l'attaque des radicaux libres sur les principales cibles moléculaires (protéines, lipides et acides nucléiques).

La plupart de ces marqueurs sont dosés par des techniques qui n'ont pas été abordées avec la rigueur et le souci de standardisation et d'optimisation des méthodes habituellement utilisées en biologie clinique. Cela entraîne une grande disparité des résultats et pose le problème de l'interprétation et de la transférabilité des résultats.

### ***III. 2. 1. Mesure des radicaux libres***

La détection et la quantification des radicaux libres est actuellement possible grâce à l'utilisation de la résonance para-électronique (RPE ou ESR) (Wertz et Bolton, 1972). Malheureusement, c'est une méthode de sensibilité modeste et la durée de vie extrêmement courte des radicaux libres n'est pas compatible avec la prise de sang et son transfert au laboratoire (Favier, 1997). Aussi, un artifice pour augmenter la durée de vie des radicaux libres est souvent employé : la technique du "spin trapping". Elle consiste à réaliser une réaction d'addition entre le radical et un autre composé (en général un nitroxyde) pour obtenir un produit radicalaire d'une durée de vie plus longue et détectable par RPE. En pratique, il s'agira de prélever le spécimen biologique sur un agent dit "spin trap" et de le congeler immédiatement dans de l'azote liquide (Favier, 1997 ; Bonfont-Rousselot et coll., 2003). Une autre difficulté dans la mesure de ces radicaux libres réside dans le fait que leur lieu de

production est souvent inaccessible à la biopsie ou que le prélèvement n'est pas sans danger. Enfin, il est possible de mesurer la lumière produite par décomposition des radicaux libres en chimiluminescence, mais celle-ci est excessivement faible (Torreilles et Guerin, 1995). En pratique, la chimioluminescence mesure plutôt la lumière produite par réaction des radicaux libres avec des sondes lucigéniques comme le luminol ou la lucigénine, mais beaucoup d'interférences dues à la présence d'acide urique ou de peroxydes sont possibles.

### ***III. 2. 2. Mesure des systèmes anti-oxydants***

#### ***\* Systèmes enzymatiques***

Il est possible, pour évaluer un stress oxydant, de mesurer l'activité de certaines enzymes anti-oxydantes comme les superoxyde dismutases, les glutathion peroxydases, la glutathion-réductase et la catalase. Ces déterminations sont possibles aussi bien dans le sérum qu'au niveau des éléments figurés du sang.

#### ***- Les superoxyde dismutases***

Les superoxyde dismutases (SOD) assurent l'élimination de l'ion superoxyde, et interviennent donc en première ligne de défense anti-oxydante. Le substrat de la superoxyde dismutase (le radical superoxyde) est instable et a une durée de vie très courte. Ainsi, la plupart des méthodes de dosage utilisées pour déterminer l'activité superoxyde dismutase sont indirectes. A titre d'exemple, la méthode proposée par Beauchamps et Fridovich (Beauchamps et Fridovich, 1971) modifiée par Oberley et Spitz (Oberley et Spitz, 1985) évalue la SOD par sa

capacité à inhiber un flux d'anions superoxydes générés par le système xanthine - xanthine oxydase. Les radicaux produits par ce système réduisent le nitrobleu de tétrazolium (NBT) en bleu de formazan dont l'absorbance est quantifiée. Par ailleurs, La mesure de la superoxyde dismutase exprimée en concentration de protéine peut être réalisée par dosage radio-immunologique (Asayama et Burr, 1985).

En cas de stress oxydant modéré, l'organisme réagit en surexprimant la SOD notamment en cas d'exercice physique (Mena et coll., 1991 ; Levine et Kidd, 1996). Si le stress oxydant perdure et produit de façon massive des ERO, la SOD sera détruite. Paradoxalement, une activité trop élevée de cette enzyme peut s'avérer dangereuse, car elle peut être à l'origine d'une surproduction de peroxyde d'hydrogène (effet paradoxal des anti-oxydants) (Pincemail et coll., 2001).

#### *- Les glutathion peroxydases*

Les glutathion peroxydases (GPx) ont pour principal rôle l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'attaque des radicaux libres sur les acides gras polyinsaturés. Elles ont besoin de la présence de glutathion réduit et de sélénium pour fonctionner normalement. L'activité GPx peut être dosée dans différents milieux extracellulaires et intracellulaires. Le prélèvement et le traitement des échantillons doivent prendre en compte la fragilité relative de cette enzyme (Richard, 1997). En pratique courante, l'activité GPx érythrocytaire est la plus fréquemment mesurée. La détermination de l'activité de cette enzyme est basée sur la réduction d'un hydroperoxyde (ROOH) en présence de glutathion réduit (GSH). Les méthodes directes mesurent le glutathion non consommé par polarographie (Flohé et Gunzler, 1984), mais les techniques les plus fréquemment utilisées sont des techniques indirectes utilisant la glutathion réductase comme enzyme auxiliaire, avec suivi de la consommation de

NADPH,H<sup>+</sup> à 340 nm (Paglia et Valentine, 1967). Par ailleurs, la mesure de la concentration de la protéine GPx est possible par dosage radio-immunologique (Takahashi et coll., 1987).

Tout comme les SOD, les GPx se comportent de deux façons différentes en fonction du niveau de stress oxydant : surexpression de l'enzyme dans un premier temps puis destruction si le stress perdure (Pincemail et coll., 2001). Une diminution de l'activité de la GPx peut également être liée à une carence en sélénium (Favier, 2003).

- *Autres enzymes*

Les activités d'autres enzymes telles que la glutathion-réductase, la catalase, l'hème oxygénase et la thioréductase peuvent également être déterminées, mais l'interprétation des résultats est souvent difficile du fait des nombreux facteurs pouvant faire varier leur concentration, tels que la vitamine C ou la bilirubine (Ryter et coll., 2000 ; Pincemail, 2001). A titre d'exemple, l'hème oxygénase est une enzyme qui permet la conversion de l'hème en monoxyde de carbone, en biliverdine et en fer. L'effet protecteur de l'hème oxygénase contre le stress oxydant est indirect puisqu'il est relié au fait que, une fois formée, la biliverdine se transforme en bilirubine qui possède de puissantes activités anti-oxydantes (Ryter et coll., 2000 ; Pincemail et coll., 2001). Toutefois, l'activité de l'hème oxygénase peut avoir des effets néfastes à court terme puisque le fer libéré peut agir comme agent pro-oxydant par son action catalytique sur la production des ERO (Ryter et coll., 2000).



### *\* Systèmes non enzymatiques*

Le groupe des anti-oxydants non-enzymatiques comprend de nombreux composés, dont certains sont hydrophiles (vitamine C, glutathion) et d'autres lipophiles (tocophérol,  $\beta$ -carotène, ubiquinol). Les concentrations de tous ces composés peuvent être déterminées aussi bien au niveau du plasma que des éléments figurés du sang et servir à l'évaluation du statut anti-oxydant de l'organisme. Une détermination des composés anti-oxydants lipophiles peut aussi être réalisée au niveau des différentes classes de lipoprotéines, mais l'interprétation rigoureuse des résultats nécessite de rapporter leur concentration à celle d'un constituant lipidique de l'échantillon à analyser tel que le cholestérol (Bonnefont-Rousselot et coll., 2003).

Le plasma renferme de nombreuses substances anti-oxydantes dont certaines sont connues (glutathion réduit, protéines à groupements thiols, acide urique, bilirubine, ...), alors que d'autres ne sont pas clairement identifiées (Halliwell et Gutteridge, 1999b). Plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer le pouvoir anti-oxydant total du plasma (TRAP : Total Radical Trapping Parameter) dû à l'ensemble de ces substances (Prior et Cao, 1999).

Le principe de sa détermination repose sur la production de radicaux libres qui vont oxyder les substances oxydables du plasma. Cette oxydation est suivie par la consommation d'oxygène. Durant une période d'induction, l'oxydation est inhibée par l'ensemble des substances anti-oxydantes du plasma. La durée de la période d'induction est comparée à celle obtenue avec un standard interne, un dérivé de la vitamine E (Trolox®). Les résultats sont exprimés en équivalents de la capacité anti-oxydante du Trolox® en micromoles par litre de plasma. Plusieurs méthodes différentes en fonction du générateur de radicaux libres sont disponibles et certaines existent sous forme des « kits » commercialisés (Prior et Cao, 1999). La méthode la souvent répandue utilise comme générateur de radicaux peroxydes la 2,2'-

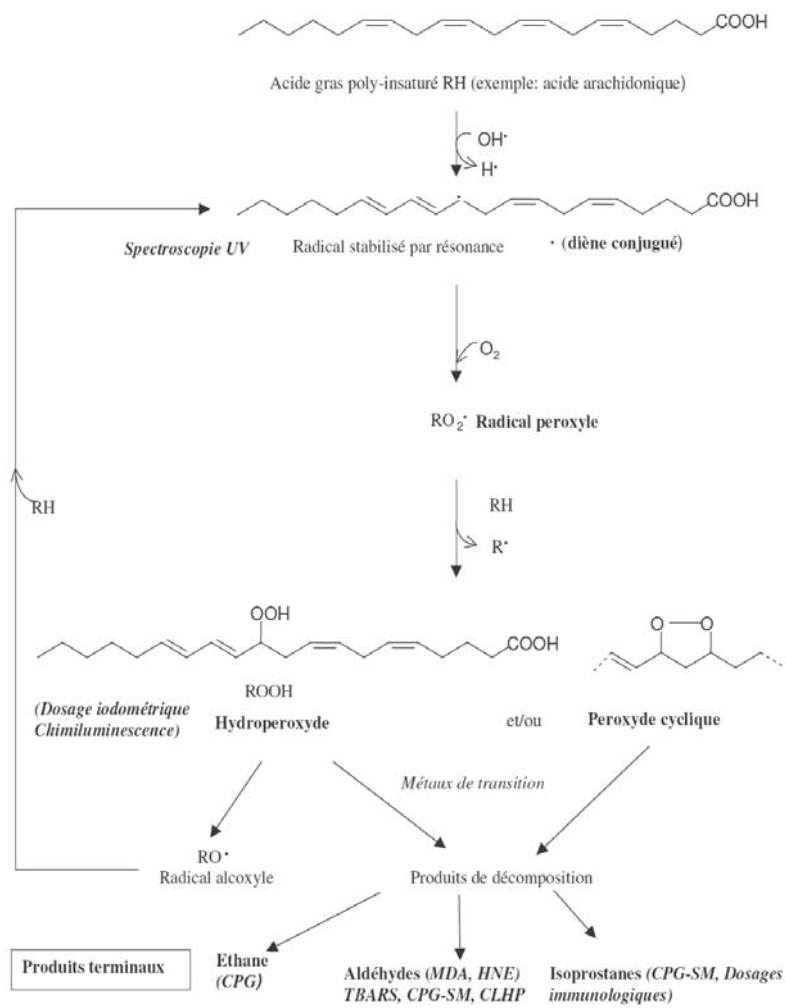
azobis (amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Wayner et coll., 1985). Une autre méthode utilisant la 2,2'- azinobis (3-éthyl-benzothiazoline 6 sulfonate) en présence de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène est commercialisé sous forme de « kits » (Randox-Crumlin, Grande-Bretagne). Les méthodes sont simples à mettre en œuvre, mais les résultats sont difficilement comparables d'une méthode à une autre du fait de principes différents (Prior et Cao, 1999 ; Bonnefont-Rousselot et coll., 2001). De plus, les résultats sont à interpréter avec prudence, car des augmentations des concentrations plasmatiques de l'albumine, de l'acide urique, et de la bilirubine, liées à certaines pathologies, pourraient masquer le déficit en d'autres anti-oxydants (Malliaraki et coll., 2003). Dans ces circonstances, certains auteurs préconisent de calculer le pouvoir anti-oxydant lié à l'albumine, l'acide urique et la bilirubine, la différence entre le pouvoir anti-oxydant total mesuré et celui calculé à partir de ces trois paramètres correspondant aux anti-oxydants non mesurés (Théron et coll., 2000). La principale limite de l'utilisation du pouvoir anti-oxydant total du plasma est qu'une baisse de sa valeur n'indique qu'un risque accru, et non la preuve absolue d'un stress oxydant. En effet, il traduit simplement un risque de dérèglement biologique, limité de plus à l'étude de quelques molécules piègeuses dont la nature dépendra de la nature des radicaux générés par la technique (Favier, 1997).

### ***III. 2. 3. Marqueurs de la peroxydation lipidique***

La peroxydation lipidique désigne l'attaque des lipides (principalement les acides gras polyinsaturés) par des radicaux libres, comme le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ), capables d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Il s'agit d'une réaction en chaîne qui se poursuit par la

transformation du radical peroxyde, au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer et coll., 1992). Les radicaux diènes conjugués, sous l'action de l'oxygène, se transforment en hydroperoxydes qui peuvent, soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase, soit continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et alcanes volatiles. Le radical peroxyde peut évoluer en un peroxyde cyclique dont la coupure peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonaldialdéhyde ou l'hydroxynonéal.

Cette attaque des lipides peut concerner aussi bien les phospholipides membranaires que les lipoprotéines circulantes, avec évidemment des conséquences différentes. En effet, l'atteinte des phospholipides membranaires va entraîner une modification de la fluidité membranaire, altérer les systèmes de transfert d'ions ainsi que le fonctionnement de nombreux transporteurs, récepteurs et affecter les voies de transduction des signaux (Stubbs, 1983 ; Levine et coll., 1990 ; Clamp et coll., 1997 ; Hochgraf et coll., 1997 ; Favier, 2003). L'attaque des lipoprotéines circulantes, notamment des LDL, va aboutir à l'oxydation de ces dernières, qui seront ensuite captées par les macrophages pour donner des cellules spumeuses à la base du dépôt lipidique de la plaque d'athérome (Beaudeux et coll., 2003 ; Favier, 2003 ; Peynet et coll., 2005). Il ressort de ce qui précède que l'identification de marqueurs fiables de la peroxydation lipidique est nécessaire pour apprécier l'importance du stress oxydant, le problème du choix des marqueurs étant beaucoup plus difficile dans les systèmes complexes ouverts (*in vivo*) que dans les systèmes simples fermés (*in vitro*). Dans tous les cas, les produits issus de la peroxydation lipidique semblent être les meilleurs marqueurs du stress oxydant, même si les ERO provoquent également des modifications oxydatives de l'ADN et des protéines (Lefèvre et coll., 1998). Les principaux marqueurs de la peroxydation lipidique sont répertoriés sur la Figure 3.



**Figure 3 : Principaux marqueurs de la peroxydation lipidique et leurs dosages (Bonnefont-Rousselot, 2003, modifié).**

### **\* Mesure des diènes**

Les diènes conjugués formés à partir de l'oxydation des acides gras polyinsaturés, absorbent le rayonnement ultraviolet avec un maximum d'absorbance situé à 234 nm (Halliwell et Chirico, 1993 ; Halliwell et Gutteridge, 1999a). La mesure des diènes conjugués à 234 nm est utilisée comme indice de peroxydation lipidique (Halliwell et Gutteridge, 1999b ; Bonnefont-Rousselot, 2003). Cette mesure est surtout intéressante pour l'évaluation précoce des peroxydations lipidiques (Halliwell et Chirico, 1993). Toutefois, les diènes conjugués peuvent être produits par le métabolisme des acides gras dans des circonstances autres que celle de la peroxydation lipidique, d'où le manque de spécificité qui leur est reproché (Halliwell et Gutteridge, 1999a). Le dosage des diènes à partir d'échantillons prélevés *in vivo* nécessite souvent un traitement préalable (Buège et Aust, 1978 ; Bonnefont-Rousselot et coll., 2003) ; il s'avère très utile pour suivre l'oxydation de composés *in vitro*.

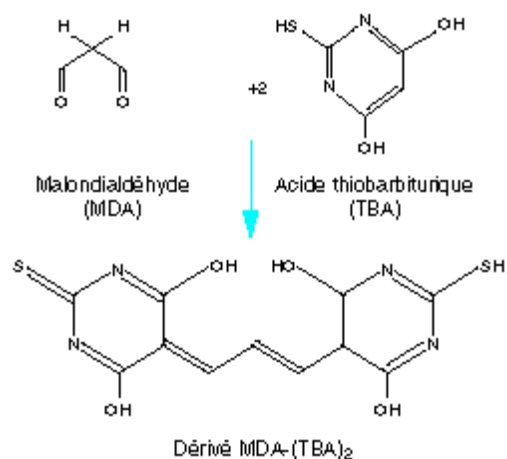
### **\* Dosage des aldéhydes et des Substances Réagissant avec l'Acide Thiobarbiturique**

#### **(TBARS)**

Les aldéhydes sont des produits secondaires, issus de la décomposition des hydroperoxydes. La mesure des aldéhydes peut être réalisée de manière globale par réaction avec l'acide thiobarbiturique sous le nom de "substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique" (TBARS), se terminant par la mesure de la coloration du conjugué obtenu (Favier, 1997).

La détermination du dialdéhyde malonique (MDA) a été proposée il y a plus d'une cinquantaine d'années et constitue sans doute le marqueur de peroxydation lipidique le plus utilisé (Favier, 1997 ; Lefèvre et coll., 1998 ; Bonnefont-Rousselot et coll., 2003). Son dosage, réalisé le plus souvent par condensation en milieu acide et à chaud avec l'acide

thiobarbiturique (Figure 4), nécessite des précautions particulières (utilisation d'une eau très pure, ajout de desferrioxamine) pour éviter la génération de MDA à partir des lipides au cours du dosage. Le fait que d'autres substances soient susceptibles de réagir avec l'acide thiobarbiturique fait que, même en améliorant les étapes pré-analytiques (conditions de prélèvements, utilisation de conservateurs) et analytique (fluorescence), la spécificité du dosage du MDA reste discutée (Wade et Van Rij, 1988 ; Halliwell et Chirico, 1993 ; Lefèvre et coll., 1998). La chromatographie liquide haute performance, avec détection fluorimétrique, permet un dosage spécifique du MDA (Richards et coll., 1992a ; Richards et coll., 1992b). Un autre inconvénient est que le dosage du MDA, produit de réaction terminal de la peroxydation lipidique, exclut tous les produits des réactions intermédiaires entre le début de la peroxydation et la formation de cet aldéhyde. Par conséquent les concentrations de MDA pourraient ne pas refléter l'ampleur de la peroxydation lipidique (Halliwell et Chirico, 1993). Par ailleurs, le dosage des aldéhydes par l'acide thiobarbiturique mesure non seulement le MDA préexistant (lié ou non aux molécules biologiques), mais également les peroxydes lipidiques, les produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud (Gutteridge et Stocks, 1974). Ainsi, la notion de dosage des Substances Réagissant avec l'Acide Thiobarbiturique (TBARS) s'est progressivement substituée à celle du dosage du MDA. La détermination des TBARS apparaît donc comme un test donnant des résultats globaux de la peroxydation lipidique, tandis que le dosage spécifique du MDA concerne l'une des molécules finales formées au cours du stress oxydant (Lefèvre et coll., 1998).



**Figure 4 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.**

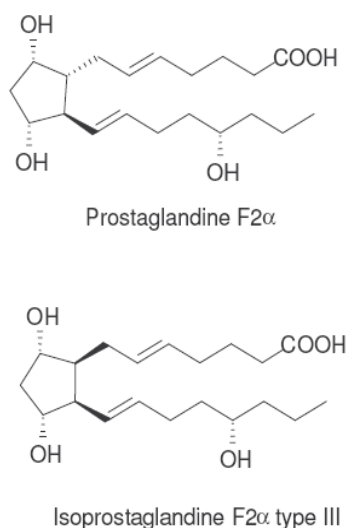
La réaction a lieu en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules de TBA, avec formation d'un pigment absorbant à 532 nm et extractible par les solvants organique comme le butanol.

Un autre aldéhyde génotoxique et carcinogène comme le MDA est également utilisé comme marqueur de la peroxydation lipidique : le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) (Favier, 1997). Deux groupes de méthodes ont été développés pour son dosage. Le premier groupe utilise des méthodes basées sur la dérivation de la fonction aldéhyde avec de la 2,4-dinitrophénylhydrazine ou la cyclohexadione, avec séparation par CLHP. Les autres méthodes mettent à profit la propriété volatile du 4-HNE en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Favier, 1997 ; Bonnefont-Rousselot et coll., 2003).

**\* Dosage des Isoprostanes**

Les isoprostanes ou composés "prostaglandines like" ont été décrits récemment comme des marqueurs de la peroxydation lipidique (Cracowski et coll., 2000 ; Roberts et Morrow, 2000). A la différence des prostaglandines qui sont synthétisées par voie enzymatique (action des cyclo-oxygénases sur l'acide arachidonique), les isoprostanes résultent de l'attaque directe des ERO sur l'acide arachidonique des phospholipides, suivie d'une libération par une

phospholipase. Ce sont des composés stables et spécifiques de la peroxydation lipidique qui peuvent être dosés au niveau des liquides biologiques et des tissus et qui fournissent un indice non invasif et quantitatif du stress oxydant (Roberts et Morrow, 2000). La méthode de référence du dosage des isoprostanes est la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Bonfont-Rousselot et coll., 2003). Actuellement, l'isoprostane le plus fréquemment dosé est la 8-iso-prostaglandine deux alpha (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) (Figure 56). Des méthodes immuno-enzymatiques ont été développées, dont certaines sont commercialisées sous formes de « kits » (Wang et coll., 1995). Un métabolite urinaire majeur de la 8-iso-PGF<sub>2</sub> a été identifié, il résulte d'une β-oxydation de la chaîne portant le carboxyle et de la réduction de la double liaison sur cette même chaîne (Roberts et coll., 1996). Le développement en cours de tests ELISA pour ce métabolite devrait permettre de l'adapter à de larges études cliniques (Wang et coll., 1995 ; Bonfont-Rousselot et coll., 2003).



**Figure 5 : Structures de la prostaglandine PGF<sub>2α</sub> et de l'isoprostane iso-PGF<sub>2α</sub>.**



### ***III. 2. 4. Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés***

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible de réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications sous l'action des ERO et des ERN, ou des métaux de transition (Stadtman, 1990). Les protéines atteintes peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec altération de leurs structures primaires et secondaires. Les dommages oxydatifs peuvent se manifester par l'apparition de groupements hydroperoxydes, l'oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique conduisant à une fragmentation des protéines et/ou à la formation de liaisons croisées intra- ou inter-chaînes et à l'apparition de groupements carbonylés ou dicarbonylés. On peut également observer une oxydation des chaînes latérales des acides aminés, notamment de la cystéine et de la méthionine, avec formation de ponts disulfures. La nitration des protéines par le peroxy-nitrite se traduit par l'inactivation de nombreuses enzymes telles que la Mn-superoxyde dismutase (Davies, 1987 ; Stadtman, 1993 ; Grune et coll., 1998). Les acides aminés et protéines peuvent subir d'autres modifications d'une façon indirecte comme la glyco-oxydation et la lipo-oxydation. Certains acides aminés comme la phénylalanine et la tyrosine peuvent subir un processus d'hydroxylation qui génère la formation d'ortho- et de méta-tyrosine dans le cas de la phénylalanine (Davies et coll., 1999). Les protéines comportant un pont sulfhydryle sont les plus sensibles aux attaques radicalaires. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui, après oxydation, deviennent inactives et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Sen, 2001). La détection des groupements carbonylés au niveau des protéines oxydées est de loin la technique la plus utilisée (Pantke et coll., 1999). En présence de 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), ces dérivés carbonylés peuvent être dosés dans les spécimens biologiques par spectrophotométrie, CLHP, ou grâce à l'utilisation d'anticorps mono- ou polyclonaux (Levine et coll., 1994). La détermination de ces dérivés est assez

délicate à mettre en œuvre du fait des nombreuses manipulations à effectuer. Par ailleurs, un manque de spécificité en relation avec des problèmes d'interférences dues à des aldéhydes ou à des cétones provenant des sucres a été rapporté (Bonfont-Rousselot et coll., 2003). D'autres marqueurs d'oxydation des protéines, en particulier le sulfoxyde de méthionine, la nitrotyrosine et l'ortho-tyrosine, ont été décrits comme présentant une meilleure spécificité (Davies et coll., 1999).

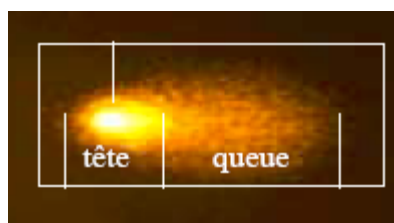
### ***III. 2. 5. Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques***

Les acides ribo- et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) constituent des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires (Dizdaroglu, 1991 ; Halliwell et Gutteridge, 1999a). Les lésions induites par les radicaux libres au niveau de ces molécules peuvent consister en des modifications de bases, des cassures simple-brin ou double-brin de la chaîne oligonucléotidique, ou des pontages avec des résidus protéiques (Favier, 1997). Les modifications observées après action du radical hydroxyle sont très nombreuses et peuvent consister en une conversion des bases ou oxydation du désoxyribose entraînant une coupure des brins (Halliwell et Gutteridge, 1999a). Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome. La recherche des produits d'oxydation peut être réalisée dans des cellules circulantes isolées ou dans des biopsies, mais aussi dans l'urine où se retrouvent les composés oxydés (bases ou nucléosides) après excision par les enzymes de réparation (Favier, 1997). De nombreux produits de réaction des radicaux libres sur l'ADN ont été identifiés, tels que la 8-hydroxy-guanosine, le thymidine glycol, la 8-hydroxy-guanine, la 8-hydroxy-adénine, la 5-hydroxy-méthyl-uracil, le cytosine-glycol (Dempfle, 1991). Parmi les composés d'oxydation de l'ADN, deux d'entre eux se sont révélés être des

marqueurs intéressants. Il s'agit de la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) et du thymidine glycol. La présence de ces produits d'oxydation peut être recherchée dans les cellules circulantes isolées ou dans des biopsies par la technique des comètes ou "Single technique Cell Gel Electrophoresis". Cette technique est l'une des plus sensibles et des plus faciles à mettre en œuvre. Elle permet de mettre en évidence les dommages de l'ADN au niveau de la cellule entière (Fairbairn et coll., 1995). Elle est basée sur les propriétés de migration de l'ADN dans un champ électrique. Les cellules sont déposées dans un gel d'agarose coulé sur une lame de microscope. Les membranes plasmiques et nucléaires sont ensuite lysées et les lames sont incubées dans un milieu alcalin fortement salin qui permet la décondensation de l'ADN s'expliquant en partie par la perte des protéines de type histone. Sous l'action d'un champ électrique, l'ADN chargé négativement se déplace vers l'anode. Après électrophorèse, l'ADN peut être visualisé au moyen d'un marqueur fluorescent spécifique : le bromure d'éthidium. En absence d'altérations, la structure super-enroulée de l'ADN formée autour des nucléosomes persiste. Une rupture de brin induite par une altération de l'ADN suffit à relâcher une partie de l'ensemble et à permettre la migration de boucles d'ADN hors du nucléoïde en direction de l'anode, donnant ainsi une image de comète. L'ADN est alors réparti entre la tête de la comète (nucléoïde) et la queue de la comète. Un exemple d'image obtenue est représenté sur la Figure 6.



Cellules témoins



Cellules irradiées à 8 Gray

**Figure 6 : Mesure des dommages de l'ADN par la méthode des comètes** (Pouget, 2000). Les cellules témoins et irradiées ont été observées par microscopie à épifluorescence après coloration au bromure d'éthidium).

.En pratique courante, l'évaluation des lésions de l'ADN au cours du stress oxydant est surtout réalisée par la quantification des composés oxydés (bases ou nucléosides) dans l'urine par CPG-MS en fragmentométrie de masse (Faure et Bonnefont-Rousselot, 1992), ou par CLHP avec détection électrochimique. Des précautions particulièrement contraignantes doivent être respectées lors de l'extraction de l'ADN et lors de son hydrolyse (Favier, 1997). Cela explique qu'à ce jour, le dosage de ces différents marqueurs n'est réalisé que dans des laboratoires spécialisés.

### ***III. 2. 6. Quel est le meilleur marqueur pour évaluer le stress oxydant ?***

De nombreux marqueurs biologiques du stress oxydant ont été décrits (Tableau I). Cependant, le stress oxydant est un phénomène dont la mise en évidence en pathologie humaine est limitée par l'absence de marqueur à la fois sensible, spécifique, de dosage aisé, répétable et non invasif. Les scientifiques se sont intéressés, dès le début des recherches sur le stress oxydant, à la découverte d'un marqueur biologique qui identifierait à coup sûr la présence d'un stress oxydant dans diverses situations expérimentales ou cliniques. Toutes les méthodes proposées, quelles qu'elles soient, présentent toujours leurs propres spécificités et limites, montrant qu'il serait utopique de croire en l'existence d'un marqueur idéal et unique de stress oxydant (Favier, 1997 ; Pincemail et coll., 1999).

**Tableau I : Principaux marqueurs biologiques du stress oxydant (Favier, 1997).**

Marqueurs	In vitro	Cellule	Animal	Homme
<b>Mesure directe des ERO et ERN</b>				
ESR directe	X			
ESR spin trapping	X	X	X	±
Luminescence	X	X	X	
Mesure chimique H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	X	X		
Mesure chimique O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	X	X		
Mesure chimique OH <sup>•</sup>	X	X		
Nitrates-Nitrites		X		
<b>Dérivés d'oxydation des lipides</b>				
Peroxydes organiques	X	X	X	X
Diènes conjugués	X	X	X	X
Réaction au TBA	X	X	X	X
Aldéhydes : MDA, hydroxynonéal, hexanal	X	X	X	X
Cholestérol oxydé			X	X
Hydrocarbures aliphatiques			X	X
Diminution des acides gras polyinsaturés	X	X	X	X
Phospholipides hydroperoxydes	X	X	X	X
Acide cis 9-trans-11 octadécadiénoïque			X	X
8 épi-prostagladine F2 $\alpha$			X	X
LDL oxydées	X		X	X
<b>Dérivés d'oxydation de l'ADN</b>				
Bases oxydées (HPLC, CG-MS)		X	X	X
<b>Dérivés d'oxydation des protéines</b>				
Méthionine sulfoxyde	X			
Echange boro hydrure tritié	X		X	X
Nitrotyrosine	X	X	X	X
Thiols protéiques	X	X	X	X
Ortho-tyrosine	X		X	±
Carbonyles (DPNH)			X	X
Bi-tyrosine	X			
<b>Dérivés d'oxydation des "scavengers"</b>				
GSH, rapport GSH/GSSG		X	X	X
Tocophérol, tocophérylquinone			X	X
Ascorbate, radical ascorbyl			X	X
<b>Dérivés d'oxydation des composés exogènes</b>				
Dimethylsulfoxyde	X	X		
Aspirine			X	X
<b>Dérivés de conjugaison</b>				
Lipofuschines			X	X
MDA-protéine			X	X
Tyrosine-thymine	X	X		
MDA-guanine	X	X		
<b>Auto-anticorps</b>				
Anti-LDL oxydés			X	X
Anti-conjugué AIP (iminopropène)			X	X
Anti-ADN oxydé			X	X

Abréviations : RPE (résonance para-électronique), 2,4-DPNH (2,4-dinitrophénylhydrazine), TBA (acide thiobarbiturique).

En raison de la demi-vie très courte des radicaux libres, il est très difficile de déterminer directement leur existence et d'en conclure un lien de cause à effet avec une pathologie. Ainsi, le stress oxydant est habituellement estimé par des méthodes indirectes (Beauvieux et Peuchant, 2002).

Les paramètres les plus utilisés, bien que demeurant toujours controversés, sont les catabolites issus de la peroxydation lipidique (Favier, 1997 ; Beauvieux et Peuchant, 2002). La mesure des diènes conjugués à 234 nm est utilisée comme indice de peroxydation lipidique (Halliwell et Gutteridge, 1999a). Cette mesure est surtout intéressante pour l'évaluation précoce des peroxydations lipidiques (Halliwell et Chirico, 1993). Leur mesure manque de spécificité en raison de leur production possible par le métabolisme des acides gras dans des situations autres que celles de la peroxydation lipidique (Halliwell et Gutteridge, 1999a).

Parmi les marqueurs du stress oxydant, la mesure de la dialdéhyde malonique (MDA), comme marqueur de l'oxydation des lipides, a été pendant très longtemps considérée comme le test de référence. Malheureusement, la détection de la MDA utilisant l'acide thiobarbiturique manquait de spécificité et était surtout sujette à de nombreux artéfacts. Sur la base de ce test, de très nombreuses erreurs d'interprétation ont été commises, ce qui a parfois jeté le discrédit sur l'importance du stress oxydant en médecine humaine. Des améliorations apportées aux méthodes de dosage de ce paramètre permettent d'éliminer la plupart des artéfacts. A l'heure actuelle, la connaissance du potentiel réactif du MDA et celui des TBARS a permis de séparer les deux concepts de l'index de peroxydation et d'index de peroxydabilité. En effet, dans les milieux biologiques, le MDA existe majoritairement sous forme liée aux protéines, sa concentration circulante est très faible et son appréciation doit se faire préférentiellement par des méthodes autres que celle utilisant l'acide thiobarbiturique (Lefèvre et coll., 1998). En revanche, le dosage des TBARS peut donner un renseignement intéressant concernant la

« peroxydabilité » d'un milieu biologique, c'est-à-dire sa propension à former des produits de la peroxydation lors du stress oxydant (Lefèvre et coll., 1998). Il reste ainsi un test donnant un résultat global, permettant une première approche de la lipoperoxydation et du stress oxydant. Les isoprostanes, de la famille des eicosanoïdes d'origine non enzymatique, sont des produits terminaux, stables et spécifiques de la peroxydation lipidique (Thérond et coll., 2000). Mesurés dans les milieux biologiques, ils fournissent un indice non invasif et quantitatif du stress oxydant *in vivo* (Roberts et Morrow, 2000). L'isoprostane le plus dosé est la 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, cependant des concentrations plasmatiques et urinaires de cette substance peuvent être augmentées dans des circonstances comme le tabagisme, la consommation excessive d'alcool, l'hyper-homocystéinémie et le diabète (Cracowski et coll., 2000 ; Roberts et Morrow, 2000).

Les protéines peuvent également subir des réactions radicalaires ou oxydantes, celles comportant des groupements sulfhydryles étant les plus sensibles aux attaques radicalaires (Sen, 2001). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport, qui après oxydation, deviennent inactives et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. L'évaluation de l'atteinte des protéines au cours du stress oxydant est généralement réalisée par réaction avec la dinitrophénylhydrazine (DPNH) en colorimétrie (Wolff et al., 1986). Cette méthode est assez délicate à mettre en oeuvre du fait des nombreuses manipulations à effectuer. Par ailleurs, un manque de spécificité en relation avec des problèmes d'interférences dues à des aldéhydes ou à des cétones provenant des sucres ont été rapportés (Bonfont-Rousselot et coll., 2003). La spécificité peut être améliorée par le dosage de composés comme le sulfoxyde de méthionine, la nitrotyrosine et l'ortho-tyrosine (Davies et coll., 1999).

Les acides nucléiques constituent également des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires. La recherche d'atteintes touchant ces molécules peut être réalisée par une technique rapide et sensible, la technique des comètes et le dosage des bases oxydées par CPG couplées à la spectrométrie de masse. Les précautions particulièrement contraignantes à respecter lors de l'extraction de l'ADN et lors de son hydrolyse font qu'à ce jour, ces techniques ne sont réalisées que dans des laboratoires spécialisés (Favier 1997).

Une autre approche pour apprécier le stress oxydant consiste à évaluer les systèmes anti-oxydants enzymatiques ou non-enzymatiques. L'évaluation des constituants ayant un rôle anti-oxydant, tels que les vitamines A, E et C, le glutathion, le sélénium, le cuivre et le zinc, renseigne sur la propension d'un individu à développer un stress oxydant. Quel que soit le paramètre, sa détermination nécessite de réelles précautions de prélèvement et de traitement de l'échantillon biologique, rendant difficile sa réalisation en routine (Beauvieux et Peuchant, 2002). On propose souvent la capacité anti-oxydante totale qui n'est qu'un reflet très modeste de ce qui peut se passer au niveau de la concentration plasmatique en anti-oxydants. Ce test consiste à évaluer la capacité que possède le sang total ou le plasma à inhiber la production d'espèces oxygénées réactives générées par un système *in vitro*. C'est une méthode qui procède par addition des activités individuelles de chaque anti-oxydant présent dans ces milieux biologiques. Une baisse de sa valeur n'indique qu'un risque accru, et non la preuve absolue qu'un stress oxydant se soit passé. En effet, il traduit simplement un risque de dérèglement biologique, limité de plus à l'étude de quelques molécules piègeuses dont la nature dépendra de la nature des radicaux générés par la technique.

Une autre approche consiste en l'étude des variations des concentrations d'enzymes anti-oxydantes du globule rouge lors du stress oxydant. Elle a aboutit à des résultats discordants,



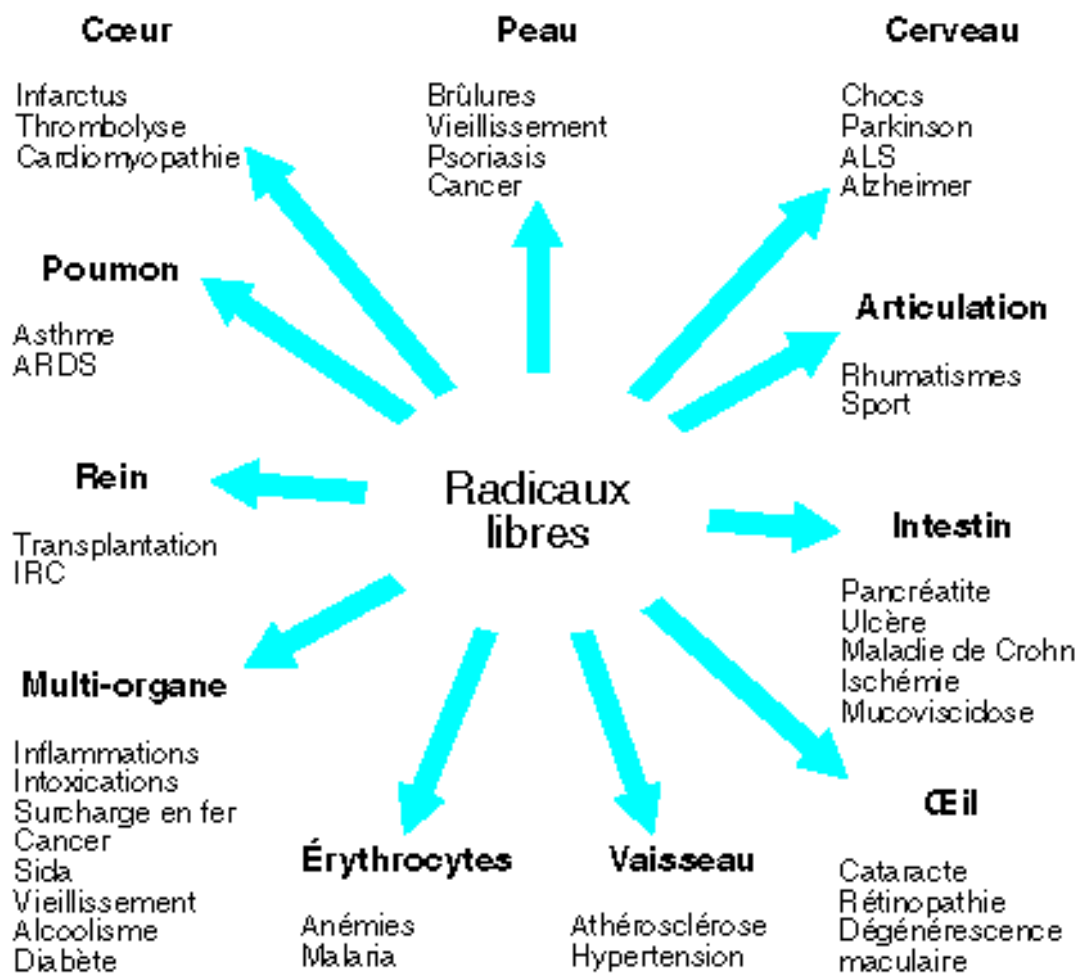
montrant que l'utilisation de l'activité de ces enzymes pour suivre un stress oxydant doit être réalisée avec prudence (Céballos-Picot et coll., 1992 , Berr et coll.1993 ; Pincemail, 1999).

Une connaissance approfondie de la littérature scientifique s'avère donc nécessaire pour garder un esprit critique sur tous ces moyens d'investigation. Evaluer correctement un statut de stress oxydant ne pourra donc se réaliser que sur base d'une combinaison de tests qui se compléteront. Dans tous les cas, une attention toute particulière devra être accordée aux conditions de prélèvement et de traitement des échantillons sanguins, car la plupart des molécules testées sont en réalité peu stables. A ce titre, il conviendra de centrifuger les échantillons sanguins immédiatement après le prélèvement, mais également maintenir la chaîne du froid pour les plasmas ou les autres types d'échantillons jusqu'à l'analyse. Ces deux conditions pré-analytiques, bien que contraignantes, sont les principales garanties de résultats de qualité.

### **III. 3. Stress oxydant et maladies**

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires, de situations d'ischémie-reperfusion et de désordres dégénératifs. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (Figure 7). A titre d'exemple, une étude épidémiologique réalisée aux Etats-Unis et incluant environ 10 000 patients a montré qu'une concentration sérique élevée de ferritine (marqueur d'une surcharge en fer de l'organisme) est associée à un

risque accru d'apparition de diabète de type 2 (Ford et Cogswell, 1999). Chez ces mêmes patients, l'intérêt de l'utilisation d'un chélateur du fer (la desferrioxamine) dans le contrôle de la glycémie a été auparavant rapporté (Cutler, 1989). Ces deux résultats laissent penser que le stress oxydant induit par le fer diminue la sensibilité du muscle et du foie à l'insuline (Faure et Bonnefont-Rousselot, 2005). De même, à l'origine de molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant a été décrit comme impliqué dans le développement de maladies comme le cancer, les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique) et le vieillissement accéléré. Il est également admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer (Montagnier et coll., 1998). Le rôle de l'oxydation des LDL dans la transformation des macrophages en cellules spumeuses constitue un des points clés de la genèse de plaque d'athérome (Moatti, 2003). Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'anti-oxydants peut retarder, voir prévenir, l'apparition de telles maladies. De même, des études ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses anti-oxydantes, d'une augmentation de la production mitochondriale d'ERO, et d'une efficacité diminuée des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés. Ainsi, le vieillissement expose à un stress oxydant susceptible de déclencher ou de favoriser de nombreuses pathologies (Bonnefont-Rousselot et coll., 2001 ; Sohal et coll., 2002 ; Delattre et coll., 2005). Au cours de ces dernières années, de très nombreuses études épidémiologiques ont montré très clairement que la consommation régulière de fruits et légumes riches en anti-oxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition des maladies cardiovasculaires et du cancer.



**Figure 7 : Principales circonstances pathologiques s’accompagnant d’un stress oxydant primitif ou secondaire (Favier, 1997).** ARDS : syndrome de détresse respiratoire aiguë ; SIDA : syndrome immunodéficience acquise ; ALS : sclérose latérale amyotrophique ; IRC : insuffisance rénale chronique.

## **IV. Conclusion**

Il est actuellement bien admis que les radicaux libres provoquent des dommages cellulaires importants, pouvant conduire à des défaillances au sein d'un organe. Dans ce contexte, le stress oxydant est de plus en plus impliqué dans les processus du vieillissement accéléré, dans l'apparition de complications cliniques ou le développement de maladies multifactorielles (athérosclérose, cancer, maladies neurodégénératives). Un champ d'investigations important est donc en train de s'ouvrir dans le domaine du diagnostic du stress oxydant et des thérapies permettant de limiter ses effets néfastes. La prise en compte de cette nouvelle discipline en routine clinique devrait révolutionner la médecine de demain et avoir un impact économique important en terme de soins de santé. Pour cela, il convient de disposer d'outils d'analyses performants et spécifiques devant permettre de le mettre en évidence et de l'évaluer. Chaque marqueur présente des limites et ne peut donc à lui seul refléter un état de stress oxydant. Il sera donc nécessaire d'utiliser une combinaison de tests adaptés, car le stress oxydant se manifeste de façon différente selon la situation physiologique ou pathologique envisagée..

## **Deuxième Partie : Généralités sur l'haptoglobine**

## I. Introduction

L'haptoglobine (Hp) est une glycoprotéine dont la concentration plasmatique augmente dans les syndromes inflammatoires et diminue au cours des hémolyses. Comme son nom l'indique (haptein = bind = fixer), son rôle est de fixer l'hémoglobine libérée lors d'épisodes hémolytiques. Elle a été découverte en 1938 par Polonovski et Jayle (Polonovski et Jayle, 1938), puis Smithies découvrit plus tard ses variants génétiques (Smithies, 1955). L'Hp est synthétisée par le foie et fixe avec une grande affinité l'hémoglobine libre (Hb) pour former un complexe stable (Hp-Hb) (McCormick et Atassi, 1990). Ce dernier peut se former aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et possède une activité peroxydasique (Jayle, 1951). La formation de ce complexe et son élimination grâce à sa fixation sur le récepteur CD163 des monocytes-macrophages (Kristiansen et coll., 2001 ; Graversen et coll., 2002) permet de prévenir la perte de fer et les dommages médiés par le fer au niveau du parenchyme rénal (Bowman, 1993 ; Lim et coll., 2001). L'Hp a été décrite comme un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines et de ce fait possède une action anti-inflammatoire (Kendall, 1979 ; Jue, 1983) . C'est une protéine présente chez tous les mammifères, mais son polymorphisme n'a été retrouvé que chez l'homme (Bowman, 1993). Trois phénotypes majeurs de l'Hp ont été identifiés par électrophorèse sur gel d'amidon et dénommés : Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2 (Smithies, 1955 ; Smithies, 1959). Les phénotypes d'Hp présentent des différences sur le plan structural en rapport avec d'importantes différences fonctionnelles (Bowman et Kurosky, 1982 ; Langlois et Delanghe, 1996). Ces activités biologiques différentes liées au polymorphisme de l'Hp sont en relation avec de pertinentes conséquences cliniques, notamment sur le plan infectieux et la stratification des risques cardiovasculaires (Delanghe et coll., 1998c ; Asleh et coll., 2003 ; Asleh et coll. 2005).

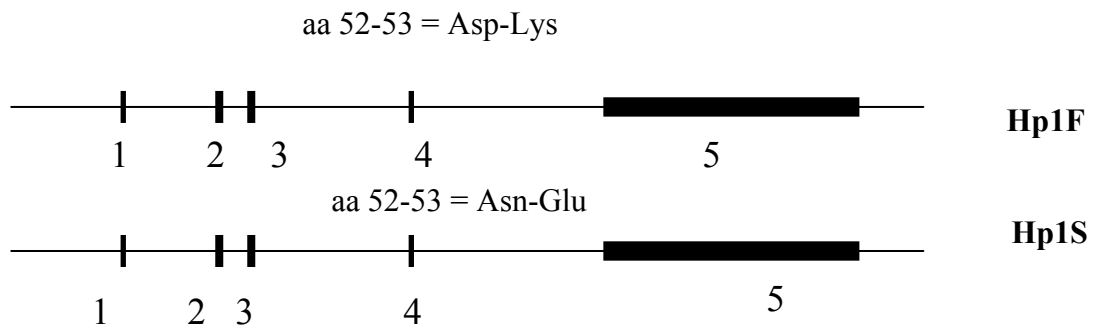
## II. Structure de l'haptoglobine

### II. 1. Structure du gène de l'haptoglobine

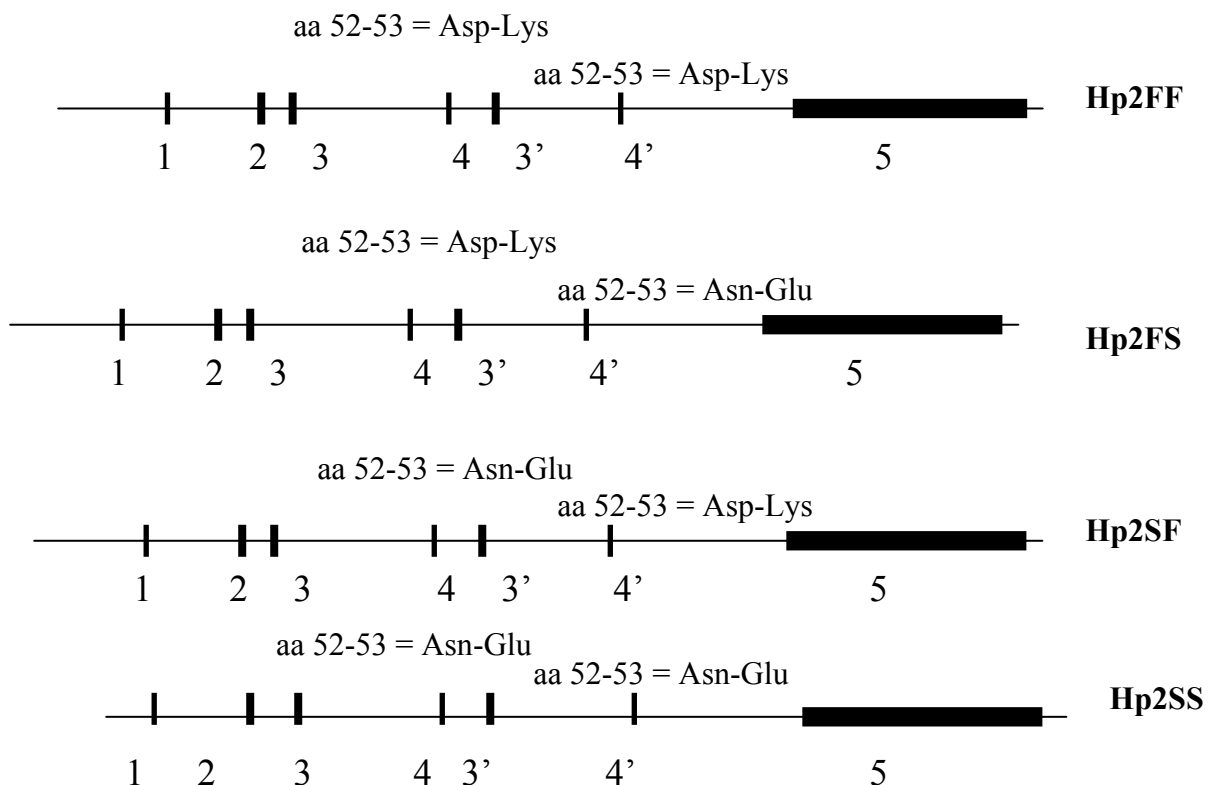
Les différences structurales des phénotypes d'Hp ont été suspectées pour la première fois par Jayle et Judas en 1946 (Jayle et Judas, 1946). Grâce à l'utilisation d'une électrophorèse sur gel d'amidon, Smithies a pu identifier 3 phénotypes majeurs de l'haptoglobine notés Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2 (Smithies, 1955). La protéine d'Hp consiste en 2 chaînes polypeptidiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ) codées par des gènes localisés au niveau du chromosome 16q22 (Bowman et Kurosky, 1982). Ces phénotypes sont contrôlés par l'existence de 2 allèles (Hp1 et Hp2). L'allèle Hp1 est très conservé suivant les espèces, alors que l'allèle Hp2 n'a été retrouvée que chez l'homme (Bowman et Kurosky, 1982 ; Yang et coll., 1993). Le gène de l'Hp est organisé en cinq exons. Les 4 premiers exons codent pour la sous-unité  $\alpha$  alors que le dernier code pour la sous unité  $\beta$ . L'allèle Hp2 est un produit de duplication interne d'un fragment de DNA du gène de l'Hp1 d'une longueur de 1,7 kb incluant les exons 3 et 4 du gène, ce qui fait que l'allèle Hp2 possède 7 exons. Un troisième génotype, Hp Johnson, a été décrit (Smithies et coll., 1962). Il est de fréquence rare et diffère du prototype Hp1 au niveau de la sous-unité  $\alpha$  par l'existence d'une triPLICATION interne, toujours sur le même fragment de DNA du gène de l'Hp1. De ce fait, l'allèle l'Hp Johnson contient 9 exons au lieu de 5. Ainsi, la chaîne  $\alpha$  résultant de l'expression de l'allèle Hp Johnson, dénommée  $\alpha_3$ , a une masse molaire 3 fois plus importante que celle de la chaîne  $\alpha_1$ . Les deux allèles majeurs de l'Hp peuvent être subdivisées en sous-types Hp1S, Hp1F, Hp2FF, Hp2FS, Hp2SF et Hp2SS. Hp1F et Hp1S, codant pour des polypeptides qui diffèrent par 2 acides aminés en position 52 et 53 de l'exon 4 (Figure 8). Hp1F possède un acide aspartique et une lysine en positions 52 et 53 et est doté

d'une rapide mobilité électrophorétique. Hp1S a au niveau de ces mêmes positions une asparagine et un acide glutamique, respectivement (Maeda, 1991). Hp2 étant le produit d'une duplication interne des exons 3 et 4, les possibles permutations sont Hp2FF, Hp2FS, Hp2SF et Hp2SS (Marles et coll., 1993).

### allèle Hp1



### allèle Hp2



**Figure 8 : Polypeptides codés par les allèles de l'haptoglobine** (Lim et coll., 2001). Chaque allèle a 5 exons représentés par des traits. Les exons 3 et 4 sont dupliqués au niveau de Hp2.



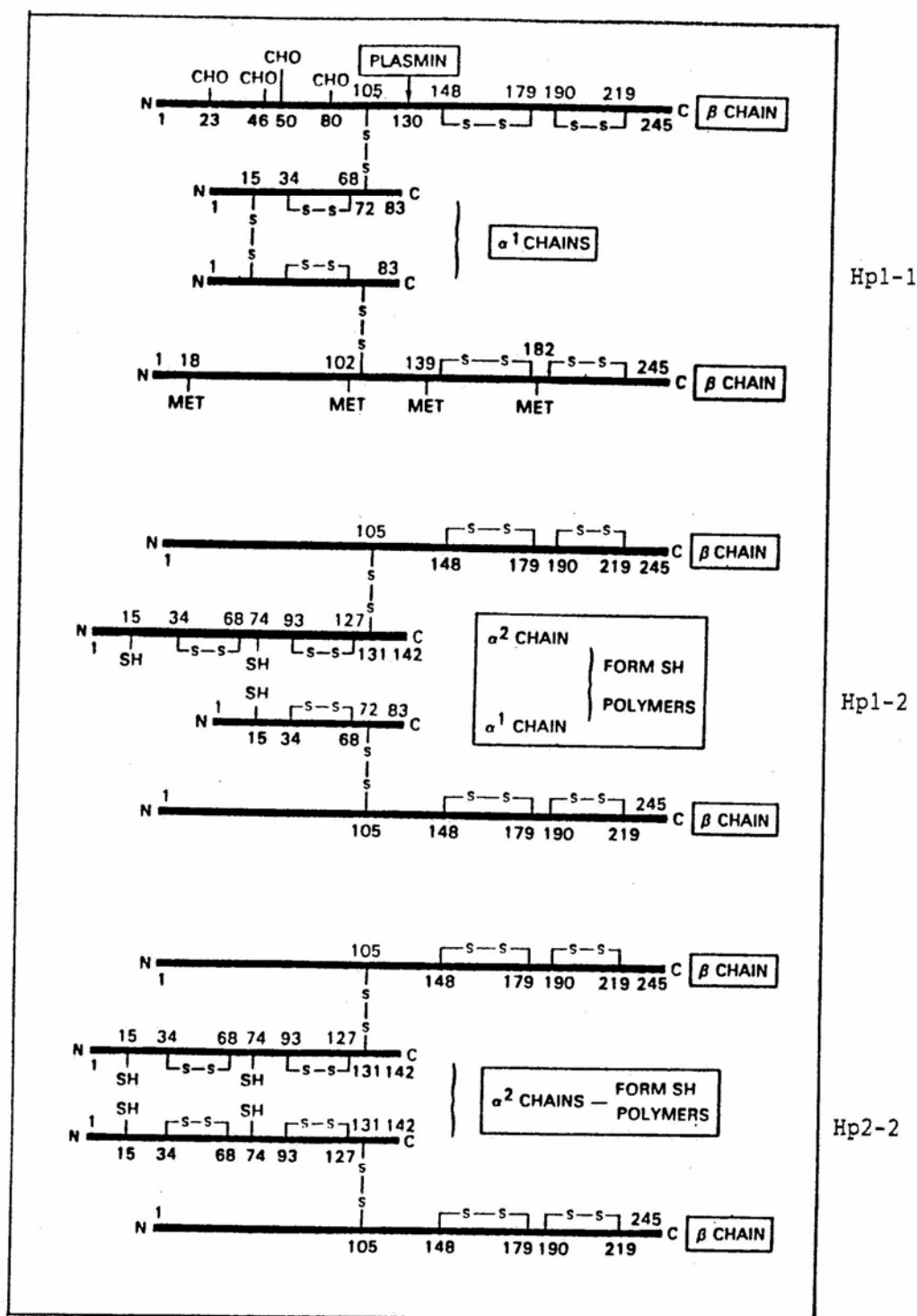
## II. 2. Structure de la protéine

### II. 2. 1. Structure primaire et structure secondaire

L'haptoglobine est un tétramère de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes  $\beta$  et deux chaînes  $\alpha$  reliées entre elles par des ponts disulfures. Deux types de chaînes  $\alpha$  ont été décrits : les chaînes  $\alpha 1$  et les chaînes  $\alpha 2$ .

Les chaînes  $\alpha 1$  sont des polypeptides formés de 83 acides aminés comportant un pont disulfure intrachaîne en position 34-68 et des ponts disulfures interchaînes  $\alpha$  en position 15 ( $\alpha 15$ - $\alpha 15$ ) et en position 72 ( $\alpha 72$ - $\beta 105$ ) (Figure 9). La chaîne  $\alpha 1$  présente 2 sous-types notés suivant leur mobilité électrophorétique  $\alpha 1^F$  et  $\alpha 1^S$  (F pour fast et S pour slow). Les sous-types  $\alpha 1^F$  et  $\alpha 1^S$  diffèrent seulement par un acide aminé : la lysine en position 54 de la chaîne  $\alpha 1^F$  est remplacée par l'acide glutamique au niveau de la chaîne  $\alpha 1^S$  par le biais d'une mutation intervenue au niveau du gène Hp1 (Smithies et coll., 1962). Cette différence concernant l'acide aminé en position 54 est responsable de la différence de mobilité électrophorétique (Maeda, 1991).

Les chaînes  $\alpha 2$  sont constituées d'une chaîne polypeptidique de 142 acides aminés comportant deux ponts disulfures intrachaînes en positions 34-68 et 93-127 et une liaison disulfure interchaîne  $\alpha$ - $\beta$  en position 131 ( $\alpha 131$ - $\beta 105$ ) (Figure 9). Elles comportent en plus deux résidus cystéinyles en position 15 et 74 pouvant former des ponts disulfures entre les chaînes  $\alpha$ . La présence de ponts disulfures a pour conséquence la formation de polymères de hauts poids moléculaires, linéaires pour le phénotype Hp 2-1 et circulaires pour le phénotype Hp 2-2 (Bowman et Kurosky, 1982 ; Wejman et coll., 1984).



**Figure 9 : Représentation schématique de la structure des trois phénotypes d'haptoglobine Hp 1-1, Hp 2-1 et Hp 2-2 (Bowman et Kurosky, 1982).** Les groupements CHO indiquent les liaisons des radicaux hydrocarbonés sur les asparagines. La plasmine hydrolyse les chaînes  $\beta$  au niveau de la Lysine-130. Les groupements -SH libres sur les Cys-15 et Cys 74 peuvent être impliqués dans la formation de polymères.

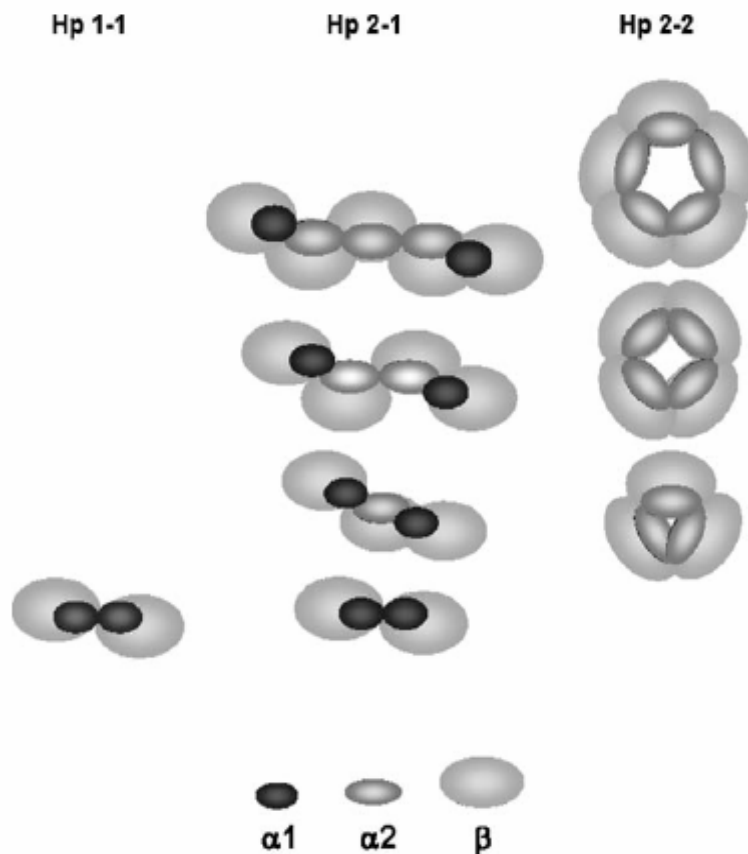
La chaîne  $\beta$  est identique pour tous les phénotypes majeurs de l'Hp. Elle est constituée d'une même chaîne polypeptidique de 245 acides aminés comportant deux ponts disulfures intrachânes au niveau des positions 148-179 et 190-219, et une liaison disulfure interchaîne  $\alpha$ - $\beta$  en position 105. Cette chaîne  $\beta$  porte les groupements glucidiques de l'Hp (Wassel, 2000).

Plusieurs auteurs ont montré que l'Hp ne possède pas de structure en hélice  $\alpha$  et se présente comme formée en apparence uniquement de feuilletts  $\beta$ , l'ensemble donnant à la protéine l'image d'une masse ellipsoïdale. A titre d'exemple, Wejmann et coll. ont proposé, grâce à des travaux de microscopie électronique à transmission, un modèle sous forme de pince avec deux têtes sphériques : les chaînes  $\beta$  connectées à un "nœud" central formé par les chaînes  $\alpha$  (Wejman et coll., 1984).

Parmi les trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine, les phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-2 sont homozygotes et le phénotype 2-1 est hétérozygote. Hp 1-1 est constitué d'un tétramère  $(\alpha_1\beta)_2$ , alors que Hp 2-2 est constitué de polymères cycliques  $(\alpha_2\beta)_n$ . Hp 2-1 est constitué d'un tétramère  $(\alpha_1\beta)_2$  et de polymères linéaires constitués de chaînes  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$  (Figure 10). D'autres phénotypes plus rares ont été décrits. Ainsi, des mutations sur le gène Hp2 produisent les phénotypes Hp 2-1 modifiés (Hp 2-1M), Hp 2-1 (trans), Hp 2-1 Ha (Hawaï), Hp Ab et Hp 1-H, tandis que celles portant sur le gène Hp1 aboutissent à des phénotypes comme l'Hp Carlberg. Des mutations portant sur les séquences codantes pour les chaînes  $\beta$  aboutissent aux phénotypes Marburg (HpMb) et Bellevue qui ont une affinité de fixation de l'hémoglobine diminuée, ou au phénotype Porto Alegre qui a perdu toute capacité de fixation de l'hémoglobine (Bowman et Kurosky, 1982). L'absence d'expression du gène de l'Hp correspond au phénotype Hp 0-0, retrouvé chez à une fréquence de 1/1000 dans les populations caucasiennes (Schultze et Heremans, 1966). Des fréquences plus élevées ont été retrouvées chez les noirs, en particulier en Afrique de l'est où elles peuvent atteindre 30 %

(Allison et coll, 1958), alors que des fréquences moins élevées sont retrouvées chez les noirs d'Amérique (4 %) (Giblett, 1959)

L'hétérogénéité des phénotypes d'Hp est due aux variations au niveau des chaînes alpha :  $\alpha 1$  (8.9 kDa) et  $\alpha 2$  (16 kDa). La chaîne  $\alpha 1$  est unique au phénotype Hp 1-1 comme l'est la chaîne  $\alpha 2$  pour le phénotype Hp 2-2. La chaîne  $\beta$  (40 kDa) est quant à elle identique pour tous les phénotypes d'Hp et est porteuse de groupements glucidiques variables (Ang et coll., 2006). Ces derniers influencent la fixation de l'hémoglobine ainsi que d'autres propriétés de l'Hp. En effet, des changements dans leur structure ont été associés avec le développement de nombreux états pathologiques incluant le cancer, des maladies inflammatoires et maladies du foie (Thompson et coll., 1992 ; Mann et coll., 1994 ; Katnik et coll.; 1996 ; Ang et coll., 2006).



**Figure 10 : Représentation schématique des phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine** (Yueh et coll., 2006). Hp 1-1 est composé d'un seul tétramère ( $\alpha 1$ - $\beta$ )<sub>2</sub>. Hp 2-1 est composé de plusieurs structures : un tétramère ( $\alpha 1$ - $\beta$ )<sub>2</sub>, un hexamère ( $\alpha$ - $\beta$ )<sub>3</sub>, et d'autres polymères linéaires ( $\alpha$  représente ici les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ). Hp 2-2 est composé d'un hexamère ( $\alpha 2$ - $\beta$ )<sub>3</sub> et d'autres polymères cycliques. Les chaînes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , et  $\beta$  sont composées de 83, 142 et 245 acides aminés, respectivement.

### ***II. 2. 2. Analogies structurales de l'haptoglobine avec d'autres protéines***

Sur le plan de la structure primaire, plusieurs auteurs ont rapporté une analogie structurale entre la chaîne  $\beta$  de l'Hp et la famille des sérines protéases, groupe d'enzymes protéolytiques incluant la trypsine, la chymotrypsine, la thrombine, la plasmine, l'élastase et quelques facteurs du complément (Kurosky et coll., 1980 ; Arcaleo et Greer, 1982). Ainsi, les acides aminés en position 57 (His) et 195 (Ser) nécessaires à l'activité des sérines protéases sont remplacés dans la chaîne  $\beta$  par une lysine et une alanine, respectivement (Kurosky et coll., 1980 ; Arcaleo et Greer, 1982). A côté de la perte de l'activité protéolytique par

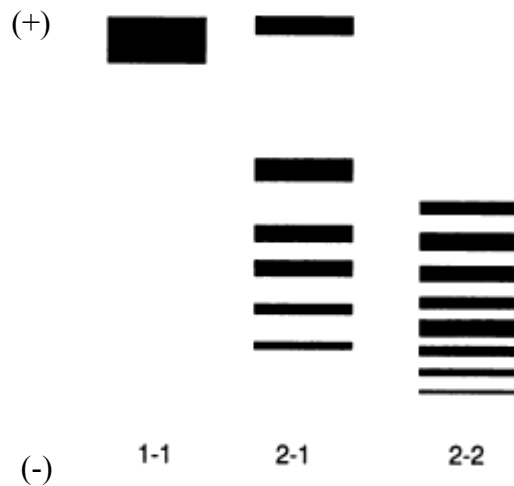
l'haptoglobine au cours de l'évolution, la chaîne  $\beta$  de cette protéine a acquis la capacité de fixation de l'hémoglobine (Dobryczycka et Przyiecki, 1984 ; Langlois et Delanghe, 1996). De même, une homologie portant sur 25 % d'acides aminés a été trouvée entre la chaîne  $\alpha 1$  de l'haptoglobine et deux peptides activateurs des sérines protéases au niveau du domaine "Kringle" de la thrombine et de la plasmine (Kurosky et coll, 1980). Des homologies entre la chaîne  $\beta$  de l'Hp et la lectine concanavaleine A des plantes d'une part, et entre la chaîne  $\alpha$  et les chaînes légères des immunoglobulines, d'autre part, ont été également rapportées (Black et Dixon, 1968 ; Kurosky et coll., 1980).

### **III. Propriétés physicochimiques**

#### **III. 1. Propriétés électrophorétiques**

L'électrophorèse en gel d'amidon ou de polyacrylamide à pH 8,6 permet de distinguer les trois phénotypes majeurs de l'Hp avec une seule bande pour Hp 1-1 et plusieurs bandes pour Hp 2-1 et Hp 2-2 (en fonction du degré de polymérisation de chaque phénotype). La mobilité électrophorétique de l'Hp est de 4,5 unités Tiselius dans un tampon pH 8,6. Son point isoélectrique (pI) varie de 3,9 à 4,2 en fonction des phénotypes (Yang et Przybylska, 1973).

L'électrophorèse en gel d'amidon dans un tampon formiate à pH 4,0 en présence d'un mélange de 2-mercaptoéthanol (5 %) et d'urée (8 mol/L) qui rompt les ponts disulfures et sépare ainsi les polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$ , permet d'individualiser les différents sous-types de l'Hp (Putnam, 1975).



**Figure 11 : Modèle électrophorétique typique des phénotypes d'haptoglobine 1-1, 2-1 et 2-2 sur gel de polyacrylamide de sérum supplémenté en hémoglobine (Langlois et Delanghe, 1996).**

### III. 2. Solubilité

L'étude de la solubilité de l'Hp montre une précipitation dans une solution de sulfate d'ammonium 2,0 mol/L. Les formes hautement polymérisées de type Hp 2-2 nécessitent une solution de concentration de 2,0 à 2,4 mol/L pour précipiter (Putnam, 1975).

### III. 3. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés établie par séquençage est donnée dans le Tableau II (Bowman et Kurosky, 1982). Fait rare dans la composition d'un polypeptide, on note l'absence de méthionine et de phénylalanine dans les chaînes  $\alpha$ . La proportion en masse de glucides (hexoses, glucosamine, acide sialique) par molécule d'haptoglobine est en moyenne

de  $19,8 \pm 2,5$  % (Bowman et Kurosky, 1982), la structure de base étant la mannosyl-N-acétylglucosamine (Dobryczycka et Przyiecki, 1992).

**Tableau II : Composition en acides aminés (en nombre) des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'Hp humaine (Bowman et Kurosky, 1982).**

Acides aminés	Chaîne $\alpha 1$	Chaîne $\alpha 2$	Chaîne $\beta$
Acide aspartique	7	11	11
Asparagine	7	11	13
Thréonine	3	5	17
Sérine	2	3	14
Acide glutamique	6	12	14
Glutamine	3	5	11
Proline	7	11	10
Glycine	7	12	17
Alanine	5	8	18
Cystéine	4	7	5
Valine	8	12	23
Méthionine	0	0	4
Isoleucine	3	5	12
Leucine	3	6	20
Tyrosine	5	10	11
Phénylalanine	0	0	7
Histidine	2	4	9
Lysine	8	14	20
Arginine	2	4	4
Tryptophane	1	2	5
<b>Total</b>	<b>83</b>	<b>142</b>	<b>245</b>



### III. 4. Masses moléculaires

Les résultats des différentes études menées concernant l'établissement des masses moléculaires varient quelque peu en fonction des méthodes de mesure utilisées (Kurosky et coll., 1980 ; Langlois et Delanghe, 1996). Les masses moléculaires apparentes suivantes ont été proposées (Bowman et Kurosky, 1982 ; Langlois et Delanghe, 1996) :

- chaîne  $\alpha 1$  : 8.9 kDa
- chaînes  $\alpha 2$  : 16 kDa
- chaîne  $\beta$  : 40 kDa.

Différentes propriétés des phénotypes majeurs de l'haptoglobine, ainsi que leurs valeurs usuelles dans le sérum, sont répertoriées dans le Tableau III

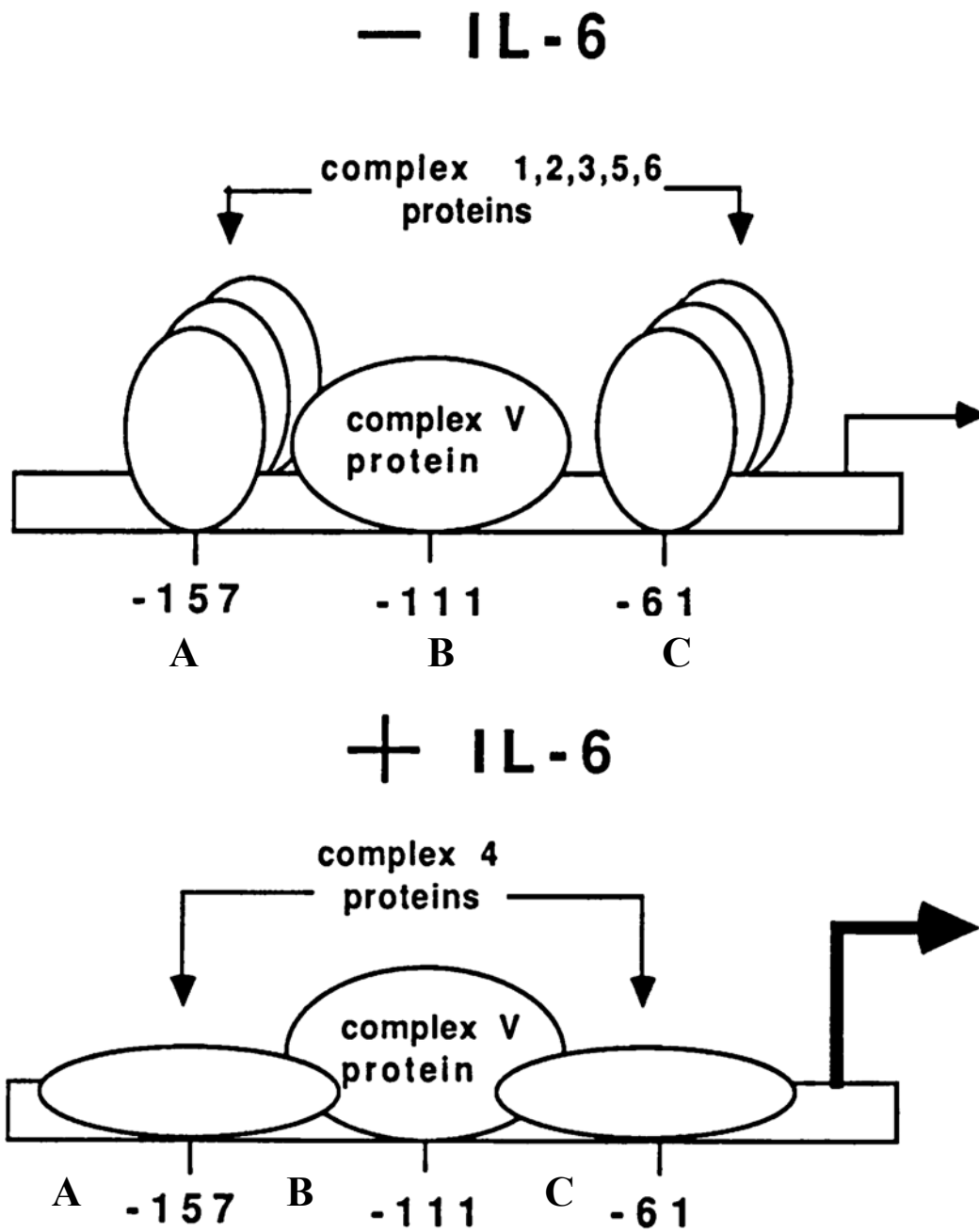
**Tableau III : Principales propriétés physiques et valeurs de références des phénotypes d'Hp**

	<b>Hp 1-1</b>	<b>Hp 2-1</b>	<b>Hp 2-2</b>
Formule moléculaire	$(\alpha 1\beta)_2$	$(\alpha 1\beta)_2+(\alpha\beta)_n$	$(\alpha 2\beta)_n$
Masse moléculaire apparente (kDa)	86	86-300	170-900
Valeurs usuelles dans le sérum (g/L) (Thomas, 1992)	0,57-2,27	0,44-1,83	0,38-1,50

$\alpha = \alpha 1$  et/ou  $\alpha 2$

#### **IV. Synthèse de l'haptoglobine**

Le foie est le principal organe responsable de la synthèse de l'Hp humaine. En dehors du foie, le gène de l'Hp est exprimé dans d'autres tissus comme les poumons, la peau, des cellules réticulo-endothéliales de la rate, des ganglions lymphatiques, le thymus, le rein et le tissu adipeux chez la souris (Wada et coll., 1970 ; Friedrichs et coll., 1995 ; D'Armiento et coll., 1997). La synthèse de l'Hp est augmentée par l'hormone de croissance, l'insuline, l'endotoxine bactérienne, les prostaglandines (Raynes et coll., 1991 ; Bowman, 1993). La synthèse hépatique de l'haptoglobine est induite par les cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1 (IL-1), et le tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) (Raynes et coll., 1991 ; Bowman, 1993). Trois régions de régulations de l'action de l'IL-6 ont été identifiées au niveau du promoteur du gène de l'Hp humaine : A (-157), B -111) et C (-61) (Oliviero et Cortese, 1989 ; Bowman, 1993). Au cours de la phase aiguë de l'inflammation, l'IL-6 induit un facteur nucléaire de transcription, l'interleukin-6-dependent binding protein (IL-6DBP), encore appelé complexe 4, qui remplace les protéines liées aux régions A et C (Oliviero et Cortese, 1989). Il en résulte une activation de la transcription, donc de la synthèse de l'Hp (Figure 11). La région B fixe plusieurs protéines nucléaires différentes de IL-6DBP et qui forment des complexes identiques dans les cellules activées ou non par l'IL-6 (Bowman, 1993 ; Oliviero et Cortese, 1989 ; Langlois et Delanghe, 1996).

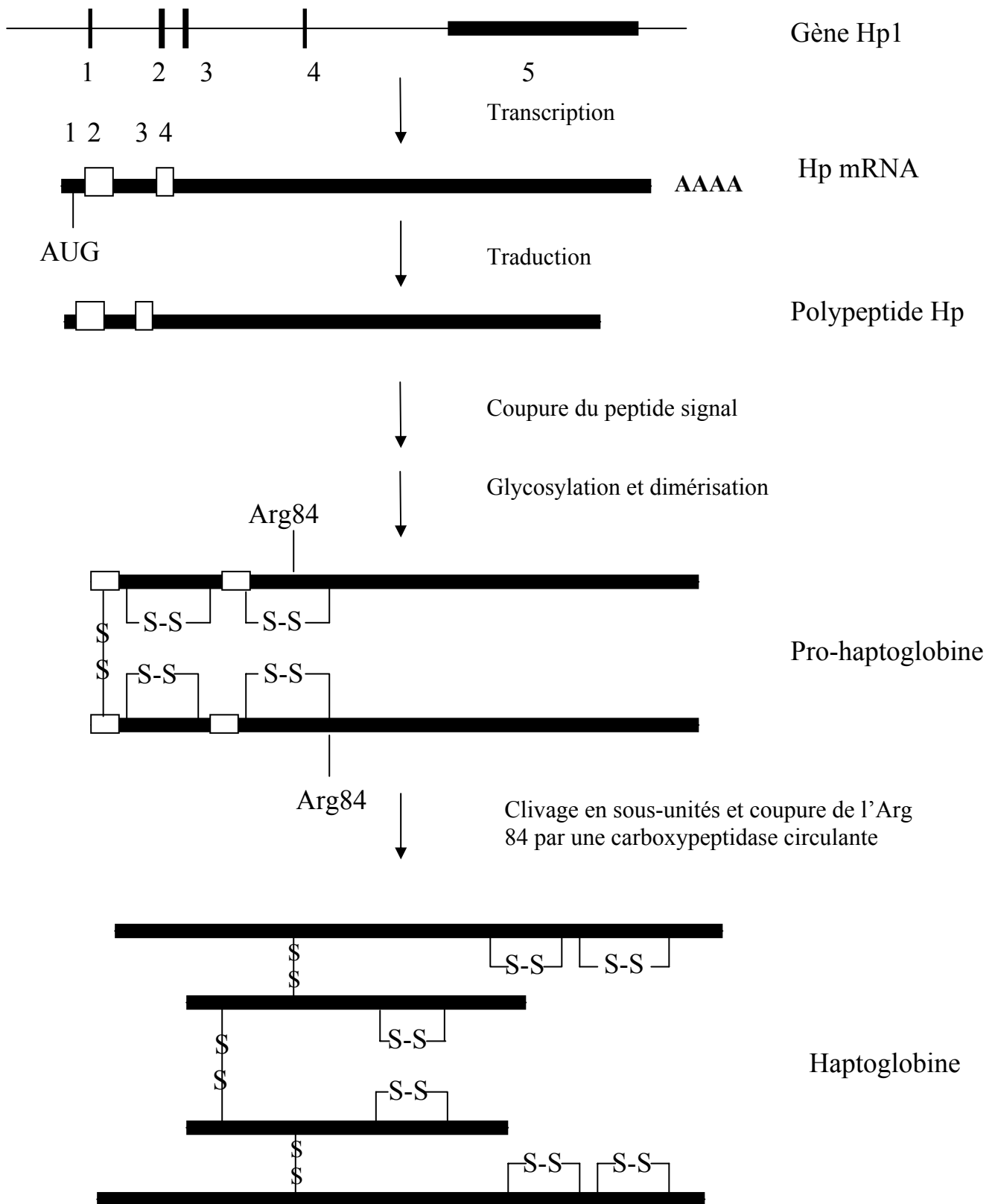


**Figure12 : Schéma illustrant la stimulation de la synthèse de l'haptoglobine par l'IL-6** (Oliviero et Cortese, 1989). En absence d'IL-6, le promoteur du gène de l'Hp est transcrit à un niveau basal. Le comportement du complexe V est corrélé à l'activité transcriptionnelle ; la présence des protéines liées aux régions A et C (qui sont soit des répresseurs, soit de faibles activateurs), fait que le gène de l'haptoglobine n'est que faiblement transcrit. En présence d'IL-6, la substitution des protéines des régions A et C par le complexe 4 induit par l'IL-6 entraîne une activation de la transcription, donc de la synthèse de l'haptoglobine

La synthèse de l'Hp suit les mécanismes traditionnels de la biosynthèse des protéines : transcription du DNA en mRNA, maturation et épissage de ce dernier, puis traduction au niveau ribosomal en polypeptide précurseur lui-même mûré en peptide actif après glycosylation par les enzymes cellulaires, et enfin sécrétion. 30 % à 50 % de l'Hp circulante sont synthétisées chaque jour (Putnam, 1975).

Le dimère  $\alpha/\beta$  est synthétisé sous forme d'un précurseur unique : la pro-pro-haptoglobine issue de la traduction d'un même ARN messenger HpmRNA (Yang et coll., 1983 ; Van der Straten et coll., 1984). La pro-pro-haptoglobine est constituée d'un peptide signal hydrophobe de 18 acides aminés situé du côté N-terminal, d'une chaîne  $\alpha$  formée de 83 acides aminés, d'un résidu arginine en position 84 et d'une chaîne  $\beta$  formée de 245 acides aminés et située du côté carboxy-terminal. La chaîne  $\beta$  de l'haptoglobine humaine possède 4 sites potentiels de N-glycosylation, alors que celle de la souris ou du rat en possède 2 (Bowman et Kurosky, 1982 ; Thompson et coll., 1992). Au cours des étapes de maturation, le peptide signal est enlevé et la pro-pro- Hp se dimérise pour former une pro-Hp. Le radical de la sous-unité  $\beta$  glycosylée est transformé en complexe de chaînes de liaisons de l'acide sialique au niveau de l'appareil de golgi, entraînant la formation de pro-haptoglobine glycosylée (Figure 12). La pro-haptoglobine est clivée au niveau du résidu arginine en position 84 pour donner un résidu de chaîne  $\alpha$  de 84 acides aminés et un autre de chaîne  $\beta$  de 245 acides aminés (Yang et coll., 1983 ; Hanley et Heath, 1985). Les 2 chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont reliées entre elles par des ponts disulfures et l'arginine en position 84 des chaînes  $\alpha$  est enlevée par une carboxypeptidase circulante (Lim et coll., 2001). La protéine d'Hp mature consiste en une glycoprotéine avec environ 20 % de résidus glucidiques (Thompson et coll., 1992).

Les concentrations en Hp circulante varient durant la vie. Chez le nouveau-né, elles sont plus faibles (0,2 g/L) (Boggs, 1967), mais augmentent rapidement au cours des premiers jours de la vie (Bienvenu, 1984). Elles atteignent les concentrations retrouvées chez l'adulte au bout de 8 à 10 mois (Kushner, 1982). Chez les adultes sains, les concentrations d'Hp sont comprises entre 0,38 et 2,27 g/L (Langlois et Delanghe, 1996). Ces concentrations sont dépendantes du phénotype d'Hp. Les individus ayant le phénotype Hp 1-1 ont des concentrations d'Hp plus élevées que ceux de phénotype Hp 2-2, les concentrations des individus avec le phénotype 2-1 étant intermédiaires. Les concentrations d'haptoglobine circulante sont modulées par l'action combinée d'hormones activatrices et inhibitrices de sa synthèse.



**Figure 13 : Synthèse de l'haptoglobine 1** (Bowman et Kurosky, 1982). Le gène Hp1 est transcrit sous forme d'un ARN messager polyadénylé avec un codon "start" au niveau de l'exon 1 pour donner un polypeptide simple. Le peptide signal est clivé, puis le polypeptide est glycosylé. La pro-pro-Hp glycosylée se dimérise ensuite pour donner la pro-haptoglobine. La pro-haptoglobine subit un clivage protéolytique au niveau de l'arginine-84 du côté C terminal pour donner les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . L'Arg-84 est enlevée par une carboxypeptidase circulante.

## V. Distribution géographique

L'étude de fréquences des gènes de l'Hp a montré une répartition différente selon les régions considérées avec des fréquences basses de l'Hp1 en Asie du sud-est et des fréquences élevées en Afrique et en Amérique du sud (Schultze et Heremans, 1966). L'étude de la distribution des phénotypes en Europe du nord-ouest a montré une fréquence de l'ordre de 16 % pour le phénotype Hp 1-1, 48 % pour le phénotype Hp 2-1 et 36 % pour le phénotype Hp 2-2, ce qui correspond à une fréquence de 40 % pour l'allèle Hp1 et 60 % pour l'allèle Hp2 (Schultze et Heremans, 1966). La fréquence de l'allèle Hp1 augmente, d'une part de l'Asie du sud en direction de l'Europe et de l'Afrique, et d'autre part de l'Asie vers l'Amérique en passant par l'Alaska. La plus grande fréquence de Hp1 a été retrouvée chez les Indiens Araucaniens du Chili (Nagel et Etcheverry, 1963 ; Schultze et Heremans, 1966). La distribution géographique des phénotypes d'haptoglobine à travers quelques régions du monde est répertoriée dans le Tableau IV.

**Tableau IV : Distribution géographique (%) des phénotypes d'haptoglobine** (Langlois et Delanghe, 1996).

<b>Population</b>	<b>Hp 1-1</b>	<b>Hp 2-1</b>	<b>Hp 2-2</b>	<b>Hp 0-0</b>	<b>Hp1(a)</b>	<b>Références</b>
<b>Caucasiens</b>						
<b>Amérique du nord</b>						
Canada	21.1	50.5	28.4	0.0	46 %	Allison et coll., 1958
Etats-Unis (Seattle)	14.4	48.2	37.4	0.3	38 %	Giblett, 1959
<b>Europe</b>						
Belgique (Gent)	13.0	53.0	34.0	0.0	40 %	Louagie et coll, 1993
France (Paris)	15.3	49.7	35.0	0.0	40 %	Van Sande, 1963
Allemagne	14.0	48.0	38.0	0.0	46 %	Thomas, 1992
Hongrie (Budapest)	12.6	47.2	40.2	0.0	36 %	Hever, 1969
Suède (Umea)	13.5	47.5	39.0	0.0	37 %	Fröhlander, 1989
UK (Oxford)	10.1	55.5	31.7	0.0	43 %	
<b>Asie</b>						
Iran (Moslem)	8.2	40.8	51.3	0.0	28 %	Bowman, 1964
Inde (Hyderabad)	2.5	13.3	84.2	0.0	9 %	Padma et Valli, 1988
<b>Australie</b>						
Australie (Melbourne)	15.5	48.5	34.3	1.7	40 %	Mitchell, 1988
<b>Noirs</b>						
<b>Afrique</b>						
Burundi (Hutu)	28.2	47.9	19.8	4.1	52 %	Van Sande, 1963
Burundi (Tutsis)	27.9	47.7	22.1	2.3	52 %	Van Sande, 1963
Nigéria (Yoruba)	53.5	11.1	3.0	32.3	59 %	Allison et coll., 1958
Libéria/ Côte d'ivoire	48.7	42.3	9.1	0.0	70 %	Allison et coll., 1958
<b>Amérique du Nord</b>						
Etats Unis (Seattle)	26,4	31,2	38,2	4,2	54 %	Giblett, 1959
<b>Mongoloïdes</b>						
<b>Asie</b>						
Thaïlande (nord-est)	5.7	37.1	54.8	2.3	24 %	Blackwell, 1963
Chine	9.4	35.2	55.4	0.0	27 %	Zhao et coll., 1993
Taiwan (Taipei)	9.3	37.7	52.9	0.0	28 %	Blackwell, 1963
Japon	7.4	37.2	35.4	0.0	26 %	Shindo, 1990
<b>Amérique</b>						
Esquimaux (Greenland)	6.6	45.9	47.2	0,0	26 %	Galatius-J, 1960
Chili (Indiens Pehuenche)	62.8	34.5	2.7	0.0	78 %	Nagel, 1963
Mexique/Guatemala	33.4	49.6	15.6	0.7	58 %	Sutton, 1960
<b>Arborigènes</b>						
Australie (du Nord)	2.0	31.7	66.3	0.0	18 %	Flory, 1964

(a): Fréquence de l'allèle Hp1



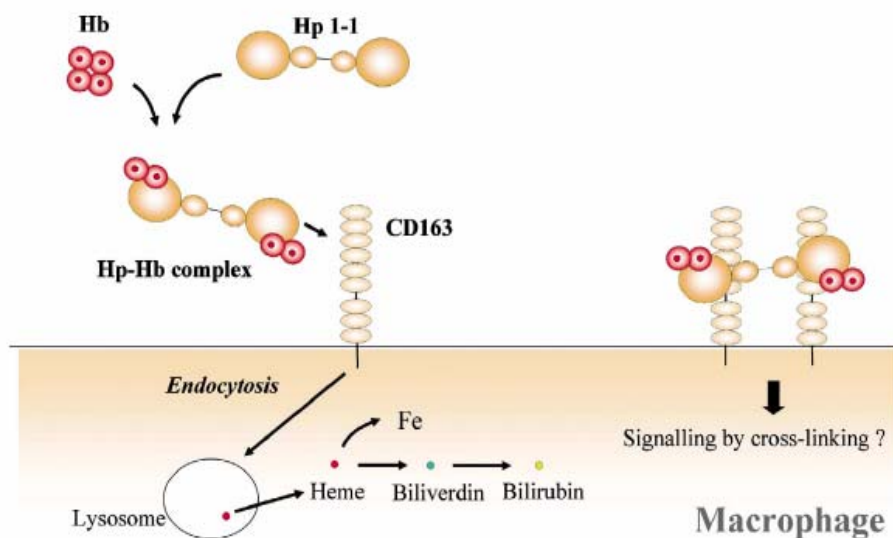
## VI. Propriétés fonctionnelles de l'haptoglobine

### VI. 1. Fixation de l'hémoglobine

La principale fonction de l'Hp est de fixer l'hémoglobine libre pour former un complexe Hp-Hb. La fixation de l'Hp à l'Hb constitue une des plus fortes interactions non covalentes connues en biologie avec une constante de dissociation au moins égale à  $10^{-15}$  mol.L<sup>-1</sup> (Bowman et Kurosky, 1982). L'étude des mécanismes de fixation de l'Hp à l'Hb a montré que la liaison se fait entre la chaîne  $\beta$  de l'Hp et les chaînes  $\beta$  et  $\alpha$  de l'Hb. La chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine humaine contient deux sites spécifiques de fixation de l'Hp situés au niveau des résidus  $\beta$ 11-25 et  $\beta$ 131-146, alors que la chaîne  $\alpha$  en possède un seul situé au niveau des résidus  $\alpha$  121-127 (McComick et Atassi, 1990). La fixation de l'Hb dépend non seulement de la concentration, mais aussi du type d'Hp (Javid, 1965). Tous les phénotypes majeurs de l'Hp fixent l'Hb avec une stoechiométrie de 1:1, c'est-à-dire que chaque dimère  $\alpha\beta$  de l'Hp fixe un dimère  $\alpha\beta$  de l'Hb (Pastewka et coll., 1975 ; Bowman et Kurosky, 1982). Cependant l'effet des phénotypes sur la formation du complexe n'est pas clair (Javid, 1978 ; Lim et coll., 2001). Plusieurs auteurs ont rapporté que la taille de ce complexe retarde sa filtration au niveau du glomérule, ce qui permet de l'éliminer par le système réticulo-endothélial (Sadzadeh et Bozorgmehr, 2004). L'élimination du complexe permet de préserver le rein contre les dommages oxydants pouvant résulter de la présence de l'Hb extracellulaire.

L'haptoglobine circulante est saturée quand la concentration d'Hb plasmatique est de 0.5 à 1.5 g/L (Vlierberghe et coll., 2004). La demi-vie de l'Hp est environ de 3,5 jours, alors que celle du complexe Hp-Hb est approximativement de 10 minutes (Bowman, 1993). La clairance du complexe Hp-Hb de l'organisme est importante. Il existe deux voies d'élimination plasmatique du complexe ; la première est réalisée par l'intermédiaire d'un

récepteur de faible affinité localisé au niveau des hépatocytes (90 % des récepteurs), et la deuxième est effectuée via le récepteur CD163 de forte affinité retrouvé à la surface des monocytes macrophages (10 % des récepteurs) (Kristiansen et coll., 2001 ; Graversen et coll., 2002 ; Zuwała-Jagiello, 2006 ; Guetta et coll., 2006). Dans le compartiment extra-vasculaire, l'élimination du complexe se fait via sa fixation au niveau du récepteur CD163 situé à la surface des monocytes-macrophages (Figure 13) (Kristiansen et coll., 2001 ; Graversen et coll., 2002 ; Guetta et coll., 2006). L'expression de ce récepteur CD163 est augmentée par les glucocorticoïdes, l'interleukine-6 et l'interleukine-10 (Graversen et coll., 2002). Cependant, même si la formation du complexe Hp-Hb inhibe en grande partie le pouvoir oxydant de l'Hb, il n'en demeure pas moins que ce complexe n'est pas dépourvu d'effets néfastes. En effet, il peut catalyser une faible production de radicaux libres, mais surtout inhiber l'activité du monoxyde d'azote (Rother et coll., 2005 ; Guetta et coll., 2006).



**Figure 14 : Représentation schématique illustrant la fixation de l'Hb par l'Hp 1-1 et l'élimination du complexe Hp-Hb par sa fixation sur le récepteur CD163 des monocytes/macrophages (Graversen et coll., 2002).**

## VI. 2. Protection contre les radicaux libres

Les radicaux libres comme le radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  et le radical hydroxyle  $\bullet OH$  sont des espèces très réactives capables de provoquer des dommages cellulaires par le biais de la peroxydation des lipides membranaires (Gutteridge, 1995). L'hémoglobine extracellulaire provoque l'accumulation des radicaux libres à partir du fer de l'hème par la production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (Haber et Weiss, 1934 ; Sadrzadeh et coll., 1984). Plusieurs auteurs ont montré que le fer de l'hème est susceptible d'entraîner l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), ce qui peut provoquer des dommages au niveau vasculaire (Gutteridge, 1995 ; Melamed-Franck et coll., 2001). De même, les radicaux libres générés par les macrophages activés sont impliqués dans les syndromes de détresse respiratoire, de nécrose tissulaire et d'athérosclérose (Balla et coll., 1993 ; Moison et coll., 1993). Ces effets néfastes sont inhibés partiellement par la fixation de l'Hb sur l'Hp. Cette capacité de fixation est dépendante des phénotypes (Tableau V) (Javid, 1965). A titre d'exemple, la destruction des globules rouges dans le liquide interstitiel intracérébral entraîne la formation de radicaux hydroxyles à ce niveau (Lange, 1992). La distribution des protéines avec un haut degré de polymérisation dans le milieu extravasculaire étant limitée par leur taille (Lange, 1992), la capacité anti-oxydante de ces liquides extravasculaires est moins importante chez les individus avec un phénotype Hp 2-2 que celles des individus possédant un autre phénotype (Lange, 1992).

Des études ont montré une précipitation d'Hb au niveau des cellules tubulaires rénales durant de sévères hémolyses intravasculaires ou durant la transfusion de dérivés sanguins contenant de l'Hb extracellulaire. Cette précipitation de Hb au niveau du tissu rénal était accompagnée d'une atteinte de la fonction rénale et une déplétion de la concentration en Hp circulante (Tam et Wong, 1988 ; Glasscock, 1995). L'étude des mécanismes par lesquels l'Hp protégerait le

rein contre les dommages causés par l'Hb libre a montré que l'Hp agissait essentiellement par neutralisation du potentiel oxydant et des propriétés vasoconstrictrices de l'Hb (Lim et coll., 1998 ; Lim et coll., 2000 ; Lim et coll., 2001). En effet, ces auteurs ont montré grâce à l'utilisation de souris "Hp knock-out" une augmentation de l'expression de l'hème oxygénase, et de la 8-OH guanine, marqueur de l'oxydation de l'ADN des cellules rénales chez les souris "Hp knock-out" par rapport aux souris sauvages "wild-type". De plus, le dysfonctionnement était réversible par utilisation de vasodilatateurs (Lim et coll., 2000).

Enfin, l'importance de la formation du complexe Hp-Hb est illustrée par une susceptibilité accrue aux dommages oxydants des tissus dans les conditions d'hypo-ou d'anaptoglobulinémie (Hp 0-0) ou chez les souris déficientes en Hp (Panter et coll., 1985 ; Lim et coll., 1998 ; Lim et coll., 2000 ; Van Vlierberghe et coll., 2004).

**Tableau V : Propriétés fonctionnelles des phénotypes d'haptoglobine**

<b>Propriétés fonctionnelles</b>	<b>Hp 1-1</b>	<b>Hp 2-1</b>	<b>Hp 2-2</b>
Fixation de l'hémoglobine	élevée	intermédiaire	Faible
Activité anti-oxydante	élevée	intermédiaire	Faible
Inhibition de la synthèse des prostaglandines	élevée	intermédiaire	Faible
Effet angiogénique	faible	intermédiaire	élevée
Affinité pour le récepteur CD 22	élevée	élevée	élevée

### **VI. 3. Influence sur le statut en fer**

Le récepteur CD163 a été identifié comme un récepteur situé à la surface des monocytes/macrophages, dont le rôle est de fixer le complexe Hp-Hb (Kristiansen et coll.,

2001); l'Hp ou l'Hb prises isolément ne sont pas capables de se lier à ce récepteur. La fixation du complexe Hp-Hb au récepteur CD163 laisse suggérer l'exposition d'un nouvel épitope de liaison au récepteur (Van Vlieberghe et coll., 2004). Cette fonction du récepteur CD163 est à la base d'un transfert substantiel du fer de l'Hb dans le macrophage. Les complexes de l'Hb avec les phénotypes de haut degré de polymérisation tel que l'Hp 2-2 présentent une affinité élevée pour le récepteur CD163 comparés aux complexes de l'Hb avec le phénotype Hp 1-1 (Kristiansen, et coll., 2001). L'augmentation des concentrations intracellulaires d'hème avec l'endocytose des complexes Hb-Hp 2-2, entraîne une rapide induction de la synthèse de ferritine. Chez la plupart des mammifères, la ferritine cytosolique est composée de deux chaînes notées Chaînes H et L. Les chaînes H possèdent une activité ferroxidasique, qui accélère l'oxydation du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ), avec comme facteur limitant de la réaction l'incorporation du fer à la ferritine dans une réaction qui consomme une molécule d'oxygène pour deux ions  $Fe^{2+}$  avec production de peroxyde d'hydrogène (Van Vlierberghe et coll., 2004). Chez l'homme, le phénotype Hp 2-2 est associée à des concentrations élevées de fer sérique et de ferritine comparées aux phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-1. De même, le coefficient de saturation de la transferrine est plus élevé chez les hommes de phénotype Hp 2-2 que chez les hommes possédant les autres phénotypes chez lesquels les concentrations de transferrine sont plus basses. Par ailleurs, une corrélation a été trouvée entre les concentrations de ferritine sérique et les contenus en ferritine des monocytes qui sont également élevés chez les hommes de phénotype Hp 2-2 (Langlois et coll., 2000). De même, une corrélation positive a été observée entre les concentrations sériques et monocytaires de ferritine, laissant suggérer que l'augmentation de la synthèse de ferritine dans le monocyte-macrophages entraîne une augmentation de ferritine circulante (Langlois et coll., 2000).

#### **VI. 4. Inhibition de l'activité vasoconstrictrice de l'hémoglobine**

Le monoxyde d'azote (NO) est un puissant vasodilatateur qui est produit par de nombreux types cellulaires incluant les cellules endothéliales vasculaires (Maeda et coll., 2003) et les macrophages activés (Nathan, 1992 ; Green, 1995). Des concentrations élevées de NO sont cytotoxiques et sont associées à un système de défense non spécifique contre les microorganismes (Green, 1995). Par contre, des libérations pulsées de faibles quantités de NO sont impliquées dans la régulation de certains mécanismes physiologiques comme le maintien du tonus vasculaire. Le NO a été identifié comme le principal facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF) (Griffith et coll., 1984). L'activité vasoconstrictrice de l'hémoglobine a été largement documentée et a posé un problème majeur dans le développement de solution de substituts sanguins (Alayash, 1999 ; Creteur et coll., 2000). La forte activité vasoconstrictrice de l'Hb a été attribuée à sa fixation rapide au NO (Thompson et coll., 1994). *In vitro*, le NO réagit avec l'oxyhémoglobine extracellulaire quasi-instantanément 250 fois plus rapidement qu'avec l'hémoglobine intracellulaire (Kelm et coll., 1988), ce qui laisse suggérer que l'Hb extracellulaire pourrait fixer le NO plus rapidement que l'Hb intracellulaire (Lim et coll., 2001). Des études ont montré que l'Hp était capable d'inhiber *in vitro* l'activité vasoconstrictrice de l'Hb (Edwards et coll., 1986 ; Nakai et coll., 1996). En effet, il a été montré que l'Hb extracellulaire inhibait la vasodilatation dépendante de l'endothélium par une interaction chimique directe avec le NO (Martin et coll., 1985 ; Collins et coll., 1993). L'Hp en se fixant sur l'hémoglobine, limite l'interaction de cette dernière avec le NO et inhibe ainsi l'activité vasoconstrictrice de l'Hb (Langlois et Delanghe, 1996 ; Lim et coll., 2001 ; Sadzadeh et Bozorgmehr, 2004). Les mécanismes moléculaires par lesquels l'activité vasoconstrictrice de l'Hb est inhibée par l'Hp ne sont pas encore bien élucidés (Lim, 2001). En effet, des études ont montré qu'une possible explication de l'augmentation de la

vasoconstriction observée au niveau rénal chez les souris "Hp knock-out" pourrait être liée à une augmentation de la peroxydation lipidique. En effet, la peroxydation lipidique initiée par l'Hb libre ou par ses métabolites peut entraîner la formation de composés "prostaglandines-like" comme les F<sub>2</sub>-isoprostanes, qui sont de puissants vasoconstricteurs (Cracowski et coll., 2000 ; Lim et coll., 2001).

### **V. 5. Inhibition de la synthèse des prostaglandines**

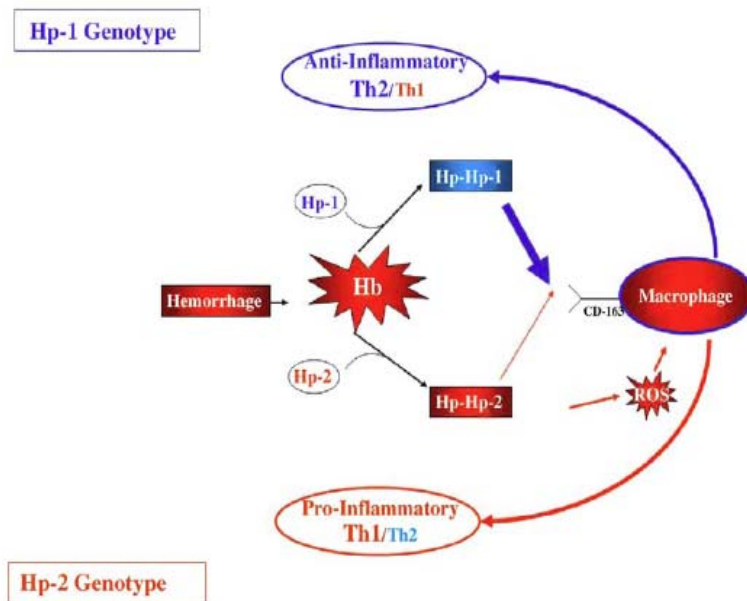
Les prostaglandines sont des substances produites par action d'enzymes comme les lipooxygénases et cyclooxygénases sur des acides gras, notamment l'acide arachidonique (Halliwell et Gutteridge, 2000). Ils jouent un rôle important dans la modulation de l'aggrégation plaquettaire. De plus, certaines prostaglandines, comme les leucotriènes, possèdent un effet pro-inflammatoire (Funk, 1996). L'Hp fait partie de la famille des inhibiteurs endogènes des prostaglandines (Jue et coll., 1983). En effet, la fixation de l'Hb à l'Hp a pour conséquences de prévenir la formation de composés héminiques qui catalysent l'oxydation de l'acide arachidonique par les prostaglandines synthases (Lange, 1992). L'inhibition attribuée à l'Hp sur la synthèse des prostaglandines a d'importantes conséquences biologiques, notamment une action anti-inflammatoire (Jue et coll., 1983). L'effet inhibiteur des phénotypes Hp 2-2 et Hp 2-1 est moins prononcé que celui du phénotype 1-1 (Tableau V) (Lange, 1992).

## **VI. 6. Rôle de l'haptoglobine dans la modulation du système immunitaire**

Les cellules de type Th1 et Th2 sont deux groupes de lymphocytes T qui interviennent dans la régulation des réponses cellulaires. Le déséquilibre de la balance Th1/Th2 a été décrit comme responsable d'une susceptibilité accrue au développement de nombreuses conditions pathologiques comme les infections parasitaires et virales, les allergies et des maladies auto-immunes (Arredouani et coll., 2003 ; Sadrzadeh et Bozorgmehr, 2004). Des auteurs ont montré une protection vasculaire plus importante contre les dommages oxydants de l'Hb chez des individus du phénotype d'Hp 1-1 comparés à ceux de type Hp 2-2 (Guetta et coll, 2006). Un des mécanismes plausible pour expliquer cette différence de protection est attribué à une rupture de l'équilibre Th1/Th2 par la production de cytokines par les macrophages, le Th1 étant pro-inflammatoire et le Th2 anti-inflammatoire (Guetta et coll., 2006). En effet, il a montré que le complexe Hb - Hp 1-1 induisait la sécrétion par les macrophages d'une quantité plus importante de cytokines anti-inflammatoires (comme l'IL-10), que les complexes Hb - Hp 2-2. Cette sécrétion fait intervenir des mécanismes dépendant de la fixation des complexes aux récepteurs CD163. Par ailleurs, la fixation des complexes sur le récepteur CD163 induit une sécrétion plus faible de TNF $\alpha$  chez les individus de type 1-1 comparés à ceux des autres phénotypes.

Aussi, après hémorragie, les phénotypes apparaissent jouer des rôles opposés dans la modulation de la fonction des macrophages. En effet, les complexes Hb - Hp 1-1 générés possèdent un potentiel redox inactif et se fixent au récepteur CD163 pour induire la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. A l'opposé, chez les individus de phénotypes 2-2, les complexes Hb - Hp 2-2 générés possèdent un potentiel redox actif et vont entraîner la production de radicaux libres (Asleh et coll., 2003 ; Asleh et coll., 2005) qui peuvent médier une inflammation et des dommages vasculaires (Guetta et coll., 2006) (Figure 14).





**Figure 15 : Rôle du génotype de l'haptoglobine dans la modulation de la réponse des macrophages dans un contexte d'hémorragie (Graversen et coll., 2002).**

Au niveau de la peau, les cellules de Langerhans font partie du groupe des cellules dendritiques. Elles dérivent des cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse et sont présentes dans tous les épithéliums pavimenteux stratifiés des mammifères. Elles sont en particulier dispersées entre les kératinocytes de la couche à épines de l'épiderme, la E-cadhérine jouant un rôle probablement important dans leur adhérence aux kératinocytes. Les cellules de Langerhans initient et propagent les réponses immunes dirigées contre les antigènes appliqués sur la peau. Elles sont capables d'ingérer des particules étrangères, y compris des micro-organismes. Après avoir capté l'antigène, les cellules de Langerhans activées quittent l'épiderme et gagnent les ganglions lymphatiques satellites où elles présentent les déterminants antigéniques aux lymphocytes T. L'Hp a été décrite comme inhibiteur de l'activité des cellules de Langerhans au niveau de la peau et peut ainsi avoir un

rôle dans la prévention des maladies de la peau dépendant des lymphocytes T (Xie et coll., 2000 ; Sadrzadeh et Bozorgmehr, 2004). De plus, l'Hp inhibe les cathepsines B et L et diminue l'activité des polynucléaires neutrophiles ainsi que la production d'anticorps en réponse à une réaction inflammatoire (Kalsheker et coll, 1981 ; Oh et coll., 1990). L'Hp se lie à différentes cellules du système immunitaire par le biais de récepteurs spécifiques exprimés à leur surface. C'est ainsi qu'elle se lie aux granulocytes, aux monocytes, aux cellules "naturel killer" et aux lymphocytes T CD8+ par l'intermédiaire du récepteur CD11/CD18 (MAC 1). Elle peut ainsi moduler les réponses dépendantes de ces cellules (El Ghmati et coll., 1996). L'Hp se fixe également sur les lymphocytes B par l'intermédiaire des récepteurs de surface CD22 et peut donc être impliquée dans les réponses immunitaires et inflammatoires de ces cellules (Hanasaki et coll., 1995). Des auteurs ont rapporté la présence d'une population de lymphocytes B et de lymphocytes T CD4+ au niveau du sang périphérique beaucoup plus importante chez les individus de phénotype Hp 2-2 par rapport à ceux de type Hp 1-1. De même les individus de phénotype Hp 2-2 ont plus de cellules CD4+ au niveau de la moelle osseuse que ceux de type Hp 1-1 (Langlois et coll., 1997).

## **VI. 7. Haptoglobine et angiogenèse**

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Elle survient dans diverses conditions physiologiques ou pathologiques comme la croissance tumorale, les maladies inflammatoires chroniques et les néoplasmes (Koerselman et coll., 2003 ; Sadrzadeh et Bozorgmehr, 2004). De nombreuses substances sont capables de favoriser la néo-vascularisation, parmi lesquelles deux facteurs sont particulièrement bien connus : le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et

le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) (Lazarous, 1996 ; Lohr, 2005). Par ailleurs, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, encore appelé VPF (pour facteur de perméabilité vasculaire) possède une activité mitogène spécifique pour les cellules endothéliales *in vitro* et un fort pouvoir angiogénique *in vivo* (Schultz, 1999, Koerselman, 2003).

L'Hp a été décrite comme un facteur angiogénique du sérum nécessaire à la prolifération et à la différenciation des cellules endothéliales pour la formation de nouveaux vaisseaux (Cid et coll., 1993; Arredouani et coll., 2003). L'augmentation des concentrations sériques d'Hp lors de maladies inflammatoires chroniques ou ischémiques joue un rôle important dans la réparation des tissus et la formation de vaisseaux collatéraux (Cid et coll., 1993). L'Hp a été décrite comme un facteur de migration cellulaire impliqué dans les processus de remodelage tissulaire (De Kleijn 2002) et son expression est suffisamment augmentée durant les phénomènes de croissance vasculaire collatérale pour exercer des effets biologiques sur la migration cellulaire, ce qui suggère que l'Hp joue un rôle important dans ces processus. Toutefois l'action de l'Hp sur la migration cellulaire reste secondaire à celle d'autres facteurs comme le VEGF ou l'angiopoïétine-1 (Weihrauch, 1998 ; Matsunaga, 2003 ; Lohr, 2005). Ainsi, la stimulation de la prolifération des cellules endothéliales par l'haptoglobine semble devenir prédominante dans les circonstances où les taux de VEGF sont faibles (Lohr, 2005). Des études ont montré que tous les phénotypes majeurs de l'Hp possèdent des effets angiogéniques *in vivo*, le phénotype Hp 2-2 ayant été trouvé plus angiogénique que les deux autres phénotypes (Cid, 1993 ; Nakhoul, 2000). Enfin, des études cliniques ont montré l'impact du phénotype d'Hp sur la croissance vasculaire dans la maladie diabétique. La rétinopathie diabétique qui s'accompagne d'une stimulation de l'angiogenèse au niveau de la rétine, a été trouvée plus fréquente chez les patients de phénotype Hp 2-2. Par ailleurs, il a été

montré que le phénotype Hp 2-2 est celui qui stimule le plus la migration cellulaire au cours de l'angiogenèse oculaire (Cid et coll., 1993 ; Nakhoul, 2000 ; Hochberg , 2002).

#### **VI. 8. Activité antibactérienne de l'Hp**

Le fer constitue un élément essentiel à la croissance bactérienne. La combinaison d'un processus hémorragique à une infection bactérienne peut conduire à des situations dramatiques. En effet, la présence de sang au niveau des tissus lésés peut fournir le fer aux microorganismes et ainsi favoriser leur prolifération (Eaton et coll., 1982). L'Hp, en fixant l'Hb diminue la disponibilité du fer nécessaire à la croissance de bactéries comme *Escherichia coli* (Barclay, 1985). A titre d'exemple, des auteurs ont montré que l'Hp est capable d'inhiber la léthalité des rats après une injection intrapéritonéale d'une suspension d'*Escherichia coli* et d'Hb (Eaton et coll., 1982). De même, l'Hp synthétisée au niveau des poumons, joue un rôle antimicrobien important au niveau du mucus et des liquides alvéolaires contre les infections (Yang et coll., 1995).

#### **VII. Aspects cliniques de laboratoire**

L'haptoglobine est présente dans divers liquides de l'organisme incluant le sérum, le liquide amniotique et des liquides d'ascite (Dobryszczyka, 1997). Par conséquent, elle peut être dosée dans différents milieux biologiques.

## VII. 1. Détermination des concentrations d'haptoglobine

Les premières méthodes de dosage de l'haptoglobine étaient basées sur le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb à pH acide (Jayle, 1951 ; Standing et Price, 1976 ; Kickler et coll., 1976). D'autres méthodes utilisant les propriétés spectrales de l'Hb liée à l'Hp, ou la séparation du complexe Hp-Hb et de l'Hb libre ont été également utilisées (Shim et Jue, 1984). Les résultats de ces méthodes ont été formulés en terme de capacité de fixation de l'Hb, exprimée en gramme ou mole d'Hb par litre de plasma ou de sérum. L'immunodiffusion radiale a été aussi utilisée, mais les résultats sont dépendants du phénotype du fait des degrés de polymérisation variables, donc des masses moléculaires et des vitesses de diffusion différentes. Certains auteurs ont préconisé l'utilisation d'un facteur de correction, pour obtenir les concentrations "réelles" en Hp (Braun et Aly, 1969 ; Van Rijn et coll., 1987). Actuellement, des méthodes immuno-néphélométriques et immuno-turbidimétriques permettent doser l'Hp. Elles offrent l'avantage d'être accessibles sur des analyseurs multiparamétriques de biochimie (Van Lente et coll., 1979 ; Van Rijn et coll., 1987). Cependant, certains auteurs ont décrit les méthodes immuno-turbidimétriques comme étant dépendantes des phénotypes (Van Rijn et coll., 1987). Des « kits » ELISA ont été également développés pour le dosage de l'Hp (Katnik et Dobryszczycka, 1992).

Depuis 1994, les concentrations en Hp déterminées en biologie clinique doivent être traçables à un matériau de référence (CRM 470), selon les recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) (Whicher et coll., 1994 ; Delanghe et coll., 1996).

## VII. 2. Détermination des phénotypes d'haptoglobine

La détermination des phénotypes d'Hp et de ses sous-types a été couramment réalisée en médecine légale pour effectuer des tests de paternité et d'identification des individus. Le résultat d'exclusion théorique de paternité du système est d'environ 0.184 (Bias et coll., 1986). Les résultats obtenus avec ce système sont en général comparés avec ceux d'exclusion de paternité obtenus avec différents systèmes de groupes sanguins (ABO, Rh, MNS,...). La détermination du phénotype et de ses sous-types est utilisée en supplément des antigènes érythrocytaires et des antigènes leucocytaires en cas de paternité contestée (Bias et coll., 1986). Plus récemment, le polymorphisme de l'Hp été décrit comme un facteur déterminant de l'évolution de plusieurs maladies ou de pronostic en matière de transplantation de foie (Delanghe et coll., 1998a).

De nombreuses méthodes ont été décrites pour le phénotypage de l'Hp (Langlois et Delanghe, 1996), dont la plus couramment utilisée est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de plasmas supplémentés en Hb, suivie d'une révélation du pouvoir peroxydasique des complexes Hp-Hb (Smithies, 1955). Un phénotypage réalisé sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a été également décrit (Shindo, 1990). Plusieurs méthodes de phénotypage basées sur des techniques d'isoélectrofocalisation en gel de polyacrylamide contenant de l'urée ou du 2-mercaptoéthanol, suivies par un immuno-transfert ont été décrites (Alonso et coll., 1990).

### **VII. 3. Haptoglobine comme marqueur**

Les principales causes de variations pathologiques des concentrations sériques d'haptoglobine sont l'inflammation et l'hémolyse. L'inflammation s'accompagne d'une augmentation des concentrations circulantes, alors que l'hémolyse est responsable d'une diminution. L'haptoglobine est utilisée comme marqueur des processus inflammatoires depuis plusieurs dizaines d'années (Jayle, 1951). Sa concentration plasmatique augmente en réponse à divers stimuli incluant la grossesse, l'infection, les traumatismes, l'infarctus du myocarde et d'autres réactions inflammatoires (Thomas, 1992 ; Tietz, 1995). L'amplitude d'augmentation de la concentration d'haptoglobine lors d'un syndrome inflammatoire peut varier d'un facteur allant de 2 à 4 (Laurent, 1984). Une hyperhaptoglobinémie a été également retrouvée dans des maladies psychiatriques inflammatoires, notamment dans la dépression majeure (Maes et coll., 1992). Une corrélation positive a été trouvée entre les concentrations en Hp sérique et l'activation du système de défense (augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles, de monocytes, et de lymphocytes T activés) dans la dépression majeure en relation avec une hypersécrétion d'IL-6 (Maes et coll., 1993).

Les concentrations en Hp du sérum diminuent en cas d'hémolyse intravasculaire, notamment dans toutes les situations où les concentrations en Hb extracellulaire sont élevées (paludisme, hémoglobinopathies, valves cardiaques, endocardites) (Thomas, 1992 ; Tietz, 1995). L'amplitude de la baisse dépend largement de la concentration initiale d'Hp (Delanghe et coll., 1996). Parmi les autres causes de variations, il est à noter que les concentrations sériques d'Hp diminuent en cas de malnutrition ou d'insuffisance hépatocellulaire (Thomas, 1992 ; Tietz, 1995), d'érythropoïèse inefficace et chez les nouveaux nés (Piessens et coll., 1984). Un syndrome néphrotique peut être associé à des concentrations d'Hp élevées ou

basses en fonction du phénotype du patient et de la survenue d'une inflammation (Tietz, 1995). En effet, le phénotype Hp 1-1, du fait de sa petite taille est éliminé dans l'urine des patients atteints de syndrome néphrotique, alors que les phénotypes Hp 2-1 et Hp 2-2 peuvent être retenus (Tietz, 1995).

Le dosage de l'Hp est également réalisé en biologie médicale dans le cadre de la détermination du score du Fibrotest® pour le diagnostic non invasif de fibrose hépatique, conséquence de nombreuses maladies chroniques du foie (Boulière, 2005). Le diagnostic de fibrose repose classiquement sur l'examen anatomo-pathologique d'un fragment de foie recueilli par une ponction-biopsie hépatique. Cependant, cet examen est invasif. Ainsi, depuis plus de 10 ans, de nombreuses équipes ont étudié la valeur diagnostique de marqueurs biologiques directs ou indirects de la fibrose (Boulière, 2005). En effet, plusieurs scores, calculés à partir d'algorithmes, associant différents paramètres directs ou indirects liés à la fibrose ont été proposés pour augmenter l'efficacité d'un diagnostic non invasif d'une fibrose significative (Boulière, 2005). Le Fibrotest® est sans doute le score qui a été le plus étudié. Il est calculé à partir du dosage de 5 paramètres (haptoglobine, apolipoprotéine A1, bilirubine, GGT, alpha 2-macroglobuline), avec ajustement selon l'âge et le sexe. Il a été testé et validé sur population de patients atteints d'hépatite chronique C (Poynard et coll., 2000 ; Imbert-Bismut et coll., 2001). Par la suite, un autre test appelé Actitest®, qui inclut un sixième paramètre, l'alanine aminotransferase (ALT), et reflétant l'activité nécrotico-inflammatoire, a été développé (Boulière, 2005).

La variabilité interlaboratoire du Fibrotest® et de l'Actitest® est réduite par la standardisation des méthodes, en particulier par l'utilisation de matériaux de référence (Halfon et coll., 2002 ; Imbert-Bismut et coll., 2004). Ceci est particulièrement important pour le dosage des



protéines par immunonéphélométrie ou immunoturbidimétrie et pour la mesure des activités enzymatiques (Ferard et coll., 1995 ; Lessinger et coll., 2002 ; Ferard et coll., 2004).

## **VIII. Conséquences cliniques du polymorphisme de l'haptoglobine**

L'étude de l'effet du polymorphisme de l'Hp sur la progression de diverses maladies a fait l'objet de nombreux travaux dans le domaine des maladies cardiovasculaires, du diabète, des maladies infectieuses, et de désordres hématologiques et neurologiques, entre autres.

### **VIII. 1. Maladies cardiovasculaires et polymorphisme de l'haptoglobine**

L'impact du polymorphisme de l'Hp sur la progression des maladies cardiovasculaires a été rapporté par plusieurs auteurs (Gogishvili et coll., 1985 ; Guetta et coll., 2006). Le phénotype Hp 2-2 a été trouvé comme étant un facteur de risque indépendant, prédictif de l'infarctus du myocarde (Gogishvili et coll., 1985). De même, Chapelle et coll. ont montré qu'à la suite d'un infarctus du myocarde, la sévérité et l'étendue des lésions sont beaucoup plus importantes chez les individus de type Hp 2-2 que ceux de type Hp 1-1 et Hp 2-1 (Chapelle et coll., 1982). D'autres auteurs ont montré que l'espérance de vie des individus de phénotype Hp 2-2 après un infarctus du myocarde était réduite par comparaison avec les autres phénotypes (Delanghe et coll., 1997). L'association du phénotype Hp 2-2 avec la présence de nombreuses plaques d'athérome chez les patients atteints de maladies ischémiques du cœur laisse suggérer que ce phénotype protège moins contre le stress oxydant au niveau des vaisseaux (Sadzadeh et Bozorgmehr, 2004).

Le phénotype Hp 2-2 a été également décrit comme un facteur de risque d'hypertension réfractaire chez des personnes souffrant d'hypertension artérielle (Delanghe et coll., 1995). De plus, les patients de type Hp 2-2 souffrant d'hypertension artérielle nécessitent plus de combinaisons de médicaments anti-hypertenseurs pour le contrôle de la pression artérielle que ceux des autres phénotypes. Ils nécessitent par ailleurs un suivi plus étroit pour prévenir l'apparition de complications (Delanghe et coll., 1993).

### **VIII. 2. Diabète et polymorphisme de l'haptoglobine**

Le stress oxydant peut jouer un rôle important dans l'évolution de la maladie diabétique et peut contribuer à la survenue des complications chroniques (Melamed-Frank et coll., 2001 ; Asleh et coll., 2003 ; Asleh et coll., 2005). Le phénotype Hp 1-1, du fait de son potentiel anti-oxydant plus important, protège mieux contre les complications vasculaires au cours du diabète que les autres phénotypes (Levy et coll., 2000 ; Nakhoul et coll., 2000 ; Asleh et coll., 2005). Le phénotype d'Hp a été décrit comme un facteur de risque indépendant pour la survenue de maladies des artères coronaires dans le diabète (Sadzadeh et Bozorgmehr, 2004). Des auteurs ont montré que les personnes diabétiques de phénotype Hp 2-2 sont cinq fois plus exposées à développer des maladies des artères coronaires que ceux des phénotypes Hp 1-1 (Levy et coll., 2002 ; Levy, 2006). Enfin, le phénotype Hp 2-2 a été trouvé associé à un risque d'apparition plus important de néphropathie diabétique, quel que soit le type de diabète glucosé (Nakhoul et coll., 2001).

### **VIII. 3. Maladies infectieuses et polymorphisme de l'haptoglobine**

La sensibilité des patients aux maladies infectieuses varie également en fonction de leur phénotype d'Hp. Ainsi, il a été démontré que les patients de phénotype Hp 2-2 atteints de tuberculose présentent un risque de mortalité augmenté et une susceptibilité accrue à développer une tuberculose rénale sévère par rapport aux patients des autres phénotypes. Une forte prévalence du phénotype Hp 2-2 est retrouvée chez les patients atteints de tuberculose avancée (Fedoseeva et coll., 1993 ; Kasvosve et coll., 2000a).

Chez les patients atteints par le virus HIV, le phénotype Hp 2-2, est associé à un mauvais pronostic et à un haut taux de mortalité, comparé aux patients des autres phénotypes (Delanghe et coll., 1996 ; Delanghe et coll., 1998c). Par contre, dans l'infection due au virus de l'hépatite C, le phénotype Hp 1-1 est retrouvé de façon prépondérante par rapport aux autres phénotypes (Sadrzadeh et Bozorgmehr, 2004).

Le polymorphisme de l'Hp affecte la réponse immunitaire à la suite des vaccinations (Louagie et coll., 1993). A titre d'exemple, les individus de type Hp 2-2 produisent des taux plus faibles d'anticorps suite à la vaccination contre le virus de l'hépatite B par rapport aux individus des autres phénotypes (Louagie et coll., 1993). Par contre, le phénotype Hp 2-2 a été trouvé associé à une forte réponse immune suite à une vaccination contre le tétanos ou contre la fièvre typhoïde (Delanghe et coll, 1996).

#### **VIII. 4. Polymorphisme de l'haptoglobine et autres pathologies**

En dehors de toutes les pathologies énoncées ci dessus, l'influence du polymorphisme de l'Hp sur l'évolution de nombreuses pathologies incluant des maladies neurologiques (épilepsie) (Panter et coll., 2003), des cancers du poumon ou de l'ovaire (Delanghe et coll., 1996) a été étudié. Les individus de phénotype Hp 2-2 présentent une susceptibilité accrue à une évolution défavorable par rapport aux autres phénotypes dans ces différentes pathologies. Les conséquences cliniques liées au polymorphisme de l'Hp sur l'évolution de diverses pathologies sont répertoriées dans le Tableau VI.

**Tableau VI : Conséquences cliniques liées au polymorphisme de l'Hp**

Pathologies	Conséquences cliniques	RR	Références
Vaccinations	Hp 2-2 : forte réponse immune à la vaccination contre la fièvre typhoïde et le tétanos. Hp 2-2 : faible production d'anticorps après vaccination contre le virus de l'hépatite B.		Nevo et Sutton, 1979 Louagie et coll., 1993
Tuberculose	Hp 2-2 : forte prévalence chez les patients de stade d'évolution avancée et présentant une forte dissémination.	1.23	Hever, 1969
Hépatite C	Hp 1-1 : associé à une augmentation du risque d'évolution vers la chronicité.	1.55	Louagie et coll., 1996
HIV	Hp 2-2 : associé à une mortalité élevée au bout de 5 ans (40 % contre 20 % pour les phénotypes 1-1 et 2-1).		Delanghe et coll., 1996
Allergies	Hp 1-1 : forte prévalence dans les dermatites allergiques de contact ou de rhinites allergiques.	1.48	Lange, 1992
Maladies auto-immunes	Hp 2-2 : forte prévalence dans l'arthrite rhumatoïde d'origine familiale. Hp 2-2 : forte prévalence dans le lupus érythémateux systémique.	1.37 1.43	Rantapää Dahlqvist et coll., 1985
Cancer	Hp 1-1 : forte prévalence chez les patients dans le cancer du sein et du col de l'utérus.	1.72	Tsamantanis, 1980
Maladies cardiovasculaires	Hp 1-1 : forte prévalence dans l'hypertension essentielle. Hp 2-2 : association à un risque élevé de survenue de l'hypertension réfractaire.	1.96	John et coll., 1985
Maladies psychiatriques	Hp 1-1 : forte prévalence dans la dépression majeure. Hp 2-2 : forte prévalence dans les épilepsies familiales, les psychoses affectives et les abus d'alcool et de drogue		Maes et coll., 1994 Lange, 1992
Maladies hématologiques	Hp 1-1 : forte prévalence dans la leucémie myéloïde chronique aiguë. Hp 2-2 : forte prévalence dans le myélome à IgA.	1.58	Ostrowski, 1987

RR: risque relatif = nombre du type d'Hp observé chez les patients à risque/nombre du type d'Hp dans la population générale.

## **IX. Conclusion**

L'hémoglobine libérée lors d'épisodes hémolytiques constitue un important médiateur de maladies touchant le système cardiovasculaire. Sa toxicité et sa nature inflammatoire sont dues en particulier à sa capacité à consommer le monoxyde d'azote et à servir de substrat à la réaction de Fenton, qui va entraîner la production d'ions superoxydes et hydroxyles. La première ligne de défense contre ces effets délétères de l'Hb est constituée par l'haptoglobine. Cette dernière fixe l'Hb de façon "irréversible", inhibe une part importante de son pouvoir oxydant et permet de recycler le fer. Le complexe formé est éliminé essentiellement grâce à la fixation à un récepteur CD163 situé au niveau des monocytes-macrophages.

L'haptoglobine présente un polymorphisme génétique avec trois phénotypes majeurs notés Hp 1-1, Hp 2-1 et Hp 2-2. Ces derniers présentent des différences sur le plan structural en rapport avec d'importantes différences fonctionnelles, notamment concernant la fixation de l'Hb, la protection contre les radicaux libres et tous les effets délétères en rapport avec la présence d'Hb extracellulaire. Le polymorphisme de l'Hp est associé à des variations de la prévalence et de l'évolution de nombreuses pathologies, incluant les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies auto-immunes. Les activités biologiques, notamment la modulation du stress oxydant et de la réponse immunitaire et l'inhibition de la synthèse des prostaglandines, se sont révélées être dépendantes du phénotype d'Hp. La connaissance du phénotype peut constituer un élément prédictif dans l'évolution de certaines pathologies.

## **Troisième partie : Phénotypage et purification de l'haptoglobine**

## **I. Introduction**

L'haptoglobine (Hp) est une glycoprotéine dont la principale fonction est de fixer l'hémoglobine (Hb) libérée au cours de l'hémolyse intra-vasculaire, pour former un complexe stable rapidement capté par le foie (Polonovski et Jayle, 1938).

L'existence du polymorphisme de l'Hp a été suspectée pour la première fois par Jayle et Judas en 1946 (Jayle et Judas, 1946), et Smithies identifia en 1955 les 3 phénotypes majeurs de l'Hp par électrophorèse en gel d'amidon de sérums supplémentés en hémoglobine, suivie d'une détection de l'activité peroxydasique des complexes Hp-Hb (Smithies, 1955). Des méthodes de chromatographie liquide haute performance (exclusion-diffusion), d'électrophorèse sur gel d'amidon, d'agarose ou de polyacrylamide ont été développées. Elles ont été basées sur les différences de mobilité électrophorétique ou des différences de masses des différents phénotypes Hp 1-1, 2-1 et 2-2 (Ferris et coll., 1963, Pastewka et coll., 1973 ; Langlois et Delanghe, 1996 ; Delanghe et coll., 2000). Une méthode d'électrophorèse capillaire de zone (Wuyts et coll., 2000), et même une technique ELISA (Levy et Levy, 2004) ont été développées pour le phénotypage de l'Hp. Depuis une quinzaine d'années, le génotypage de l'Hp est devenu possible (Yokoi et Sagisaka, 1990), et plus récemment une approche basée sur la PCR a été décrite avec une parfaite correspondance avec les résultats des méthodes basées sur le typage des protéines (Koch et coll., 2002).

De toutes les méthodes citées, l'électrophorèse native en gel de polyacrylamide des complexes Hp-Hb est actuellement la plus fréquemment utilisée. Elle donne une haute



résolution dans la séparation des bandes polymériques (Hansson et coll., 1998) et permet un phénotypage simple, rapide et précis de l'Hp.

L'étude *in vitro* des propriétés de chaque phénotype est rendue difficile par les problèmes liés à la disponibilité de la protéine purifiée pour chaque phénotype. En effet, les préparations commerciales d'haptoglobine sont hétérogènes et consistent en un mélange des trois phénotypes isolé à partir d'un pool de plasmas (Liau et coll., 2003). De plus, l'activité biologique de ces préparations n'est pas toujours conservée (Liau et coll., 2003). Les difficultés de purification liées à l'hétérogénéité sur le plan moléculaire des phénotypes de l'Hp a constitué un frein à l'étude de leurs propriétés physicochimiques et biologiques. Classiquement, la plupart des méthodes de purification de l'Hp utilisées impliquaient une association d'une électrophorèse préalable à de multiples étapes de chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Bowman et coll., 1988 ; Tosa et coll., 1993 ; O'Bryan et coll., 1997), ou une chromatographie d'affinité utilisant des anticorps monoclonaux (Katnik et Jadach, 1993). Ces méthodes exploitaient initialement les propriétés physiques des protéines comme leur charge (chromatographie par échange d'ions) (Bowman et coll., 1988) et leur taille (gel filtration) (Connell et Smithies, 1959 ; Steinbuch et Loeb, 1961 ; Smith et coll., 1962). De telles méthodes de purification nécessitaient l'adaptation des procédures pour chaque phénotype considéré à cause des différences structurales (Gordon et coll., 1968 ; Hamaguchi, 1969). Par la suite, de nouvelles méthodes de purification basées sur l'unique spécificité biologique de l'Hp utilisant l'Hb en chromatographie d'affinité ont été développées (Javid et Liang, 1973 ; Delers et coll., 1981 ; Rademacher et Steele, 1987 ; Wassdal et coll., 1991). L'inconvénient de ces dernières méthodes réside dans le fait qu'elles nécessitaient des concentrations élevées de guanidine ou d'urée susceptibles de dénaturer l'Hp et/ou d'éluer l'Hb (Rademacher et Steele, 1987 ; Wassdal et coll., 1991). Plus récemment, une nouvelle méthode de purification des phénotypes d'haptoglobine en chromatographie

d'affinité utilisant de l'hémoglobine humaine greffée sur une matrice Sépharose-4B a été décrite (Liau et coll., 2003). Cette dernière méthode nécessite une étape supplémentaire pour les phénotypes Hp 2-1 et Hp 2-2, consistant en l'utilisation d'une colonne de Superose 12 pour éliminer l'apoprotéine A-1. Une équipe taïwanaise vient de décrire une méthode de chromatographie d'affinité, utilisant des anticorps dirigés contre les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'Hp, associée à une exclusion-diffusion utilisant une colonne de Superose 12 (Tseng et coll., 2004a ; Yueh, et coll., 2006).

Un des objectifs de ce travail de thèse a consisté à comparer les effets liés au polymorphisme de l'haptoglobine humaine *in vitro*. Pour cela, il nous a fallu, disposer de la protéine purifiée sous ses 3 phénotypes majeurs, en quantité suffisante. Ainsi, nous avons commencé par typer différents plasmas par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5 %, pour ensuite purifier chacun des phénotypes par chromatographie (FPLC).

## **II. Matériels et Méthodes**

### **II. 1. Spécimens**

Les prélèvements sanguins (2,7 mL) ont été réalisés sur héparinate de lithium chez 312 patients (139 hommes et 173 femmes, dont les âges étaient compris entre 22 à 86 ans (moyenne  $\pm$  un écart type :  $57 \pm 15$  ans). Les prélèvements ont été immédiatement centrifugés après recueils et les plasmas ont été séparés des culots de globules rouges. Ils ont été ensuite immédiatement traités ou conservés à  $-20$  °C jusqu'à utilisation.

## **II. 2. Phénotypage de l'haptoglobine**

Le phénotypage de l'haptoglobine a été réalisé selon la méthode de Raymond (Raymond, 1962) par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 5 %. Pour la préparation de 30 mL de gel, 5 % d'acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad laboratories, CA, USA) ont été polymérisés avec 0.1 mL de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) et 20 mg de persulfate d'ammonium.

### ***II. 2. 1. Tampons***

Deux systèmes tampons différents ont été utilisés. Les électrophorèses en milieu alcalin ont été réalisées en tampon contenant 0,1 mol/L de Tris et 0,09 mol/L d'acide borique, pH 8,6. Celles à pH neutre ont été réalisées en tampon phosphate 30 mmol/L, pH 7,0.

### ***II. 2. 2. Plaques de gel de polyacrylamide***

Pour couler le gel, des plaques de verre (Glass plates, Bio-Rad laboratories, CA, USA) ont été utilisées sur le système Mini-Protean-II (Bio-Rad laboratories, CA, USA), ce qui permettait d'effectuer simultanément une électrophorèse sur deux gels, soit 16 échantillons en même temps.

### ***II. 2. 3. Préparation des plasmas***

A 75  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon de plasma, ont été ajoutés 75  $\mu\text{L}$  d'une solution d'hémoglobine humaine (1,6  $\mu\text{mol/L}$ ) et 100  $\mu\text{L}$  de saccharose (10 g/L). L'ensemble a été incubé pendant 10 min à température ambiante, puis 10  $\mu\text{L}$  de solution de bleu de bromophénol (0,001 %) ont été ajoutés juste avant la migration.

### ***II. 2. 4. Migration***

Les plaques de gels ont été placées dans le dispositif de migration (Miniprotean II, Bio-Rad laboratories, CA, USA) rempli de tampon dans les conditions permettant une migration correcte. Le mélange plasma-solution d'hémoglobine a été introduit dans les puits situés au niveau de la partie supérieure du gel avant d'appliquer un courant de 200 V pendant 2 heures.

### ***II. 2. 5. Révélation***

Après migration, les gels ont été enlevés avec précaution des plaques de verre et placés dans la solution de révélation des complexes Hp-Hb, contenant 0,2 g de diméthylbenzidine dans 100 mL d'une solution d'acide acétique 0,9 mol/L. Après 2 h d'incubation à l'abri de la lumière, 5 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % (w/v) fraîchement préparée ont été ajoutés à la solution de révélation. Les bandes caractéristiques du complexe Hp-Hb et l'hémoglobine résiduelle sont apparues colorées en vert-brun.

## **II. 3. Purification de l'haptoglobine humaine**

### **II. 3. 1. Source utilisée pour la purification de l'haptoglobine humaine**

Pour chaque séquence de purification, 10 à 15 mL de plasma hépariné provenant d'un prélèvement sanguin réalisé chez un patient préalablement phénotypé ont été utilisés.

Le plasma hépariné a été préféré au sérum du fait que l'haptoglobine préparée à partir du sérum se dénaturait plus rapidement au cours des différentes étapes de purification, alors qu'elle était beaucoup plus stable quand la source était constituée par du plasma. De même, certains auteurs ont rapporté que l'haptoglobine était sensible à la plasmine du sérum (Herman-Boussier et coll., 1960).

### ***II. 3. 2. Choix de la matrice***

Des essais préliminaires nous ont amenés à opter pour l'utilisation du tampon Tris-HCl, 50 mmol/L, pH 7,5, du fait que cette matrice garantissait une bonne stabilité de l'haptoglobine et permettait de préserver son activité biologique (Liau et coll., 2003).

### ***II. 3. 3. Quantification de l'Hp au cours de la purification***

Les dosages de l'haptoglobine, après chaque étape de purification, ont été effectués par la méthode de Standing et Price modifiée (Standing et Price, 1976). Cette technique a été choisie en raison du grand nombre de mesures à effectuer et de sa bonne reproductibilité. Elle a

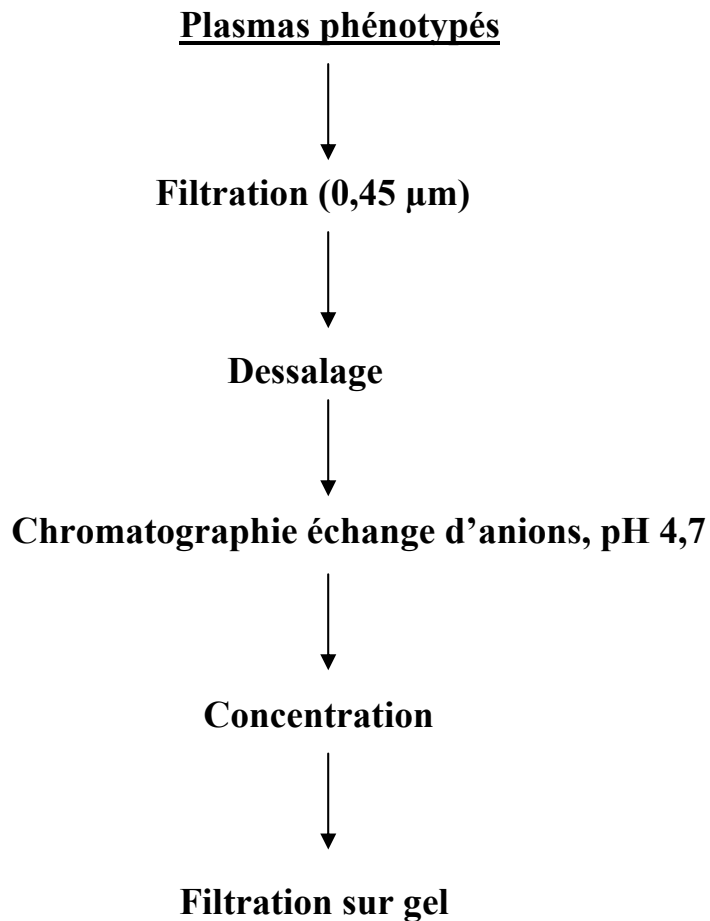
consisté à mesurer le pouvoir peroxydasique par une méthode cinétique dans les conditions suivantes : 50  $\mu$ L d'échantillon ont été additionnés à 0,5 mL d'une solution d'hémoglobine humaine à 0,1 g/L. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 100  $\mu$ L du mélange ont été transférés dans une cuvette de spectrophotomètre thermostatée à 37 °C, contenant 1 mL d'une solution de guaiacol (0,3 mol/L) dans un tampon acétate (0,175 mol/L, pH 4,0). Après 10 min d'incubation, la réaction a été initiée par addition de 100  $\mu$ L d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,12 % (w/v) fraîchement préparée, et la variation d'absorbance a été suivie à 500 nm pendant 5 minutes avec un spectrophotomètre Uvikon 922 (Kontron Inst, Montigny le Bretonneux, France).

#### ***II. 3. 4. Protocole de purification***

Les plasmas phénotypés ont été d'abord filtrés sur une membrane millipore de 0,45  $\mu$ m, puis dessalés. L'étape de dessalage a été réalisée par FPLC à l'aide d'une colonne HR 10/10 pré-remplie avec du Sephadex G-25 superfine (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) à un débit de 20 mL/heure. Le dessalage, a été réalisé en présence du tampon utilisé pour l'étape suivante de la purification c'est-à-dire le tampon acétate 0,03 mol/L, pH 4,7.

Les fractions possédant une activité peroxydasique après dessalage, ont été rassemblées et concentrées sous un volume de 2 mL par ultrafiltration à travers des membranes ayant un « cutoff » de 10 kDa (Amicon, Diaflo, Dublin, Ireland). Une chromatographie par échange d'anions a été ensuite réalisée à la température ambiante à l'aide d'une colonne Q-Sepharose fast flow (Pharmacia Bio-Tech, Uppsala, Suède) équilibrée avec du tampon acétate 0,03 mol/L, pH 4,7 à un débit de 60 mL/h. Dans ces conditions, l'Hp a été retenue sur la colonne et

son élution a été réalisée par un gradient linéaire de NaCl (0 – 1 mol/L) dans le même tampon. L'absorbance de l'éluat a été suivie à 280 nm et des fractions de 3 mL ont été recueillies. Les fractions les plus actives ont été identifiées grâce à leur pouvoir peroxydasique. Elles ont été concentrées par ultrafiltration sous un volume de 2 mL, avant d'être déposées sur une colonne d'exclusion-diffusion HR 16/50 Superose 12 prep grade (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5. L'élution a été réalisée à un débit de 0,2 mL/min par le même tampon (Figure 16).



**Figure 16 : Séquence de purification de l’haptoglobine à partir de plasmas humains**

### ***II. 3. 5. Détermination des masses moléculaires relatives des phénotypes d’haptoglobine***

#### ***\* Principe de la technique***

La chromatographie d'exclusion - diffusion est fondée sur la rétention sélective des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration plus ou moins importante dans les pores du gel. Cette technique permet la séparation de molécules de masses moléculaires élevées comme les protéines. Les plus petites molécules pénètrent par les pores de la matrice et vont ainsi se déplacer à travers la colonne lentement, apparaissant en sortie de colonne



parmi les derniers composés. En revanche, les protéines les plus grosses ne pénètrent pas dans le gel et sont éluées en premier. Les protéines de tailles intermédiaires vont plus ou moins pénétrer à l'intérieur des pores du gel et leur volume d'éluion des molécules sera inversement fonction de leur taille.

On appelle volume d'éluion ( $V_e$ ), le volume de phase mobile qui s'écoule entre le point d'injection et le maximum du pic du soluté. Ce volume est utilisé pour caractériser le comportement de la molécule dans le gel de filtration. Dans le cas des très grosses molécules non retenues par le gel, le volume d'éluion correspond au volume mort ou volume d'exclusion ( $V_0$ ). Chaque molécule est caractérisée par le rapport  $V_e/V_0$ . Le volume total du gel ( $V_t$ ) est obtenu en multipliant la hauteur par la surface du gel.  $K_{av}$  représente le coefficient de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire. Il existe une relation linéaire entre le  $K_{av}$  de chaque protéine et le logarithme de la masse moléculaire. Le  $K_{av}$  renseigne sur le comportement d'un soluté indépendamment des dimensions du lit du gel ou du remplissage de la colonne :

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (5)$$

$V_e$ : volume d'éluion

$V_0$ : volume mort de la colonne

$V_t$ : volume total

Les valeurs de  $K_{av}$  sont comprises entre 0 ( $K_{av}$  d'exclusion), valeur correspondant aux molécules de haut poids moléculaire et 1,  $K_{av}$  maximum correspondant aux molécules de faible poids moléculaire. Un  $K_{av}$  supérieur à 1 traduit une adsorption des molécules sur la matrice du gel.

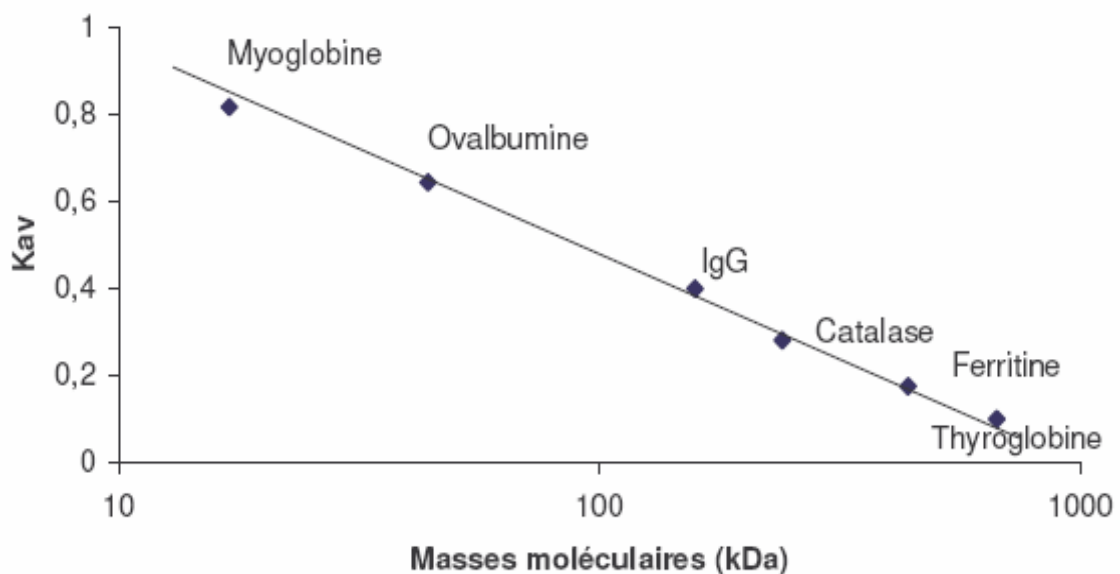
**\* Etalonnage de la colonne**

Une colonne 16/50 Superose 12 prep grade (Pharmacia Biotech) a été utilisée. C'est une colonne qui permet de séparer des protéines de masses moléculaires comprises entre 1 et 900 kDa. Les protéines de masses moléculaires supérieures à 900 kDa vont être éluées dans le volume mort, et les protéines de masses moléculaires inférieures à 1 kDa en fin d'analyse. La colonne a été équilibrée et éluee avec un tampon Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5. Un détecteur en sortie de colonne a permis de mesurer l'absorbance à 280 nm ; il a été directement relié à un enregistreur ce qui a permis d'obtenir dans chaque cas un chromatogramme. Une gamme d'étalonnage a été réalisée à l'aide d'un kit de gel filtration (Bio-Rad, CA, USA) contenant six protéines de masses moléculaires différentes et du bleu dextran (Tableau VII).

**Tableau VII : Masses moléculaires des marqueurs utilisés pour l'étalonnage de la colonne.**

<b>Marqueurs</b>	<b>Masses moléculaires (kDa)</b>
Bleu dextran	2 000
Thyroglobuline	670
Ferritine	438
Catalase	240
Gamma-globuline (IgG)	158
Ovalbumine	44
Myoglobine	17

Le bleu dextran a permis de déterminer le volume mort de la colonne car son poids moléculaire est au-dessus des capacités de la colonne. L'étalonnage de la colonne a été réalisé après dépôt et élution de marqueurs de masses moléculaires dans les mêmes conditions opératoires que pour les échantillons. Les injections ont été faites avec une boucle de 2 mL, sous un débit de 1 mL/min. Le volume d'élution ( $V_e$ ) de chaque protéine a été mesuré sur le chromatogramme du début d'injection au milieu du pic d'élution. Les résultats des chromatogrammes ont permis de tracer une droite d'étalonnage, représentant  $K_{av}$  en fonction du logarithme de la masse moléculaire (Figure 17). L'utilisation de la courbe d'étalonnage des  $K_{av}$  en fonction des masses moléculaires des étalons nous a permis de déterminer les masses moléculaires apparentes des trois phénotypes majeurs de l'Hp.



**Figure 17 : Droite d'étalonnage de la colonne Superose 12 prep grade pour la détermination des masses moléculaires.**

### ***II. 3. 6. Evaluation de la pureté***

#### ***\* Electrophorèse en présence de SDS***

La pureté de chaque matériel préparé a été évaluée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les protéines purifiées ont été déposées sur 2 gels différents et les conditions d'électrophorèse ont été les mêmes que celles retenues pour le phénotypage. Après migration, l'un des gels a été coloré au bleu de Coomassie pour détecter la présence de toute protéine, et le deuxième gel a été placé dans la solution de révélation des complexes Hp-Hb grâce à leur peroxydase dans des conditions identiques à celles décrites pour le phénotypage. L'examen visuel comparatif des 2 gels a eu pour objectif de détecter la présence d'éventuelles protéines contaminantes.

#### ***\* Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford***

##### ***- Principe***

Le dosage des protéines totales a été réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). C'est un dosage colorimétrique basé sur la propriété du bleu de Coomassie de se lier spécifiquement aux protéines, la longueur d'onde d'absorbance maximale passant de 465 à 595 nm lorsqu'il est lié à une protéine. C'est une méthode rapide car la fixation est complète après 5 minutes et l'absorbance du complexe colorant-protéine est relativement stable. L'intensité de la coloration est fonction de la concentration de protéines.

### *- Mode opératoire*

La composition d'un litre de réactif est la suivante : 100 mg de bleu de Coomassie G-250 (Serva, Heidelberg, Allemagne), 50 mL d'éthanol, 100 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % (w/v).

A 50 µL de soude 1 mol/L, ont été ajoutés 50 µL d'échantillons protéiques et 1 mL de réactif au bleu de Coomassie. La lecture d'absorbance a été effectuée après une incubation de 5 minutes à température ambiante à 595 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine.

### ***II.3. 7. Dosage de l'haptoglobine après purification***

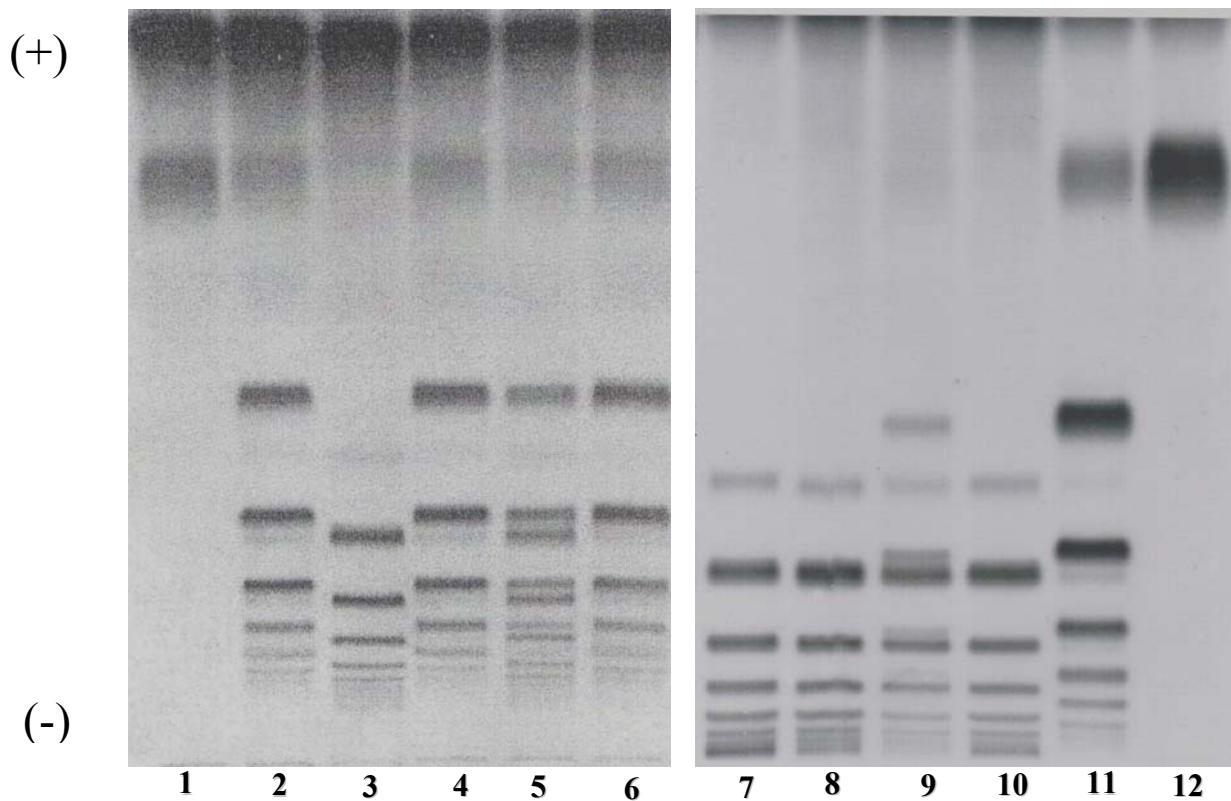
La concentration d'Hp a été déterminée par immunonéphélométrie cinétique (Immage, Beckman Coulter) avec les réactifs du fabricant et les résultats ont été exprimés en g/L d'haptoglobine.

## **III. Résultats**

### **III. 1. Identification des phénotypes d'haptoglobine**

L'hémoglobine a été ajoutée en excès avant électrophorèse afin de complexer toute l'haptoglobine présente dans l'échantillon à étudier. Ainsi, il restait dans le plasma, après formation des complexes Hp-Hb, une certaine quantité d'hémoglobine libre qui a migré à sa

vitesse propre pour se retrouver très proche de l'anode. Différents profils électrophorétiques ont été obtenus après électrophorèse des plasmas, en fonction des phénotypes d'haptoglobine (Figure 18).



**Figure 18 : Profils électrophorétiques des phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine.** (1) : Hp 1-1, (2) : Hp 2-1, (3) : Hp 2-2, (4) : Hp 2-1, (5) : Hp 2-1, (6) : (Hp 2-1). (7) : Hp 2-2, (8) : Hp 2-2, (9) : Hp 2-2, (10) : Hp 2-2, (11) : Hp 2-1, (12) : (Hp 1-1).

### ***III. 1. 1. Identification de l'Hp 1-1***

Le phénotype Hp 1-1 a donné, après électrophorèse en milieu alcalin, une bande unique qui a migré à proximité de l'hémoglobine résiduelle. Après révélation de l'activité peroxydasique, la bande la plus rapide correspondait à l'hémoglobine et la moins rapide au complexe Hp-Hb. Elles ont présenté entre elles une certaine distance de migration qui a permis de les identifier

aisément. Ainsi, la présence d'une bande colorée migrant à une bonne distance de l'origine vers l'anode, et distincte de celle de l'hémoglobine résiduelle a permis de classer le plasma dans le phénotype Hp 1-1. Cependant dans certains cas, la discrimination entre les deux bandes a été difficile à faire et il nous a fallu recourir à une électrophorèse à pH 7,0 comme suggéré par Laurell (Laurell, 1959a), pour distinguer des plasmas de type Hp 1-1 de ceux ne contenant pas d'haptoglobine décelable. Ainsi, tous les plasmas qui n'appartenaient pas aux types Hp 2-1 ou Hp 2-2, ont été contrôlés à pH 7,0, ce qui a permis de distinguer avec la plus grande netteté ceux qui devaient être classer dans le groupe Hp 1-1 de ceux qui ne contenaient pas d'haptoglobine décelable.

### ***III. 1. 2. Identification de l' Hp 2-1***

Le phénotype Hp 2-1 a donné après électrophorèse en milieu alcalin une bande de migration rapide, et une série de bandes polymérisées dont la migration et la densité augmentaient progressivement de la cathode vers l'anode. Deux formes d'Hp 2-1 ont été décrites : une dite "normale", qui a été retrouvée dans les échantillons que nous avons analysés ; l'autre dite "modifiée" et décrite par certains auteurs (Connell et Smithies, 1959 ; Maeda, 1991 ; Kasvove et coll., 2000). Pour cette forme dite modifiée, les fractions haptoglobiniques migrent au même niveau que celles du type normal, mais les deux premières d'entre elles (les plus proches de l'anode) sont quantitativement nettement plus importantes, tandis que les plus lentes ont tendance à s'effacer complètement (Connell et Smithies, 1959). Nous n'avons pas retrouvé dans la population que nous avons étudiée de forme dite "modifiée".

### **III. 1. 3. Identification de l' Hp 2-2**

Ce groupe est caractérisé à l'électrophorèse par l'absence de bande de migration rapide par rapport aux deux autres phénotypes. On note, comme avec le phénotype Hp 2-1, la présence de bandes polymérisées dont la migration et la densité augmentent progressivement de la cathode vers l'anode. Il n'a pas été pas décrit de formes dites "modifiées".

### **III. 2. Fréquences des phénotypes d'haptoglobine**

Les fréquences des différents phénotypes d'haptoglobine des 312 plasmas que nous avons eu à tester, sont répertoriées dans le Tableau VIII. Pour 5 plasmas que nous n'avons pas pu classer par électrophorèse en milieu alcalin, quatre se sont révélés être du type 1-1 après électrophorèse à pH 7,0, un seul n'a pas pu être classé et a été assimilé comme ne contenant pas d'haptoglobine décelable. Nous n'avons pas retrouvé de formes dites modifiées.

**Tableau VIII : Proportion des 3 phénotypes retrouvés dans une population de 312 patients.**

	<b>Hp 1-1</b>	<b>Hp 2-1</b>	<b>Hp 2-2</b>	<b>Hp non détectable</b>
Pourcentage dans notre étude (Nombre)	15,4 (48)	51,0 (159)	33,3 (104)	0,3 (1)
Pourcentage dans la littérature (Van Sande et coll., 1963)	15,3	49,7	35,0	0



### III. 3. Purification de l'haptoglobine

#### III. 3. 1. Rendement et degré de purification

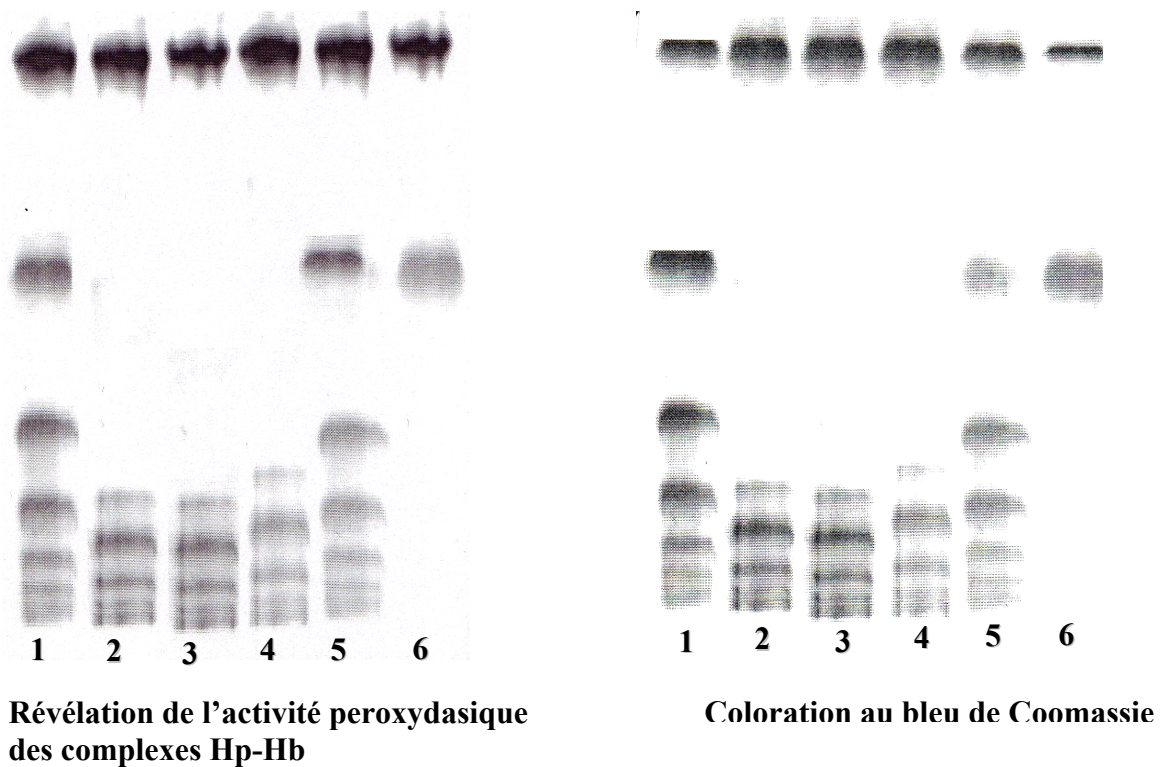
Les trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine ont été purifiés par chromatographie échangeuse d'anions suivie d'une chromatographie d'exclusion-diffusion. Les résultats obtenus lors de la purification de chacun des 3 phénotypes ont été trouvés comparables du point de vue du rendement et du degré de purification. A titre d'exemple, les résultats d'une séquence de purification sont répertoriés dans le Tableau IX.

**Tableau IX : Résultats de la purification de l'Hp**

<b>Etapes</b>	<b>Protéines totales (mg)</b>	<b>Hp (mg)</b>	<b>Pureté (Hp/PT)</b>	<b>Rendement (%)</b>	<b>Degré de purification</b>
Plasma	1891	32.01	0.0169	-	-
Dessalage G-25	1064	30.92	0.0290	96.6	-
Echange d'anions	33.21	27.17	0.8181	84.9	48.4
Gel-filtration	21.23	20.81	0.9802	65.0	58.0

Les dosages d'haptoglobine ont été réalisés en immunonéphélométrie.  
PT : protéines totales.

L'élution de l'haptoglobine au cours de la chromatographie par échange d'anions a donné un pic, avec une concentration maximale d'haptoglobine à la concentration de 650 mmol/L de Cl<sup>-</sup>, quel que soit le phénotype considéré. Pour les différentes séquences de purification réalisées, le rendement a été voisin de 65 % avec une pureté de l'ordre de 98 %. L'absence de dénaturation de l'haptoglobine a été évaluée grâce à l'étude de son pouvoir peroxydasique. L'examen visuel des 2 plaques après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (l'une colorée au bleu de Coomassie, et l'autre révélée par le pouvoir peroxydasique du complexe Hp/Hb) n'a pas montré de spot supplémentaire à ceux de l'haptoglobine. (Figure 19).



**Figure 19 : Evaluation de la pureté des phénotypes d'haptoglobine.** Sur les deux gels ont été déposés six échantillons d'haptoglobine purifiée. Après migration, l'un des gels a été mis dans la solution acétique de diméthylbenzidine permettant de révéler les complexes Hp-Hb. L'autre gel a été coloré au bleu de Coomassie permettant de détecter la présence de toute protéine. L'examen comparatif des 2 gels a permis de conclure à l'absence de protéines contaminantes détectables par cette technique.

### *III. 3. 2. Masses moléculaires des phénotypes d'Hp*

Les masses moléculaires apparentes de l'haptoglobine pour chacun des trois phénotypes (n = 20) sont répertoriées dans le Tableau X. Pour le phénotype 1-1, nous avons trouvé une masse moléculaire moyenne de 86,9 kDa avec un écart type de 0,4 kDa. En ce qui concerne les phénotypes Hp 2-1 et Hp 2-2, les masses moléculaires retrouvées sont variables et s'étendent de 141 à 252 et 171 à 450 kDa, respectivement.

**Tableau X : Masses moléculaires apparentes des phénotypes d'haptoglobine déterminées par gel filtration**

Numéro	Phénotypes d'haptoglobine :		
	Masses moléculaires (Da)		
	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
1	87 000	197 000	172 000
2	86 500	141 000	390 000
3	87 000	251 000	220 000
4	86.900	140.000	220.000
5	87.000	197.000	280.000
6	86.500	141.000	282.000
7	86 700	198 000	390 000
8	87.000	142 000	172.000
9	86 700	141 000	220 000
10	86.000	252.000	450.000
11	86.800	140.000	220.000
12	86 400	248 000	449 000
13	86.900	197 000	280.000
14	87 000	141 000	390 000
15	86.000	196.000	334.000
16	86.500	141.000	220.000
17	86.900	248.000	391.000
18	87.000	141.000	220.000
19	87 500	196 000	171 000
20	86 900	252 000	220 000
Moyenne ± écart type	86 900 ± 400	191 000 ± 40 000	291 000 ± 36 000

#### IV. Discussion

Nos résultats obtenus lors du phénotypage de l'haptoglobine contenue dans 312 plasmas montrent des fréquences de l'ordre 15 %, 51 %, et 33 % pour les phénotypes Hp 1-1, Hp 2-1 et Hp 2-2, respectivement. Ces fréquences sont très proches de celles retrouvées par Van Sande (Van Sande et coll., 1963) dans une population parisienne. De même, on retrouve des fréquences voisines un peu partout en Europe, notamment en Belgique, avec 13 % de

phénotypes Hp 1-1, 53 % de phénotypes Hp 2-1 et 34 % de phénotypes Hp 2-2 (Louagie et coll., 1993). Des fréquences similaires ont été retrouvées en Allemagne (Thomas, 1992), en Hongrie (Hever, 1969) et en Suède (Fröhlander et Johnson, 1989), montrant ainsi une répartition relativement identique dans une grande partie des populations européennes.

Un phénotype dit Hp 2-1 "modifié" est souvent décrit dans la littérature. Ce phénotype correspond au produit d'une mutation portant sur le gène Hp2 (Maeda, 1991). La protéine mutée donne, à l'électrophorèse, sensiblement le même profil que le phénotype Hp 2-1 "normal", avec des fractions haptoglobiniques (bandes à l'électrophorèse) qui migrent aux mêmes niveaux. La différence réside dans le fait que les deux bandes qui migrent le plus près de l'anode sont quantitativement nettement plus importantes pour phénotype 2-1 "modifié", tandis que les bandes plus lentes ont tendance à s'effacer complètement (Connell et Smithies, 1959).

Nous n'avons pas retrouvé de phénotype 2-1 "modifié", qui semble exceptionnel voire absent dans les populations caucasiennes (Smithies, 1959 ; Kasvosve, 2000b). Ce phénotype 2-1 modifié semble beaucoup plus fréquent dans les populations africaines et américaines où Giblette et Moullec l'ont retrouvé dans des proportions de 10 à 11 % (Giblette, 1959 ; Moullec, 1960).

Dans notre étude, un plasma n'a présenté aucune bande caractéristique de l'haptoglobine (possédant une activité peroxydasique) après électrophorèse en présence d'hémoglobine à pH alcalin, ni à pH 7,0, nous amenant à classer le patient dans le groupe de sujets à Hp non détectable. En effet, . Un dosage immunonéphélométrique nous a confirmé l'absence d'haptoglobine détectable. Ces résultats ont été confirmés sur un deuxième spécimen plasmatique réalisé un mois plus tard. Un tel fait pourrait amener à faire penser qu'il s'agit d'un individu atteint d'hypo voire d'anahaptoglobinémie. En effet, des cas, bien que rares

(1/1000), de déficit congénital en haptoglobine ont été rapportés (Piessens et coll., 1984 ; Panter et coll., 1985 ; Haines et coll., 1986). Ils seraient étroitement associés à des cas d'épilepsies familiales attribuées à une inflammation encéphalique secondaire à une oxydation des lipides cérébraux par le biais de l'hémoglobine libre du milieu interstitiel (Panter et coll., 1985 ; Haines et coll., 1986) ou à des allergies respiratoires attribuées à une augmentation de la synthèse des prostaglandines, l'Hp ayant été identifiée comme étant un inhibiteur de la synthèse de ces dernières (Manoharan, 1997). Par contre, des fréquences d'anahptoglobinémie plus élevées ont été rapportées en Australie (1,7 %), ainsi que chez des populations noires (30 %) en Afrique du sud, au Cameroun et au Nigeria (Allison et coll., 1958 ; Mitchell, 1988). A ce titre, il est important de différencier l'anahptoglobinémie (phénotype Hp 0-0) qui est due à l'absence d'expression du gène de l'Hp (Langlois et Delanghe, 1996 ; Koda et coll., 1998), des hypohaptoglobinémies qui peuvent être secondaires à une maladie congénitale comme les désordres hémolytiques (déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase, thalassémie, drépanocytose) (Galatius-Jensen, 1960). En effet, après destruction des hématies, l'Hp est saturée quand approximativement 0,5 à 1,5 g/L d'Hb libre a été relarguée dans le plasma, ce qui correspond à un degré d'hémolyse modéré (Langlois et Delanghe, 1996). Ainsi une relative baisse de la concentration de l'Hp rencontrée dans certaines circonstances de la vie comme l'exercice physique intense peut induire une relative hypohaptoglobinémie (Langlois et Delanghe, 1996). Après saturation des capacités de fixation de l'Hp par l'hémoglobine, les concentrations d'hémopexine qui fixe l'hème libre (Tabbara, 1992) commencent à diminuer tandis que celles de l'Hp restent faibles (en dessous de 0,3 g/L) (Delanghe et coll., 1998 ; Delanghe et coll., 2001).

Une autre difficulté dans l'interprétation de concentrations basses d'haptoglobine provient du fait que les valeurs de références sont dépendantes du phénotype (Langlois et Delanghe, 1996). En effet, les valeurs de référence du phénotype 2-2 sont plus basses (0,38-1,50 g/L)

que celles du phénotype 2-1 (0,44-1,83 g/L) et celles du phénotype 1-1 (0,57-2,27 g/L) (Langlois et Delanghe, 1996). De même, l'âge constitue un autre point critique du diagnostic d'hypohaptoglobulinémie, du fait que l'haptoglobine n'est pas détectée dans le sérum des nouveaux nés et reste indétectable chez 50 % des nourrissons de 1 à 2 mois (Kanakoudi et coll., 1995 ; Delanghe et coll., 1998).

Les méthodes proposées dans la littérature pour la purification de l'haptoglobine, sont relativement longues et complexes, exposant ainsi à un risque de dénaturation de l'haptoglobine et à une perte de temps considérable (Liau et coll., 2003). En effet, les premières méthodes de purification consistaient en une électrophorèse des protéines, qui permettaient de repérer les bandes correspondant à l'Hp. Après élution des bandes, plusieurs étapes de chromatographie étaient nécessaires pour obtenir de l'haptoglobine purifiée (Bowman et coll., 1988; Tosa et coll., 1993). Ces méthodes, étaient longues, exposaient à un risque de dénaturation de l'Hp et ne présentaient pas des rendements satisfaisants. Par la suite, de nouvelles méthodes mettant à profit l'affinité de l'haptoglobine pour l'hémoglobine ont été développées (Javid et Liang, 1973 ; Delers et coll., 1981 ; Rademacher et Steele, 1987). Ces méthodes, basées sur le principe de la chromatographie d'affinité, utilisaient de l'hémoglobine de poulet greffée sur une matrice de Sépharose. De telles méthodes nécessitaient des concentrations élevées d'urée (8,0 mol/L) pour l'élution de l'Hp. Ces conditions étaient susceptibles d'éluer des molécules d'Hb greffées sur la matrice, lesquelles contaminaient les préparations d'Hp. De plus, l'utilisation de l'hémoglobine de poulet constituait un facteur limitant pour l'obtention de rendements appréciables, car elle possède une capacité de fixation de l'Hp 20 fois plus faible que celle de l'hémoglobine humaine (Liau et coll., 2003). En plus de l'hémoglobine, l'apoprotéine A-1 est fréquemment décrite comme un contaminant des préparations d'Hp (Tseng et Coll., 2004a). Aussi, Liau et coll. ont

proposé une méthode de purification par CLHP utilisant une colonne Sépharose 4B sur laquelle était adsorbée de l'hémoglobine humaine préalablement purifiée par chromatographie par échange d'anions. Cependant, l'utilisation d'une colonne d'exclusion - diffusion supplémentaire a été nécessaire pour éliminer l'apoprotéine A-1 des préparations de phénotypes 2-1 et 2-2. Une chromatographie d'immuno-affinité utilisant un système composé de 2 anticorps a été également proposée (Katnik I, 1993), mais la pureté de l'haptoglobine purifiée n'a pas été précisée. Cette méthode a été développée pour la préparation d'antigènes en vue de la production d'anticorps monoclonaux (Katnik et Jadach, 1993 ; Liau et coll., 2003 ; Tseng et coll., 2004a). Enfin, deux méthodes de purification utilisant des anticorps dirigés contre les chaînes  $\alpha$  (Tseng et coll., 2004a) ou  $\beta$  de l'Hp (Yueh, et coll., 2006), couplées à l'utilisation d'une colonne d'exclusion - diffusion, ont été décrites par une équipe taïwanaise.

Nous avons mis au point une méthode de purification commune et adaptée aux trois phénotypes de l'Hp. Cette méthode nous a permis de disposer de la protéine pure, en quantité suffisante pour les expériences ultérieures envisagées *in vitro*. La méthode de purification retenue a combiné une chromatographie d'échange d'anions et une filtration sur gel utilisant une colonne de Superose 12. De plus, la méthode utilisée nous a permis de déterminer à la fin de chaque séquence de purification la masse molaire apparente du phénotype considéré. Cette méthode nous a permis d'obtenir, en une journée, de l'haptoglobine pure à 98 % avec un rendement moyen de 65 %. L'utilisation de l'électrophorèse en présence de SDS a permis de vérifier qu'il n'avait pas de contaminant détectable par cette méthode.

La mise au point d'une technique de purification de l'Hp a été liée au fait que la plupart des méthodes de purification décrites dans la littérature ne nous étaient pas accessibles (colonnes et anticorps non commercialisés). Par ailleurs, l'appréciation des données relatives aux différentes méthodes évoquées nous a conduit à éviter les méthodes utilisant de

l'hémoglobine adsorbée et susceptible de contaminer les préparations d'Hp, dans la mesure où un de nos principaux objectifs a été d'étudier par la suite les interactions Hp-Hb. Le rendement de notre séquence de purification (65 %) est comparable à celui obtenu par d'autres auteurs (Rademacher et Steele, 1987), mais dont la durée de mise en œuvre était trois fois plus longue. La méthode proposée par Liao (Liao et coll., 2003) utilisant de l'hémoglobine humaine greffée sur une colonne donnait un rendement relativement modeste (45 %) et la purification des phénotypes Hp 2-1 et Hp 2-2 devait être complétée par l'utilisation d'une colonne de Superose 12 pour améliorer la pureté des préparations (Liao et coll., 2003). Les méthodes utilisant des anticorps dirigés contre les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'Hp associées à l'utilisation d'une colonne Superose 12 donnaient des rendements de l'ordre de 70 % et une pureté de 97 % (Tseng et coll., 2004a ; Yueh et coll., 2006). La séquence de purification que nous avons retenue, comme celle décrite par l'équipe taïwanaise, s'est révélée très efficace pour l'élimination de l'Apo A-1 ainsi que d'autres protéines de haut poids moléculaires (Tseng et coll., 2004a). L'utilisation d'une colonne de type Superose 12 s'est avérée adaptée à la purification de chacun des trois phénotypes, et a permis d'obtenir un mélange de formes polymériques pour les phénotypes Hp 2-1 et Hp 2-2 (Tseng et coll., 2004a). L'utilisation d'une telle colonne nous a permis de déterminer les masses moléculaires apparentes des phénotypes d'Hp, afin de pouvoir utiliser des concentrations molaires équivalentes dans nos études réalisées ultérieurement *in vitro*. Les concentrations molaires obtenues ont été cohérentes par comparaison avec les mesures effectuées à 280 nm en utilisant les coefficients d'absorbance molaire déterminés par Rademacher et Steele (Rademacher et Steele, 1987), c'est-à-dire 10,2, 11,8, et 13,3 x 10<sup>4</sup> L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement. Pour toutes ces raisons, nous avons opté pour la mise au point d'une méthode de purification accessible et adaptée à nos objectifs nous permettant d'obtenir de l'Hp pure en quantité suffisante.



## V. Conclusion

D'importantes différences fonctionnelles entre les phénotypes d'Hp ont été démontrées et ont montré d'importantes conséquences biologiques et cliniques (Langlois et Delanghe, 1996 ; Dobryszycska, 1997). A titre d'exemple, les patients ayant le phénotype Hp 2-2 présentent une susceptibilité accrue vis-à-vis des maladies cardiovasculaires et diabétiques comparés à ceux ayant le phénotype Hp 1-1 (Langlois et Delanghe, 1996 ; Asleh R et coll., 2005). Si la protéine a été caractérisée génétiquement, le rôle physiologique exact des différents phénotypes et les mécanismes biologiques par lesquels les individus de phénotype 1-1 sont moins susceptibles à développer certaines pathologies que ceux de phénotypes Hp 2-1 et Hp 2-2 ne sont pas clairement élucidés. Un des obstacles majeurs à l'étude de ces phénotypes d'Hp consiste en la difficulté de disposer de la protéine pure pour chacun des trois phénotypes, afin d'étudier *in vitro* leurs effets. Ces obstacles sont liés aux difficultés rencontrées dans les procédures de purifications.

L'objectif principal de cette partie de l'étude a été de pouvoir disposer de préparations purifiées de chacun des trois phénotypes majeurs de l'Hp, afin d'étudier leurs propriétés *in vitro*.

Le phénotypage a été réalisé sur gel de polyacrylamide et a permis de déterminer les fréquences de chaque phénotype dans la population étudiée. La difficulté de disposer à partir des méthodes de purification décrites dans la littérature d'une séquence de purification adaptée à chacun des trois phénotypes nous a amené à mettre au point une séquence de purification adaptée à nos objectifs. En effet, les méthodes de chromatographie d'affinité utilisant de l'hémoglobine humaine ou animale sont susceptibles de conduire à l'obtention de

préparations d'Hp contaminées par l'hémoglobine ou par l'apoprotéine A-1, rendant nécessaire l'introduction d'une étape de purification supplémentaire, en particulier pour les phénotypes Hp 2-1 et Hp 2-2. Une alternative à ces méthodes de purification en chromatographie d'affinité utilisant de l'hémoglobine a consisté à utiliser des colonnes greffées par des anticorps dirigés contre les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'Hp. La non disponibilité de ces méthodes au moment où a été initié notre travail et la production de ces anticorps ne nous étant pas accessibles, nous n'avons pas pu mettre en œuvre de telles séquences de purification. Un argument supplémentaire à la mise au point d'une séquence de purification adaptée à nos objectifs a été lié à la nécessité de déterminer, pour chaque phénotype purifié, sa masse moléculaire apparente afin de pouvoir utiliser les mêmes concentrations molaires dans des expériences réalisées ultérieurement *in vitro*. Tous ces éléments nous ont amenés à mettre au point une séquence de purification unique aux trois phénotypes et adaptée à nos objectifs.

**Quatrième Partie : Interaction entre les phénotypes de l'haptoglobine et l'hémoglobine. Conséquences sur la détermination de l'haptoglobine en biochimie clinique.**

## I. Introduction

L'haptoglobine est une glycoprotéine plasmatique, découverte par Polonovski et Jayle en 1938, qui présente une forte affinité pour l'hémoglobine (Polonovski et Jayle, 1938). Le complexe formé est capté par le foie où il est rapidement catabolisé (Kino et coll., 1980 ; Higa et coll., 1981). Malgré la remarquable stabilité du complexe Hp-Hb, sa formation n'implique pas des liaisons covalentes. L'existence de liaisons hydrophobes (Javid et Liang, 1973), ioniques (Wacks et Alfsen, 1968a) et hydrogènes (Lavialle et coll., 1974) a été rapportée. De plus, le complexe Hp-Hb peut être dissocié dans certaines conditions expérimentales, notamment en présence de 3,5 mol/L de guanidine à pH 5,0 (Waks et Alfsen, 1968a ; Wacks et coll., 1969 ; Javid et Liang, 1973). Bien que l'haptoglobine ait été découverte il y a une soixantaine d'années et malgré la cristallisation du complexe de l'haptoglobine avec l'hémoglobine de rat intervenue trente ans plus tard (Wacks et Alfsen, 1968b), la nature des interactions de l'haptoglobine avec l'hémoglobine n'est pas encore clairement élucidée (Nielsen et coll., 2006) et la formation du complexe Hp-Hb constitue un intéressant modèle d'étude d'interactions biomoléculaires (Javid, 1978).

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'Hp est une protéine synthétisée sous forme d'une seule chaîne polypeptidique. La protéine mature est constituée de 2 types de chaînes polypeptidiques : une chaîne légère  $\alpha$  et une chaîne lourde  $\beta$ , chaque chaîne étant répétée au moins une fois (Raugei et coll., 1983 ; Yang et coll., 1983 ; Van der Straten et coll., 1984). Les deux types de chaînes sont reliées entre elles par un pont disulfure. L'étude de l'Hp de la plupart des mammifères a révélé que chaque sous-unité  $\alpha\beta$  est reliée à une autre par un pont disulfure entre les chaînes légères pour former une molécule complète notée  $\beta\alpha-\alpha\beta$  (Urushibara et coll., 1992).

L'hémoglobine est un tétramère composé de 2 sous-unités  $\alpha$  et de 2 sous-unités  $\beta$ . En solution, le tétramère est en équilibre dynamique avec les 2 dimères  $\alpha\beta$  (Perutz, 1965). Plusieurs études ont montré que chaque dimère  $\alpha\beta$  de l'Hb peut se fixer sur une chaîne lourde  $\beta$  de l'Hp et que la chaîne légère  $\alpha$  de l'Hp ne semble pas intervenir dans cette liaison (Bernini et Borri-Voltattorni, 1970 ; Valette et coll., 1981). Les résultats obtenus par différentes approches incluant la spectroscopie en dichroïsme circulaire (Waks et coll., 1971), la réactivité des groupements sulfhydryles (Hwang et Greer, 1980) et des études de "dye-binding" (Arcoleo et Greer, 1982), suggèrent que la structure de chacune des 2 protéines ne change pratiquement pas durant la formation du complexe Hp-Hb. Des données issues de diverses expériences laissent penser que la liaison de l'Hb à l'Hp a lieu après la dissociation du tétramère d'Hb en dimères  $\alpha\beta$  (Laurell, 1959b ; Adams et Weiss, 1969 ; Peacock et coll., 1970). En particulier, les études réalisées par Nagel indiquent que l'Hb tétramère est incapable de se lier à l'Hp et que sa dissociation en dimères est indispensable, et devient de ce fait un facteur limitant à la formation du complexe Hp-Hb (Nagel, 1967).

Comme nous l'avons indiqué par ailleurs, l'Hp humaine présente trois phénotypes majeurs (Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2) et plusieurs différences ont été rapportées entre les phénotypes en relation avec l'importance de l'Hp dans le métabolisme du fer dans certaines situations pathologiques incluant l'hémochromatose, le stress oxydant, les maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses (Tolasano et coll., 2005). Des hypothèses pour expliquer ces différences ont été avancées, en rapport avec d'une part des différences d'affinités entre les phénotypes d'Hp et l'Hb et/ou des différences d'affinités des complexes Hp-Hb pour le récepteur CD 163, et d'autre part des différences entre le pouvoir antioxydant des phénotypes d'Hp (Kristansen et coll., 2001 ; Melamed-Franck et coll., 2001 ; Asleh et coll., 2003). Par conséquent, plusieurs approches ont été utilisées pour suivre l'interaction Hp/Hb, qui s'avère

relativement difficile à étudier du fait de l'affinité élevée de l'haptoglobine pour l'hémoglobine (Bowman et Kurosky, 1982 ; Langlois et Delanghe, 1996 ; Asleh et coll., 2003). Ces approches incluent des techniques de "quenching" de fluorescence, d'électrophorèse, de calorimétrie, par titration et de résonance plasmonique de surface (Nagel, 1967 ; Adams et Weiss, 1969 ; Lavialle et coll., 1974 ; Arcoleo et Greer, 1982 ; Okazaki et coll., 1996 ; Asleh et coll., 2005). Les résultats des paramètres de l'interaction obtenus à partir de ces différentes méthodes ne sont pas très précis du fait de la forte affinité entre les deux protéines (Asleh et coll., 2005) qui correspond, d'après les données de la littérature, à des constantes d'équilibre de dissociation comprises entre  $10^{-10}$  et  $10^{-16}$  mol.L<sup>-1</sup> (Bowman BH et coll. 1988 ; Langlois et Delanghe, 1996 ; Asleh et coll., 2005). Ainsi plusieurs artifices utilisant de l'hémoglobine modifiée ou une de ses chaînes ont été employés pour mesurer l'affinité entre ces deux protéines (Benesch et coll., 1976 ; Hwang et Greer, 1979 ; Hwang et Greer, 1980 ; Asleh et coll., 2005).

Cette partie du mémoire sera consacrée à l'étude des interactions de l'hémoglobine avec les trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine. Elle sera complétée par l'étude de ses conséquences sur la détermination de l'haptoglobine en biochimie clinique.

## **II. Interactions de l'hémoglobine avec l'haptoglobine**

### **II. 1. Contexte et objectifs de l'étude**

Notre objectif a été de comparer l'interaction de l'hémoglobine avec chacun des trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine par deux approches complémentaires, l'une enzymatique à travers le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb, l'autre physique en

microcalorimétrie. Le recours à une méthode de cinétique enzymatique pour étudier les interactions protéines-protéines est assez fréquent (Chance B, 1951 ; Nagel RL, 1967). Depuis la découverte en 1938 par Polonovski et Jayle du fait que le complexe Hp-Hb possédait une activité peroxydasique à pH 4,0, plusieurs méthodes basées sur cette propriété ont été développées pour quantifier l'Hp dans divers milieux biologiques (Jayle, 1951 ; Van Ros et Van Sande, 1964 ; Elson, 1974 ; Standing et Price, 1976). A pH acide (pH 4,0), la quasi totalité de l'activité peroxydasique est due au complexe Hp-Hb alors que celle de l'Hb est pratiquement nulle (Connell et Smithies, 1959 ; Sasazuki et coll., 1974 ; Elson, 1974 ; Standing et Price, 1976). En effet, l'hémoglobine libre est dénaturée en milieu acide, alors que la formation d'un complexe Hp-Hb permet une stabilisation de l'hémoglobine dont le pouvoir peroxydasique est conservé (Cassatt et Steinhardt, 1971 ; Elson, 1974 ; Sasazuki et coll., 1974). Nous avons utilisé le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb à pH 4,0 pour la détermination de constantes d'équilibre de dissociation apparentes entre chaque phénotype d'haptoglobine et l'hémoglobine. Par ailleurs, des résultats préliminaires nous ont permis de montrer que l'interaction de l'haptoglobine avec l'hémoglobine était exothermique. Ainsi, en seconde approche nous avons utilisé cette propriété pour suivre l'interaction de chaque phénotype d'Hp avec l'Hb par microcalorimétrie. La technique actuellement la plus couramment utilisée pour les mesures thermodynamiques est la microcalorimétrie par titration isotherme (Kitzinger et Steiner, 1956 ; Livingstone, 1996). Cette méthode permet la mesure de la quantité de chaleur dégagée ou absorbée dans une enceinte adiabatique par une réaction chimique initiée par le mélange d'au moins deux réactifs. En fonction de l'affinité du système étudié, les paramètres de l'interaction peuvent être directement mesurés, ou bien déduits. Les microcalorimètres modernes sont des outils permettant de mesurer des quantités de chaleur de l'ordre de 1  $\mu$ cal. Ils sont donc particulièrement adaptés à l'étude physico-chimique d'interactions biologiques mettant en jeu la formation ou la rupture de liaisons non-covalentes

comme les liaisons hydrogènes. Plus généralement, ils permettent de quantifier les effets thermiques pouvant accompagner les changements de conformation que subissent de nombreuses molécules biologiques dans le cadre de leur fonction physiologique. En effet, un microcalorimètre fournit directement des grandeurs thermodynamiques, notamment les variations de quantité de chaleur qui caractérisent la stabilité des systèmes (calorimètre différentiel à balayage) ou les interactions moléculaires (titration isotherme). A titre d'exemple historique, Kitzinger a pu, grâce à cet instrument, mesurer la chaleur de réaction lors de l'interaction de l'albumine avec un anticorps dirigé contre cette protéine (Kitzinger et Steiner, 1956). Des grandeurs thermodynamiques ont été récemment déterminées pour plusieurs systèmes protéine-protéine par cette méthode (Leder coll., 1995 ; Tsumoto et coll., 1996, Boudier et coll., 2005). Ainsi, il apparaît que la combinaison d'études thermodynamiques par microcalorimétrie et d'études structurales devrait rendre possible une meilleure caractérisation et quantification des différentes interactions intermoléculaires responsables des processus de reconnaissance moléculaire.

## **II. 2. Matériels et Méthodes**

L'Hp a été purifiée à partir de plamas phénotypés comme décrit dans la troisième partie de ce mémoire. L'hémoglobine utilisée a été d'origine humaine (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).



## ***II. 2. 1. Détermination des constantes d'équilibre de dissociation grâce au pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb***

### ***Principe***

Des essais préliminaires ont été réalisés pour déterminer la concentration d'Hp minimale à utiliser dans la réaction Hp/Hb suivie par la mesure du pouvoir peroxydasique du complexe en cinétique. La concentration de  $10^{-7}$  mol/L a été identifiée comme étant la concentration optimale, quel que soit le phénotype, permettant de suivre en cinétique à pH 4,0 la formation du complexe Hp-Hb en présence de concentrations variables en Hb, selon la méthode de Standing et Price modifiée (Standing et Price, 1976). L'Hp à la concentration de  $10^{-7}$  mol/L a été incubée avec des concentrations variables en Hb avant d'être mise en présence de guaïacol et de peroxyde d'hydrogène à pH 4,0. Dans ces conditions, seul le pouvoir peroxydasique de l'Hb complexée à l'Hp a été mesuré (Connell et Smithies, 1959), avec une variation d'absorbance liée à la formation du tétraguaïacol proportionnelle à l'activité peroxydasique du complexe.

### ***Mode opératoire et exploitation des résultats***

L'haptoglobine et l'hémoglobine ont été diluées dans un tampon Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5.

100  $\mu$ L d'une solution d'Hp (2  $\mu$ mol/L) ont été additionnés à 100  $\mu$ L d'une solution d'hémoglobine humaine de concentration variable. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 100  $\mu$ L du mélange ont été transférés dans une cuvette thermostatée à 37 °C contenant 1 mL d'une solution de guaïacol (0,3 mol/L) dans un tampon acétate (0,175 mmol/L), pH 4,0. Après 10 min d'incubation, la réaction a été initiée par addition de 100  $\mu$ L

d'une solution de peroxyde d'hydrogène 0,12 % (w/v) fraîchement préparée, et la variation d'absorbance  $\Delta A/\text{min}$  a été suivie en continue à 470 nm pendant 5 minutes avec un spectrophotomètre Uvikon 922 (Kontron Inst, Montigny le Bretonneux, France). Les données obtenues ont été analysées par régression non-linéaire en vue de la détermination de la meilleure estimation de la constante apparente d'équilibre de dissociation ( $K_d$ ) en utilisant l'équation (6). Cette équation, classiquement utilisée dans l'étude des interactions réversibles protéine-protéine (Easson et Stedman, 1936 ; Straus et Goldstein, 1943 ; Bieth, 1974), a été appliquée à notre système expérimental sous la forme suivante :

$$\Delta A/\text{min} = \Delta A/\text{min}_{\text{max}} \frac{([\text{Hp}] + [\text{Hb}] + K_d) - \sqrt{([\text{Hp}] + [\text{Hb}] + K_d)^2 - 4 [\text{Hp}][\text{Hb}]}}{2 \times [\text{Hp}]} \quad (6)$$

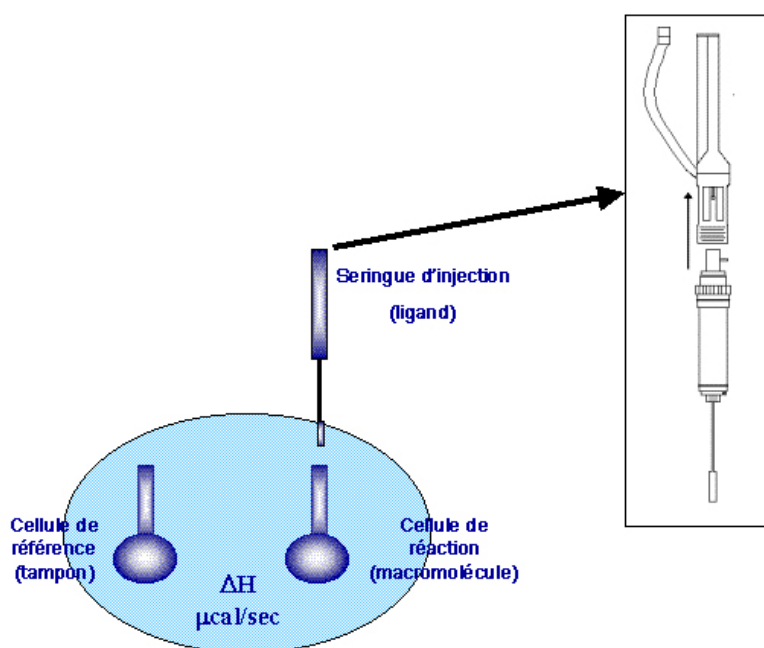
Où :  $\Delta A/\text{min}$  est la variation d'absorbance par min mesurée pour une concentration donnée en hémoglobine,  $\Delta A/\text{min}_{\text{max}}$  est la variation d'absorbance par minute obtenue pour une concentration saturante en hémoglobine.  $[\text{Hp}]$  désigne la concentration en haptoglobine et  $[\text{Hb}]$  désigne la concentration en hémoglobine.

## ***II. 2. 2. Calorimétrie par titration isotherme (ITC)***

### ***Principe de l'ITC***

La calorimétrie par titration isotherme (ITC) permet de déterminer les paramètres décrivant une interaction, telle que celle d'une macromolécule avec un ligand, notamment la constante d'équilibre de dissociation, la stœchiométrie de liaison, ainsi que les variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ), d'entropie ( $\Delta S$ ) et de chaleur spécifique ( $\Delta C_p$ ).

Nous avons mis en œuvre cette technique en utilisant un microcalorimètre à compensation thermique (modèle VP-ITC de Microcal Inc., Northampton, MA, USA). Ce type d'appareil possède deux cellules : l'une contenant la solution de référence, l'autre contenant le milieu réactionnel. Ces deux cellules sont constituées d'un alliage à haute conductivité thermique (Hastelloy®). Un dispositif thermoélectrique mesure la différence de température entre les deux cellules et un deuxième dispositif mesure la différence de température entre les cellules et l'enceinte thermostatée de l'appareil maintenue à la température expérimentale (Figure 20). Si de la chaleur est produite ou absorbée lorsqu'une réaction chimique a lieu dans la cellule réactionnelle, la différence de température entre cette dernière et la cellule de référence sera compensée électriquement en continue. Cette puissance électrique, nécessaire au maintien de la température constante dans la cellule réactionnelle est enregistrée en continue. Elle correspond au signal expérimental brut et s'exprime en  $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Figure 20 : Microcalorimètre VP-ITC**

Dans une expérience typique, une macromolécule placée dans la cellule de mesure du microcalorimètre est progressivement saturée, à température imposée, par injections

incrémentales de ligand délivrées à partir d'une seringue motorisée, pilotée par ordinateur et équipée d'une hélice d'agitation. Chaque addition de ligand est accompagnée d'un dégagement thermique correspondant à l'interaction macromolécule-ligand. L'ampleur de ce dégagement de chaleur est proportionnelle à la quantité de complexe formé, tant que la macromolécule titrée est en excès. L'appareil réagit en produisant ou absorbant électriquement de la chaleur, afin de maintenir constante la température du milieu réactionnel. Si la réaction est rapide, le signal enregistré a l'aspect d'un pic. La quantité de chaleur totale résultant d'une injection correspond à l'aire du pic, c'est-à-dire l'intégrale par rapport au temps du signal expérimental. Le graphe montrant l'ensemble des quantités de chaleur décrivant une expérience de titration est appelé l'isotherme de liaison" (Figure 21).

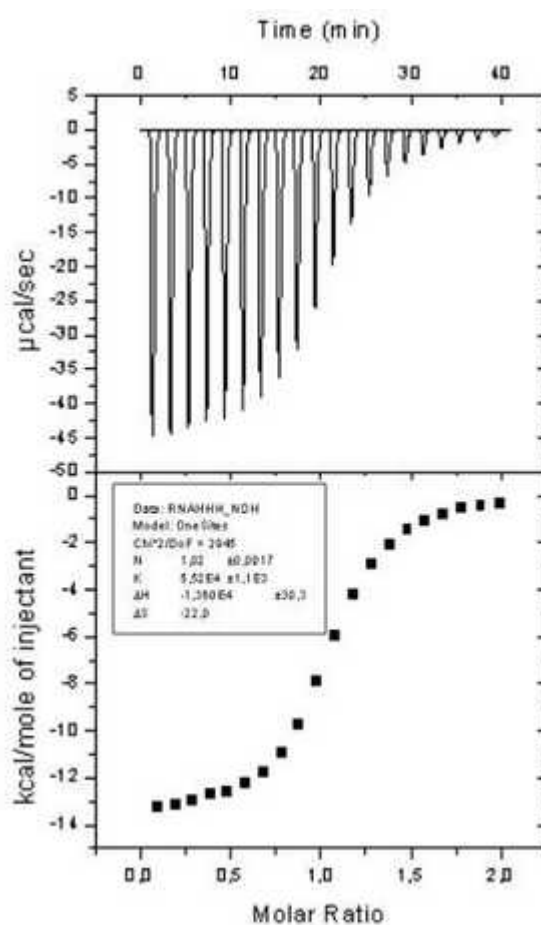
Le principe de la méthode et la sensibilité de l'appareillage permettent d'étudier une interaction avec des quantités minimales de produits. Ses performances, alliées à une gestion automatisée de l'expérimentation et du traitement des résultats, font qu'elle occupe une place de plus en plus importante en biologie.

### **Mode opératoire**

Les investigations calorimétriques de la réaction entre l'hémoglobine et chacun des trois phénotypes d'Hp ont été réalisées à 25 °C dans un tampon Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, contenant de 100 mmol/L NaCl).

1,4 ml de solution tamponnée d'haptoglobine (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ont été placés dans la cellule de mesure alors que la cellule référence a été remplie par du tampon seul. L'hémoglobine dissoute dans le même tampon a été placée dans la seringue motorisée du système. Après que le système ait atteint son équilibre thermique (10 - 20 min) et enregistrement pendant 3 - 5 min de la ligne de base, la solution d'hémoglobine a été injectée sous forme d'incrément

successifs de 3  $\mu\text{l}$  dans la solution d'haptoglobine. Une agitation continue du milieu réactionnel a été maintenue à vitesse constante durant toute l'expérience. Le contrôle du système de mesure, l'acquisition et l'analyse des données ont été réalisés avec les logiciels VP viewer® et Origin® fournis par le fabricant du microcalorimètre.

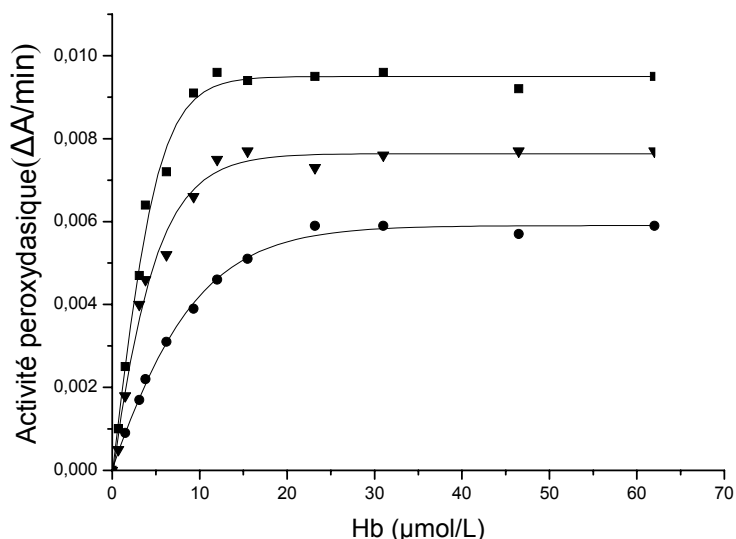


**Figure 21 : Exemple de données calorimétriques obtenues par ITC** (Source : microcal corporation, Northampton, USA) Les injections successives d'une quantité connue de ligand dans la solution de macromolécule contenue dans la cellule de mesure entraîne l'émission d'un signal expérimental montrant des pics de puissance thermique exprimée en  $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$  (courbe du haut). Les quantités de chaleur déduites de la surface des pics permettent d'obtenir l'isotherme de liaison (courbe du bas).

## II. 3. Résultats

### II. 3. 1. Détermination des constantes d'équilibre de dissociation apparentes par la méthode enzymatique

La formation des complexes Hp-Hb a été quantifiée par leur activité peroxydasique pour chacun des trois phénotypes d'Hp en présence de concentrations croissantes d'hémoglobine. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 22.



**Figure 22 : Activité peroxydasique des complexes Hp-Hb.** Hp 1-1 (■) Hp 2-1 (▼) Hp 2-2 (●). Chaque phénotype d'Hp à la concentration de  $10^{-7}$  mol/L a été incubé avec des concentrations croissantes d'Hb. Les variations d'absorbance ont été suivies à 470 nm pendant 5 min après addition de 100  $\mu$ L de peroxyde d'hydrogène 0,12 % (w/v). Chaque point représente la moyenne de 4 mesures réalisées indépendamment. Les courbes représentées ont été générées avec l'équation 6 et les meilleures estimations de  $K_d$ .

La meilleure estimation de la constante d'équilibre de dissociation ( $K_d$ ) du complexe formé entre chaque phénotype d'haptoglobine et l'hémoglobine a été déterminée par régression non-linéaire à partir des données expérimentales (annexe 1) représentées dans la figure 22 en

utilisant l'équation (6). Les valeurs sont présentées au tableau XI. Les résultats ont montré que les affinités des phénotype Hp 1-1 et Hp 2-1 sont statistiquement significativement supérieures à celle du phénotype Hp 2-2.

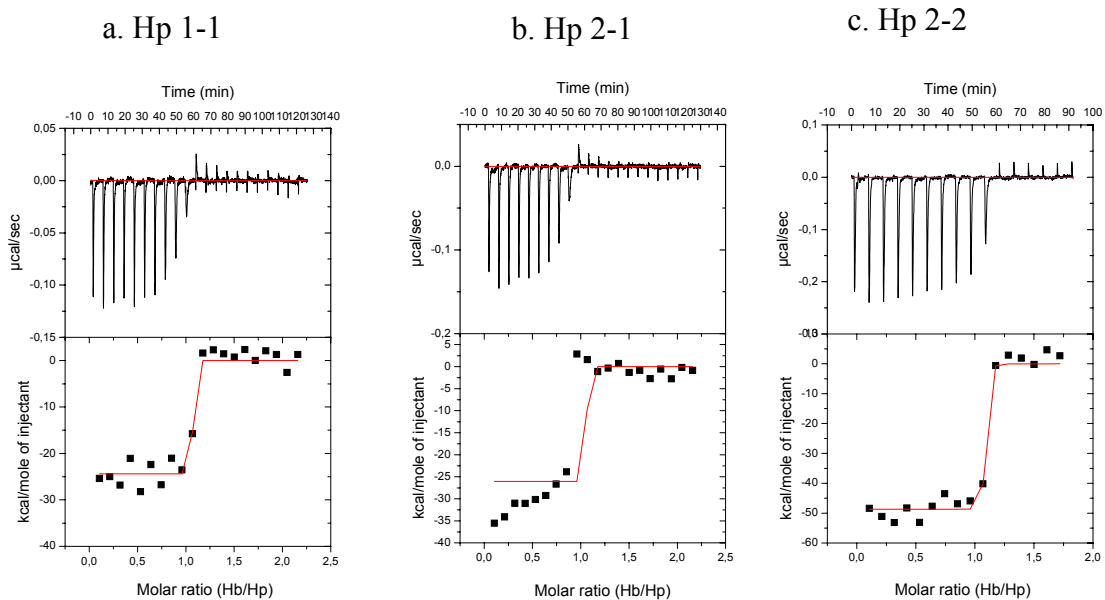
**Tableau XI : Constantes d'équilibre de dissociation apparentes des complexes formés entre les phénotypes d'haptoglobine et l'hémoglobine**

Type de complexe	Constantes de dissociation Kd (mol/L)
Hb-Hp 1-1	$2,5 \pm 0,5 \times 10^{-6}$
Hb-Hp 2-1	$3,1 \pm 0,5 \times 10^{-6}$
Hb-Hp 2-2	$6,7 \pm 1,0 \times 10^{-6}$

### ***II. 3. 2. Investigation en microcalorimétrie***

Des essais préliminaires réalisés à pH 7,5 de l'interaction de l'Hp avec l'Hb ont permis de constater que l'interaction était exothermique. L'allure des courbes de titration de l'Hp par l'hémoglobine a montré que les données obtenues ne permettaient pas une détermination des constantes d'équilibre de dissociation (Figure 22). En effet, les courbes de titration de l'haptoglobine par l'hémoglobine traduisaient une fixation "pseudo-irréversible" de l'Hb par l'Hp dans nos conditions expérimentales. Par conséquent, il était impossible de déterminer des constantes d'équilibre de dissociation dans ces conditions. Des résultats fiables n'ont pas pu être obtenus, malgré des tentatives d'optimisation des conditions de réalisation des mesures : diminution des concentrations des protéines et des volumes injectés. La seule information qui a pu être déduite des expériences réalisées a été que la constante d'équilibre de dissociation était au moins inférieure à  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>. Les quantités de chaleur totale obtenues dans nos conditions opératoires ont permis de calculer des valeurs de variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) de l'ordre de - 24, - 29 et - 48 kcal/mol pour le phénotype Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement. Ces données montrent que la réaction entre l'hémoglobine et le

phénotype Hp 2-2 et est significativement plus exothermique que celle entre l'hémoglobine et les deux autres phénotypes (Figure 23).



**Figure 23 : Courbes de titration des phénotypes d’haptoglobine par l’hémoglobine.**

L’haptoglobine ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) placée dans la cellule de mesure a été titrée par addition de  $3 \mu\text{L}$  d’une solution d’hémoglobine ( $50 \mu\text{mol/L}$ ) placée dans la seringue. L’acquisition des données, le contrôle des instruments ont été réalisées avec le logiciel VP viewer® et l’analyse des données par le logiciel Origin®.

## II. 4. Discussion

L’interaction de l’haptoglobine avec l’hémoglobine a été étudiée par deux approches pour chacun des trois phénotypes d’Hp que nous avons purifié à partir de plasmas humains. La première approche a utilisé une méthode enzymatique basée sur le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb à pH 4,0, grâce à l’analyse des résultats obtenus après incubation d’une concentration fixe de chacun des trois phénotypes en présence de concentrations croissantes d’Hb. Le traitement des données expérimentales relatives à la variation du pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb nous a permis de déterminer des constantes d’équilibre de



dissociation apparentes de  $2,5 \pm 0,5$ ,  $3,0 \pm 0,5$  et  $6,7 \pm 1,0 \cdot 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>, pour Hp1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement. Ces résultats montrent que le phénotype Hp 2-2 a une affinité significativement plus faible pour l'hémoglobine que les phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-1. Les constantes d'équilibre de dissociation ont été déterminées à partir des résultats d'interactions haptoglobine/hémoglobine réalisées à pH acide pour ne mesurer que le pouvoir peroxydasique lié à la formation de complexes Hp-Hb et éviter toute interférence par l'hémoglobine non liée. Cependant, ce pH n'est pas compatible avec un état physiologique. Ainsi, les constantes d'équilibre de dissociation déterminées à pH 4,0 ne peuvent correspondre à des constantes d'équilibre gouvernant l'interaction des deux protéines *in vivo*. Néanmoins, elles peuvent être utilisées pour comparer l'affinité des trois phénotypes d'Hp pour l'hémoglobine *in vitro*. Les valeurs des constantes d'équilibre de dissociation apparentes que nous avons déterminées correspondent à des affinités plus faibles que celles décrites dans la littérature où l'on trouve des valeurs allant de  $10^{-10}$  à  $10^{-16}$  mol.L<sup>-1</sup>, estimées ou déterminées dans des conditions opératoires différentes et avec des méthodes différentes, donc difficilement comparables. A titre d'exemple, Hwang et Greer ont étudié la réaction de fixation de l'Hp avec des chaînes alpha d'Hb par "quenching" de fluorescence. Ils ont déterminé des constantes d'équilibre de dissociation de  $0,6 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, et partant de là, ont estimé que la constante d'équilibre de dissociation du complexe Hp-Hb devrait être de l'ordre  $10^{-15}$  mol.L<sup>-1</sup> à pH 7,4 (Hwang et Greer, 1980). Ces mêmes auteurs avaient auparavant montré que les valeurs des constantes d'équilibre de dissociation de la réaction des chaînes alpha de l'Hb avec l'Hp variaient en fonction du pH d'un facteur de 100 avec un minimum de  $0,16 \cdot 10^{-6}$  à pH 6 et un maximum de  $0,16 \cdot 10^{-4}$  à pH 9,5, en suivant la réaction de fixation d'une chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine avec l'Hp par une méthode de "quenching" de fluorescence (Hwang et Greer, 1979). D'autres auteurs, grâce à une méthode de résonance plasmonique de surface (SPR) utilisant comme appareillage le Biacore®, ont trouvé des constantes de dissociation de

l'ordre  $10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup> (Asleh et coll., 2005). Il découle de ce qui précède que les constantes de dissociation disponibles sont des constantes de dissociation apparentes ; elles dépendent des conditions opératoires utilisées et ne peuvent en aucun cas être comparées. Dans nos conditions (pH acide), l'affinité entre les deux protéines pourrait être abaissée ce qui expliquerait les différences entre les valeurs déterminées et celles de la littérature (Adams et Weiss, 1969).

Ces différences nous ont amené à vouloir confirmer nos résultats obtenus à pH 4,0 par une autre approche que celle basée sur le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'interaction haptoglobine/hémoglobine à pH 4,0 en calorimétrie. Les essais réalisés n'ont pas été concluants car l'hémoglobine à ce pH a été dénaturée (Cassatt et Steinhardt, 1971 ; Elson, 1974 ; Sasazuki et coll., 1974). Cette dénaturation a été caractérisée par un changement de coloration de la solution de titrage et l'absence de pics lors de son injection à la solution d'Hp. La discordance entre l'absence de signal en microcalorimétrie et les résultats que nous avons obtenus par la mesure de l'activité peroxydasique, peut être liés aux conditions expérimentales utilisées. En effet, lors de l'étude du pouvoir peroxydasique des complexes Hp-Hb, l'hémoglobine a été incubée en présence d'Hp à pH 7,5, avant que 100 µL de mélange ne soient transférés dans 1 mL de tampon acétate pH 4,0 pour la mesure de l'activité peroxydasique. Or il a été rapporté que la fixation de l'Hb à l'Hp prévient la dénaturation de l'Hb à pH acide (Adams et Weiss, 1969 ; Elson, 1974 ; Sasazuki et coll., 1974). En microcalorimétrie, il est indispensable que les tampons utilisés pour la solution titrante et la solution titrée soient identiques, mais un pH de 4,0 n'est pas compatible avec la conservation des propriétés biologiques de l'hémoglobine.

L'étude de l'interaction de l'hémoglobine avec l'haptoglobine en microcalorimétrie à pH 7,5 nous a montré que la formation du complexe Hp-Hb était exothermique comme précédemment rapporté par Adams et Weiss (Adams et Weiss, 1969). Cependant, le traitement des données issues de ces expériences n'a pas permis de déterminer des valeurs de constantes d'équilibre de dissociation avec une précision suffisante afin de les comparer avec celles trouvées par la méthode utilisant l'activité peroxydasique du complexe Hp-Hb. En effet, la courbe de titration calorimétrique de l'haptoglobine par l'hémoglobine à pH 7.5 suggère une association pseudo-irréversible entre les deux partenaires, ce qui est incompatible avec une détermination fiable des constantes de dissociation. D'autres essais complémentaires, utilisant différentes conditions opératoires portant sur les concentrations d'Hb, d'Hp et les volumes d'injections, ne nous ont pas permis de réaliser la saturation de l'Hp de manière progressive. L'aspect de ces courbes de titration nous suggèrent cependant que les constantes de dissociation sont au moins inférieures à  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> à pH 7,5.

Après avoir identifié des conditions d'analyses optimales, nous avons pu déterminer la variation de quantité de chaleur au cours de la formation du complexe Hp-Hb pour chaque phénotype d'Hp. La variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) constitue un paramètre thermodynamique de la réaction. En effet, pour des interactions correspondant à de fortes affinités comme celle de la réaction Hp-Hb, la valeur de  $\Delta H$  peut être directement mesurée comme la valeur plafond du profil de variation de quantité de chaleur échangée (Wiseman et coll., 1989 ; Jelesarov et coll., 1996). Dans nos conditions, des variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ) de - 24, - 29 et - 48 kcal/mol ont été déterminées à 25 °C pour les phénotypes Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement. Une étude réalisée avec un microcalorimètre moins performant et basé sur un principe différent avait permis de caractériser l'interaction Hp/Hb par des variations d'enthalpie de l'ordre de - 70, 2 ; - 29,7 et + 7,2 kcal/mol à 37; 20 et 4 °C, respectivement (Adams et Weiss, 1969). Ces

résultats sont cependant difficilement interprétables du fait que ces auteurs avaient utilisé une solution d'haptoglobine correspondant à un mélange des trois phénotypes et que la préparation était de plus de pureté insuffisante. Cependant, ces valeurs de  $\Delta H$  fourniraient des informations quant à la nature des liaisons impliquées dans l'interaction haptoglobine-hémoglobine. En effet, selon ces auteurs les grandes variations de valeurs de  $\Delta H$  observées "militeraient" en faveur de l'implication de liaisons hydrogènes situées dans un environnement hydrophobe (Adams et Weiss, 1969).

Des auteurs qui ont rapporté des constantes de dissociation de l'ordre de  $10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup> (Asleh et coll., 2005) sans indiquer de valeur de  $\Delta H$  de l'interaction Hp-Hb, valeurs en principe accessibles par la technique utilisée (résonance plasmonique de surface). De telles valeurs auraient pu nous permettre de les comparer avec celles que nous avons déterminées, même si les valeurs de  $\Delta H$  issues des techniques différentes doivent être comparées avec prudence. En effet, la résonance plasmonique de surface et la microcalorimétrie sont basées sur des principes différents pour la détermination des paramètres d'interactions moléculaires (Zuber, 1997). L'étude des paramètres thermodynamiques par la résonance plasmonique de surface se fait grâce à la mesure directe à la surface de la phase solide de la progression de l'association entre les macromolécules étudiées. Les constantes de cinétiques  $k_{as}$  et  $k_{dis}$  caractéristiques de cette interaction sont déduites de cette mesure, permettant de calculer la constante d'équilibre de dissociation  $K_d = k_{dis}/k_{as}$ . Estimée à différentes températures, celle-ci permet le calcul des variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et d'enthalpie libre ( $\Delta G$ ) de la réaction. A l'inverse, le signal mesuré par microcalorimétrie est une quantité de chaleur produite ou absorbée par un milieu réactionnel homogène liquide, lorsque la solution titrante est injectée progressivement dans la solution titrée. Les phénomènes pouvant affecter négativement la mesure par la résonance plasmonique de surface concernent principalement les limitations possibles de la cinétique de la réaction par des phénomènes de diffusion. Le transport de masse du réactif en solution vers

l'interface solide-liquide et l'hypothétique renouvellement de la concentration locale du réactif à l'intérieur de la matrice où se déroule la réaction constituent les deux principales limites décrites (Glaser et Hausdorf, 1993 ; Hall et coll., 1996 ; O'shannessy et Winzor, 1996 ; Schuck et Minton, 1996 ; Zuber,1997). En ce qui concerne les mesures réalisées en microcalorimétrie, elles peuvent être affectées par des réactions annexes impliquant par exemple le solvant ou d'autres composés (Naghibi et coll., 1995). Cette technique présente donc le risque de rendre compte non seulement de la réaction étudiée, mais aussi de l'évolution de l'ensemble du milieu réactionnel.

### **III. Conséquences de l'interaction haptoglobine/hémoglobine sur la détermination de l'haptoglobine en biochimie clinique**

L'haptoglobine (Hp) est une protéine de la phase inflammatoire qui présente la propriété de fixer l'hémoglobine (Hb) avec une forte affinité pour former un complexe soluble et stable (McCormick et Atassi, 1990). A ce titre, elle est la protéine majeure du plasma pour la capture de l'hémoglobine libre. L'Hp présente un polymorphisme génétique avec trois phénotypes majeurs : Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2.

Une conséquence de la formation d'un complexe Hp-Hb *in vitro* est l'interférence d'une hémolyse marquée ( $Hb > 1 \text{ g/L}$  dans le plasma) dans les techniques immunonéphélométriques (IN) de mesure de l'Hp, que ce soit en mode point final ou en mode cinétique (Boussuyt et Blanckaert, 1999). Cette interférence a été récemment documentée de manière spécifique pour la mesure IN en mode cinétique avec l'automate Image® (Beckman Coulter) (Zerbani et Giraudeau, 1999), mais avec des concentrations importantes en Hb puisque comprises entre 4 et 14 g/L. Nous avons voulu savoir si une hémolyse légère et non décelable à l'œil nu ( $Hb < 0,3 \text{ g/L}$ ) interférait également dans la mesure IN de l'Hp. Pour ceci, nous avons utilisé le fait

que la coagulation sanguine entraîne une faible hémolyse *in vitro* (Guder et coll., 1996). En pratique, nous avons comparé les concentrations d'Hp déterminées par IN dans les plasmas et sérums d'une même série de patients. Les concentrations d'Hb libre ont par ailleurs été déterminées dans chaque spécimen. De plus, l'influence du phénotype d'Hp dans l'interférence de l'Hb a été évaluée, puisque des différences dans les capacités de fixation en Hb par les phénotypes d'Hp ont été signalées (Javid, 1965 ; Delanghe et coll., 2000). L'étude a été complétée par la vérification que les plasmas héparinés peuvent être utilisés en IN cinétique pour la mesure de l'Hp.

### **III. 1. Matériels et méthodes**

Des sérums et des plasmas ont été préparés à partir de prélèvements sanguins provenant de 27 adultes consentants (12 hommes et 15 femmes dont les âges étaient compris entre 22 et 84 ans). Quelques caractéristiques de ces sujets sont indiquées dans le tableau XII. Les prélèvements sanguins ont été réalisés au pli du coude dans deux tubes S-Monovette® (Sarstedt), l'un sans coagulant et l'autre avec héparinate de lithium. Les spécimens sanguins ont été laissés 30 min à température ambiante avant une centrifugation à 15 °C pendant 10 min à 1500 g. La concentration d'Hp a été déterminée par IN (Image, Beckman Coulter) avec les réactifs du fabricant. Le phénotypage a été réalisé après une préincubation des spécimens avec un excès d'hémoglobine humaine purifiée dans les mêmes conditions que celles décrites dans la partie du mémoire consacrée au phénotypage de l'haptoglobine. L'hémoglobine libre a été déterminée avec un coffret réactif (Sigma Chemicals Co, St Louis, Etats Unis) utilisant la méthode de Standefer (Standefer et Vanderjagt, 1977) et plus précisément en présence de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, avec mesure de l'absorbance à 520 nm sur Uvikon 922 (Kontron Inst). Les comparaisons

statistiques entre les résultats obtenus sur sérums et plasmas ont été réalisées avec le test  $t$  apparié de Student.

## **III. 2. Résultats**

### ***III. 2. 1. Effet de la coagulation sur la concentration d'Hb libre et sur la mesure d'Hp***

Les prélèvements sériques et plasmatiques des 27 adultes ne présentaient pas d'hémolyse visible à la suite d'une inspection visuelle. Les résultats d'Hp obtenus par IN et regroupés dans le tableau XII indiquent que les concentrations sériques d'Hp sont constamment inférieures à celles des plasmas correspondants ( $P < 0,005$ ). Des différences systématiques et significatives ( $P < 0,01$ ) sont aussi observées entre les concentrations sériques et plasmatiques d'Hb (Tableau XII), les concentrations moyennes d'Hb libre étant quatre fois plus élevées dans le sérum que dans le plasma. Cette différence systématique est toutefois affectée d'une variabilité interindividuelle considérable puisque les concentrations sériques rapportées aux concentrations plasmatiques sont comprises entre 1,2 et 16.

### ***III.2. 2. Effet d'une surcharge en Hb sur la mesure de l'haptoglobine***

Nous avons testé l'effet de Hb sur la mesure de la concentration d'Hp réalisée en IN. Pour ceci, un spécimen sérique de chacun des trois phénotypes d'Hp a été surchargé en Hb. Les résultats ont été représentés sur la Figure 24 en prenant en compte la concentration totale d'Hb retrouvée, c'est-à-dire la somme de la concentration déjà présente en Hb libre et celle

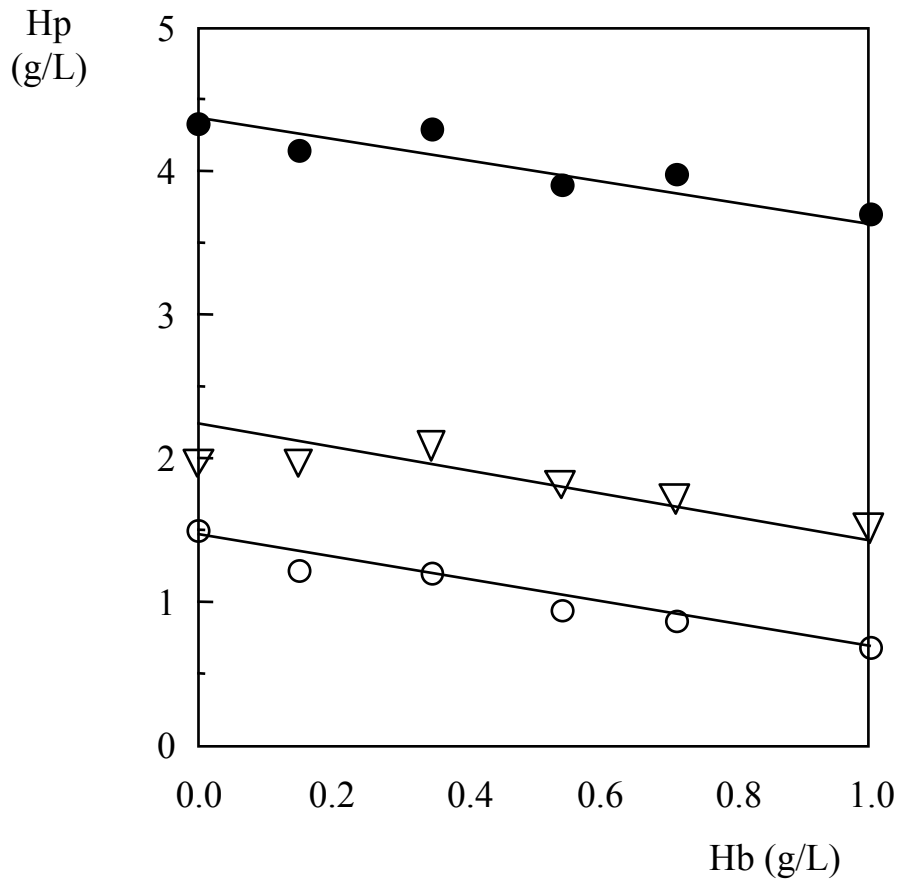
ajoutée lors de la surcharge. Ils montrent que, pour des concentrations d'Hb comprises entre 0 et 1 g/L, on observe une décroissance linéaire de l'Hp mesurée en IN. On note que cette décroissance concerne déjà la zone de concentration en Hb pour laquelle l'hémolyse n'est pas visible à l'œil nu. Cet effet n'a pas été trouvé dépendant du phénotype d'Hp.



**Tableau XII : Concentrations sériques et plasmatiques d'hémoglobine libre et d'haptoglobine chez 27 adultes.**

	Age	Sexe	Phénotype	Se-Hp	Pl-Hp	Se-Hb	Pl-Hb
1	31	F	Hp 1-1	1,17	1,18	0,050	0,030
2	84	M	Hp 1-1	1,53	1,68	0,033	0,013
3	30	F	Hp 1-1	2,84	2,95	0,084	0,008
4	27	F	Hp 1-1	0,91	0,97	0,088	0,021
5	51	F	Hp 2-1	1,32	1,38	0,048	0,007
6	74	M	Hp 2-1	1,48	1,49	0,055	0,006
7	64	M	Hp 2-1	1,13	1,19	0,090	0,045
8	66	M	Hp 2-1	2,30	2,43	0,109	0,038
9	42	M	Hp 2-1	2,91	3,08	0,128	0,014
10	65	M	Hp 2-1	0,75	0,86	0,099	0,018
11	71	M	Hp 2-1	1,21	1,53	0,174	0,011
12	22	M	Hp 2-1	0,73	0,82	0,077	0,006
13	38	F	Hp 2-1	1,60	1,58	0,022	0,001
14	65	M	Hp 2-1	1,70	1,71	0,027	0,022
15	72	F	Hp 2-1	1,75	1,85	0,055	0,016
16	56	F	Hp 2-1	1,11	0,99	0,040	0,026
17	34	F	Hp 2-1	1,22	1,29	0,090	0,042
18	48	F	Hp 2-1	1,37	1,43	0,059	0,008
19	57	F	Hp 2-1	1,70	1,76	0,048	0,017
20	71	F	Hp 2-2	1,72	1,91	0,060	0,023
21	83	F	Hp 2-2	1,44	1,41	0,034	0,004
22	32	M	Hp 2-2	0,53	0,57	0,053	0,014
23	43	F	Hp 2-2	1,07	1,08	0,084	0,015
24	40	M	Hp 2-2	1,61	1,66	0,088	0,022
25	68	F	Hp 2-2	1,75	1,74	0,062	0,012
26	32	M	Hp 2-2	1,70	1,71	0,046	0,017
27	77	F	Hp 2-2	0,66	0,68	0,063	0,018
<b>Moyenne</b>	54			1,46	1,52	0,069	0,017
<b>Ecart type</b>	16			0,52	0,54	0,033	0,015
<b>P</b>					0,005		0,01

Les concentrations d'Hb et d'Hp sont exprimées en g/L, F : féminin ; M : masculin

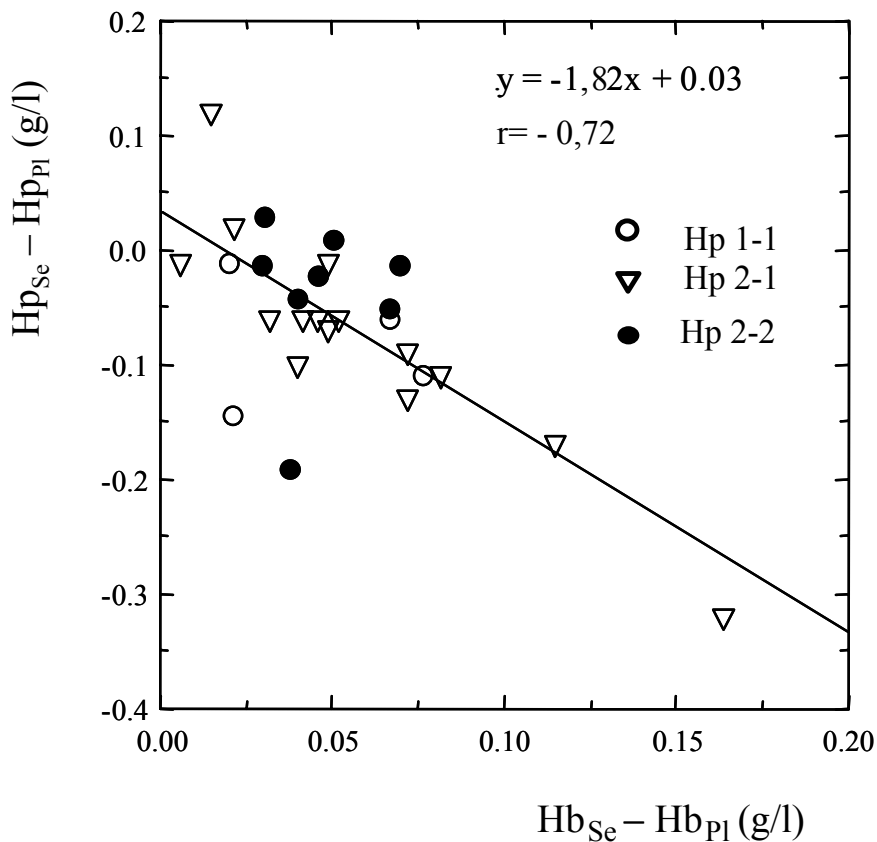


**Figure 24 : Effet d'une surcharge en hémoglobine sur le dosage de l'haptoglobine en immunonéphélométrie selon les phénotypes.**

### **III. 2. 3. Effet du degré d'hémolyse sur la mesure d'Hp**

Une relation inverse lie de manière assez étroite ( $r = -0,72$ ) les différences entre sérum et plasma des 2 paramètres (Hb et Hp). L'équation des moindres carrés est la suivante :

$y = -1,82 x + 0,03$ , avec  $y$  en g/L d'Hp et  $x$  en g/L d'Hb. L'effet de l'hémolyse ne paraît pas être influencé par le phénotype d'Hp (Figure 25). Lorsque les différences entre sérum et plasma des 2 paramètres sont considérées, on n'observe pas de différence significative entre les séries de valeurs constituées selon les trois phénotypes.



**Figure 25 : Relation entre les différences des concentrations sériques (Se) et plasmatiques (Pl) en hémoglobine libre et en haptoglobine.**

#### ***III. 2. 4. Effet de l'héparinate de lithium sur la mesure d'Hp en IN***

Un pool de sérum ne présentant pas d'hémolyse visible a été surchargé avec des concentrations croissantes d'héparinate de lithium. Les concentrations d'Hp retrouvées en IN restent constantes dans l'intervalle 0 à 40 UI/mL d'héparinate (Tableau XIII). Parmi celles-ci, la concentration d'héparinate de 20 UI/ml est celle présente dans les tubes de prélèvement que nous avons employés pour les prélèvements des plasmas de patients.

**Tableau XIII : Effet de l'héparinate de lithium sur la mesure de l'Hp en IN**

Héparinate (UI)/mL	0	10	20	30	40
Hp (g/L)	3,11	3,11	3,09	3,06	3,02

### III. 3. Discussion

Les résultats obtenus en comparant sérums et plasmas montrent que la coagulation entraîne systématiquement une hémolyse légère, ce qui confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs (Guder et coll., 1996 ; Zerbani et Giraudeau, 1999). Ils indiquent aussi que, malgré une standardisation rigoureuse des prélèvements et de la préparation des spécimens, l'importance de l'hémolyse varie considérablement. Bien que cette hémolyse reste limitée et dans tous les cas étudiés non visible à l'œil nu, elle crée une interférence négative lorsque la mesure de Hp est réalisée par IN selon un mode cinétique avec l'appareil Image® sur sérum. Cette observation a été retrouvée après surcharge *in vitro* avec de l'hémoglobine humaine. Elle confirme les données obtenues par d'autres auteurs ayant utilisé des concentrations supérieures en Hb pour trois systèmes analytiques (utilisant l'immunonéphélométrie) provenant de deux fabricants différents (Boussuyt et Blanckert, 1999 ; Zerbani et Giraudeau, 1999). La différence des concentrations plasmatiques d'Hp par rapport aux sérums lorsque mesurées en IN n'est pas liée à une interférence positive créée par l'héparinate de lithium. C'est la raison pour laquelle il devrait être recommandé de mieux maîtriser la phase préanalytique en réalisant la mesure d'Hp par IN sur plasma plutôt que sur sérum. L'erreur moyenne observée par l'hémolyse *in vitro* due à la coagulation (- 5 %) dépasse la variabilité analytique intersérielle du système que nous avons utilisé (précision =

3,8 %) dans la zone des concentrations plasmatiques usuelles en Hp. Il faut toutefois noter que dans notre série, les résultats indiquent aussi que l'erreur due à l'hémolyse peut atteindre 20 %. Les résultats de cette étude montrent aussi que l'interférence de l'Hb est retrouvée pour les trois phénotypes de l'Hp. La question de quantifier l'importance des différences de concentrations d'haptoglobine entre sérum et plasma pour des systèmes analytiques différents reste posée, en particulier quant-à l'influence des anticorps utilisés. En effet, certains auteurs ont montré, mais après surcharge de quantités importantes d'hémoglobine, que l'interférence était dépendante des anticorps (Boussuyt et Blanckert, 1999).

#### **IV. Conclusion**

Au cours de cette partie de mémoire, nous avons étudié l'interaction de l'hémoglobine avec chacun des trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine. Malgré la découverte de l'Hp qui remonte à plus d'une soixantaine d'années, la nature des liaisons impliquées dans son interaction avec l'hémoglobine n'a pas été clairement établie (Nielsen et coll., 2006). En effet, l'interaction Hp/Hb est l'une des plus fortes interactions connues rendant ainsi son étude difficile et les différentes méthodes utilisées pour suivre cette interaction donnent des résultats peu précis du fait de la forte affinité de l'hémoglobine pour l'haptoglobine. Aussi, plusieurs artifices ont été utilisés pour déterminer les paramètres de cette interaction et c'est dans ce contexte que nous avons choisi d'étudier l'interaction de l'haptoglobine avec l'hémoglobine par deux approches. La première a consisté à la détermination des constantes d'équilibre de dissociation grâce à l'utilisation du pouvoir peroxydasique à pH 4,0 du complexe formé. Les constantes de dissociation obtenues à ce pH (certes non compatibles avec des conditions physiologiques), nous ont permis de comparer les affinités de l'hémoglobine avec chaque phénotype d'Hp. A ce pH, les phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-1 se sont révélés capables de fixer

l'hémoglobine avec une affinité significativement plus élevée que le phénotype Hp 2-2. La deuxième approche a utilisé la titration en microcalorimétrie à pH neutre. Les résultats obtenus par cette méthode confirment que les constantes d'équilibre de dissociation de la réaction sont au moins supérieures à  $10^{-8}$  L.mol<sup>-1</sup>. Cette technique nous a également permis de déterminer les variations de quantité globale de chaleur dégagée lors de l'interaction de l'hémoglobine avec chacun des trois phénotypes d'haptoglobine. Les résultats obtenus nous indiquent que la variation d'enthalpie est significativement plus importante lors de la formation du complexe Hb-Hp 2-2 que lors de la formation des complexes Hb-Hp 2-1 et Hb-Hp 1-1. Enfin, nous avons étudié les conséquences de l'interaction Hp-Hb en biologie clinique dans la détermination immunonéphélométrique de l'Hp. Les résultats de cette étude montrent aussi que l'interférence de l'Hb est retrouvée pour les trois phénotypes de l'Hp. La question de quantifier l'importance des différences de concentrations d'haptoglobine entre sérum et plasma pour des systèmes analytiques différents reste posée, en particulier en ce qui concerne l'influence des anticorps utilisés. En effet, certains auteurs ont montré, mais après surcharge avec des quantités importantes d'hémoglobine, que l'interférence était dépendante des anticorps (Boussuyt et Blanckert, 1999). Ces résultats nous conduisent à recommander de déterminer l'Hp sur plasma plutôt que sur sérum, que les dosages soient réalisés pour suivre un phénomène inflammatoire, une hémolyse *in vivo*, ou encore lorsque l'Hp est utilisée comme variable dans des scores multiparamétriques tels que Fibrotest® ou Actitest®.

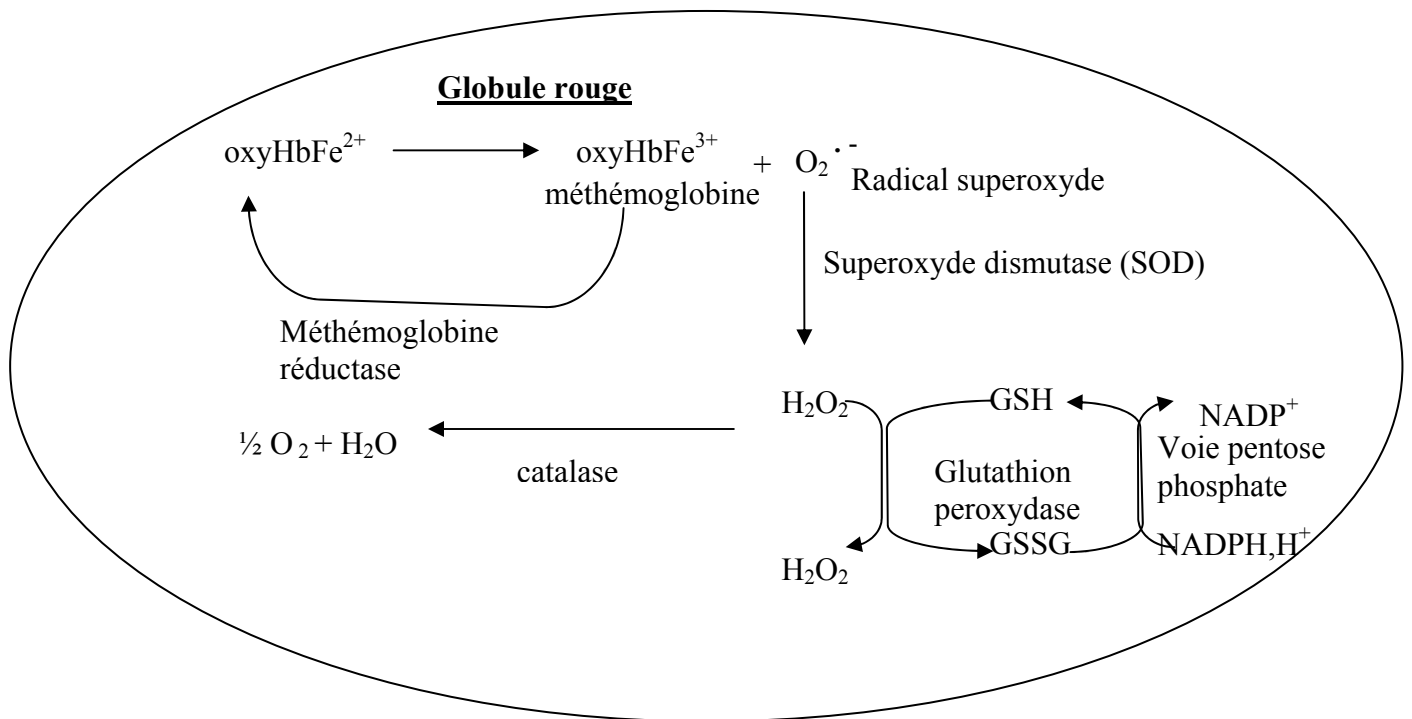
**Cinquième Partie : Stress oxydant induit par l'hémoglobine libre  
sur le globule rouge et effet protecteur des phénotypes de  
l'haptoglobine humaine**

## **I. Introduction**

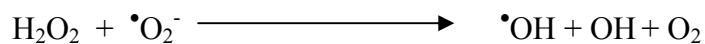
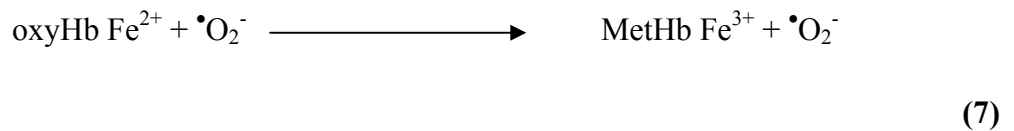
L'hémoglobine est une molécule importante du règne animal avec comme principal rôle de transporter l'oxygène des poumons aux tissus de l'organisme et de transporter le gaz carbonique dans le sens inverse. Cependant, elle peut s'avérer toxique, particulièrement lorsqu'elle est localisée en dehors du globule rouge (Everse et Hsia, 1997 ; Ziouzenkova et coll., 1999 ; Lim et coll., 2001). Dans le globule rouge, l'oxyhémoglobine, par une réaction d'oxydation intramoléculaire spontanée, génère de la méthémoglobine et l'ion superoxyde. La méthémoglobine est incapable de fixer l'oxygène et est rapidement réduite par la méthémoglobine réductase. L'ion superoxyde est quant à lui dismuté en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est à son tour rapidement converti en oxygène et eau par la catalase, ou métabolisé par les glutathion peroxydases (Everse et Hsia, 1997).

En dehors de l'espace intra-érythrocytaire et de son contenu anti-oxydant, le potentiel oxydant de l'hémoglobine s'exprime dans le milieu extracellulaire et a été évoqué en rapport avec d'importantes atteintes cellulaires (Everse et Hsia, 1997 ; Lim et coll., 2001). En effet, l'hémoglobine extra-érythrocytaire peut participer à trois réactions qui peuvent potentiellement contribuer à des dommages tissulaires : l'auto-oxydation de l'hémoglobine, la réaction avec l'eau oxygénée et la liaison avec le NO (Everse et Hsia, 1997 ; Buehler et Alayash, 2004), que nous aborderons successivement. Les deux premières réactions sont résumées dans la Figure 26.

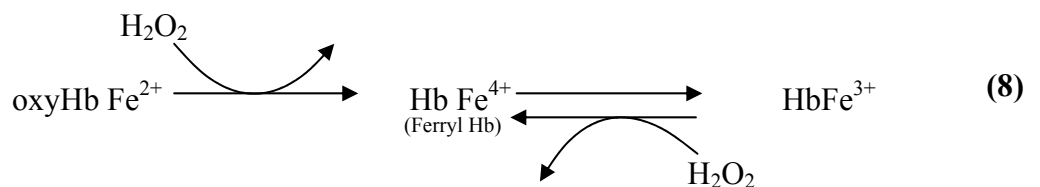




**1 Auto-oxydation de l'hémoglobine**



**2 Réaction de l'oxyhémoglobine avec le peroxyde d'hydrogène**



**Figure 26 : Représentation schématique de l'oxydation et de la réduction de l'hémoglobine dans le globule rouge et dans l'environnement extracellulaire (Lim et coll., 2001).**

## **I. 1. Auto-oxydation de l'hémoglobine**

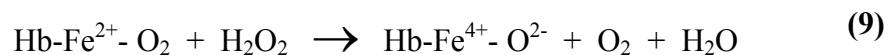
L'auto-oxydation de l'hémoglobine est à l'origine de sa toxicité oxydative. Dans le globule rouge, elle concerne moins de 3 % de l'hémoglobine totale du fait de la présence d'une méthémoglobine réductase. Elle constitue cependant la source majeure de production des radicaux libres dans le globule rouge (Misra et Fridovich, 1972). En dehors du globule rouge (et de son efficace système enzymatique capable de maintenir des taux bas de méthémoglobine et de ferryl-hémoglobine), l'hémoglobine devient un puissant toxique oxydant (Lim et coll., 2001). En effet, la toxicité de l'hémoglobine libre et de son produit de catabolisme, l'hème, est principalement due à sa capacité à médier la production de radicaux hydroxyles ( $\bullet\text{OH}$ ) à travers la libération de fer. En absence de superoxyde dismutase et de catalase, l'oxyhémoglobine extracellulaire subit une oxydation spontanée conduisant à la formation de radicaux superoxydes et de  $\text{Fe}^{3+}$ . Par ailleurs, le fer ferreux ou ferrique de l'hémoglobine peut donner, sous l'action de peroxyde d'hydrogène ou de lipoperoxydes, de la ferryl-hémoglobine (Alaysh, 1999). La ferryl-hémoglobine est un produit hautement toxique qui a un potentiel redox de valeur proche de celle du radical hydroxyle (Alaysh, 1999).

Le radical  $\bullet\text{OH}$  est, lui aussi, un puissant oxydant qui en réagissant avec les acides gras poly-insaturés des phospholipides membranaires peut initier la peroxydation lipidique et éventuellement provoquer des lésions cellulaires (Sadrzadeh et coll., 1984 ; Buehler et Alayash, 2004). Il a été rapporté que l'hémoglobine est capable, en induisant la production de radicaux  $\bullet\text{OH}$ , d'entraîner la peroxydation de l'acide arachidonique ou des lipides de membranes de globules rouges lavées avec production d'un produit terminal de la peroxydation lipidique, le dialdéhyde malonique (MDA). Cet effet est observé même en

présence d'haptoglobine qui fixe l'hémoglobine et d'un chélateur du fer libre, la desferrioxamine (Sadrzadeh et coll., 1984). L'interaction de l'hémoglobine libre avec les membranes cellulaires en relation avec la peroxydation lipidique est bien documentée. Plusieurs études ont montré l'effet toxique de l'hémoglobine libre, dans le cerveau (Xi et coll., 1998), dans l'œil (Abraham et coll., 1998), et dans le système nerveux central (Sadrzadeh et coll., 1987). De même, les interactions oxydatives entre l'hémoglobine et la membrane cellulaire constituent un facteur important dans les mécanismes de destruction des globules rouges sénescents et la survenue de nombreux désordres hémolytiques (Babior, 1981 ; Chiu et coll., 1982).

## **I. 2. Réaction de l'oxyhémoglobine avec l'eau oxygénée**

L'hémoglobine peut réagir avec l'eau oxygénée pour donner de la ferryl-hémoglobine (Giulivi et Davies, 1990) :



La réaction a lieu dans des solutions diluées d'hémoglobine (< 75 µmol/L) en présence d'un excès d'eau oxygénée. La réaction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le fer (Fe<sup>2+</sup>) de l'Hb (oxy-Hb et désoxy-Hb) entraîne la formation de ferryl-Hb ou d'oxoferryl-Hb, respectivement (Winterbourn, 1990 ; Giulivi et Cadenas, 1994). Ces deux produits sont connus comme étant de puissants agents oxydants qui peuvent être à l'origine de dommages cellulaires et tissulaires (Gorbunov et coll., 1995 ; Everse et Hsia, 1997 ; Goldmann et coll., 1998).

### **I. 3. Liaison de l'hémoglobine avec le NO**

Le NO a été identifié comme le principal facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF) (Griffith et coll., 1984). L'activité vasoconstrictrice de l'hémoglobine a été largement documentée et a été attribuée en grande partie à sa capacité à fixer du NO et à limiter ainsi son effet biologique qui peut être étudié à travers la relaxation du muscle vasculaire lisse (Thompson et coll., 1994). En effet, le NO réagit avec l'oxyhémoglobine *in vitro* quasi-instantanément avec une vitesse 250 fois plus élevée qu'avec l'hémoglobine intracellulaire (Kelm et coll., 1988 ; Lim, 2001). Des études ont montré que l'Hb extracellulaire inhibait en partie la vasodilatation dépendante de l'endothélium par une interaction chimique directe avec le NO (Martin et coll., 1985 ; Collins et coll., 1993). L'effet vasoconstricteur observé pourrait être expliqué par une augmentation de la synthèse de composés "prostaglandines-like" comme les F<sub>2</sub>-isoprostanes, en réponse à la peroxydation lipidique initiée par l'Hb libre ou par ses métabolites (Cracowski et coll., 2000 ; Lim et coll., 2001).

## **II. Contexte et objectifs de l'étude**

Dans toutes les situations où de l'hémoglobine se retrouve en grande quantité libre dans l'organisme (malaria, allergie, transfusion sanguine, ...), des effets néfastes peuvent s'observer par la production de radicaux libres qui peut générer un stress oxydant. Le stress oxydant médié par l'Hb extracellulaire est significatif *in vivo*, particulièrement lors de certaines circonstances pathologiques (traumatismes, ischémie-reperfusion) dans lesquelles des quantités élevées de substances oxydantes endogènes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et •O<sub>2</sub><sup>-</sup>) sont produites (Bonfont-Rousselot et coll., 2003 ; Buehler et Alayash, 2004). L'organisme dispose d'un

ensemble de systèmes pour lutter contre ces effets, qui hélas sont dans certaines conditions dépassés.

L'haptoglobine est un anti-oxydant du fait de sa capacité à prévenir les dommages oxydants dus à l'hémoglobine. On distingue trois phénotypes majeurs qui sont présentés comme ayant des affinités et des capacités de fixation de l'hémoglobine différentes, donc susceptibles de débarrasser l'organisme de l'hémoglobine avec une efficacité différente. La discussion de l'influence du polymorphisme de l'haptoglobine sur la production de radicaux libres par l'hémoglobine extra-cellulaire a été posée (Delanghe. Et coll.,1996 ; Melamed-Frank et coll., 2001 ; Vlierberghe et coll., 2004).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets délétères de l'hémoglobine extra-érythrocytaire et à l'action protectrice des phénotypes d'haptoglobine. En effet, il a été rapporté récemment des différences de protection inter-phénotypes vis-à-vis de l'oxydation de micelles d'acides gras par l'hémoglobine (Frank-Melamed et coll., 2001). Les travaux que nous avons réalisés ont été consacrés aux effets *in vitro* de l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur les membranes du globule rouge et à l'action protectrice des trois phénotypes majeurs de l'haptoglobine sur deux modèles différents.

Le premier système a utilisé des préparations de membranes de globules rouges, avec suivi de la peroxydation lipidique par la formation de diènes conjugués (produit intermédiaire d'oxydation) et des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) (produit final de dégradation) décrits comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Sadrzadeh et coll., 1984 ; Gutteridge, 1987 ; Melamed-Franck et coll., 2001). Le deuxième modèle a utilisé des globules rouges intacts, maintenus dans un milieu de conservation (Sodium-Adénine-Glucose-Mannitol, SAGM), avec suivi du potassium et de l'activité lactate déshydrogénase

libérés comme marqueurs d'atteinte de l'intégrité membranaire. L'effet protecteur de chacun des trois phénotypes de l'haptoglobine vis-à-vis du stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire a été étudié sur ces deux modèles, en absence ou en présence d'un chélateur du fer (la desferrioxamine), pour séparer les effets liés à l'hémoglobine de ceux dus au fer.

### **III. Matériels et Méthodes**

#### **III. 1. Préparation et quantification de l'haptoglobine**

Le phénotypage et la purification des phénotypes d'Hp ont été réalisés selon le mode opératoire décrit dans la troisième partie de ce mémoire. Les concentrations massiques de chaque phénotype d'Hp ont été déterminées par immunonéphélométrie en mode cinétique avec l'automate Image® (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), puis transformées en concentrations molaires en utilisant les masses molaires apparentes déterminées par gel filtration. Les concentrations molaires ainsi déterminées ont été vérifiées par des mesures effectuées à 280 nm en utilisant les coefficients d'absorbance molaire déterminés par Rademacher et Steele (Rademacher et Steele, 1987), c'est-à-dire 10,2, 11,8, et 13,3 x 10<sup>4</sup> L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour Hp 1-1, Hp 2-1, et Hp 2-2, respectivement.

### **III. 2. Isolement des globules rouges conservés dans une solution SAGM**

La solution SAGM est une solution généralement utilisée pour la conservation des globules rouges en transfusion érythrocytaire humaine. En effet, il est actuellement de règle d'intégrer l'addition d'une solution de conservation à la préparation des concentrés de globules rouges (CGR), dont le but est de minimiser les lésions de stockage des globules rouges et d'allonger ainsi la durée de conservation. En France, il s'agit habituellement de la solution SAGM (pour Saline, Adénine, Glucose, Mannitol) qui permet de conserver les concentrés de globules rouges pendant 42 jours. Elle est composée d'une solution de chlorure de sodium additionnée d'adénine, de glucose et de mannitol, permettant une conservation prolongée des globules rouges dans des conditions optimales et validées. En effet, cette solution permet d'apporter aux globules rouges, dans des conditions isotoniques, l'énergie et les nutriments nécessaires à la préservation de leur intégrité (Lenfant et coll., 2004). Ainsi, la fonction des hématies est conservée *ex vivo* et le taux d'hémolyse est réduit à moins de 0,8 % de la masse érythrocytaire initiale, au moment de la péremption des concentrés de globules rouges (Lenfant et coll., 2004).

#### ***III. 2. 1. Composition de la solution Sodium Adénine Glucose Mannitol (SAGM):***

- 4,385 g de NaCl
- 84,5 mg d'adénine
- 4,5 g de glucose
- 2,625 g de mannitol
- eau bidistillée q.s.p 500 mL.

L'isotonie de la solution ainsi préparée a été vérifiée en mesurant son osmolarité grâce à un osmomètre automatique MarK3® (Fiske Associates, Norwood, Massachusetts, USA).

### ***III. 2. Préparation des globules rouges en suspension dans la solution SAGM***

Après ponction veineuse chez 10 volontaires sains, des échantillons de 5 mL de sang total ont été recueillis sur héparinate de lithium et ont été immédiatement centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant (plasma et couche de globules blancs), les culots de globules rouges ont été lavés 3 fois avec du sérum physiologique (NaCl 9 g/L), puis mélangés. La procédure de lavage a été répétée une fois avant que le culot ne soit repris par la solution SAGM et lavé trois fois dans cette même solution. La suspension de globules rouges ainsi obtenue (hématocrite de 0,50) a été soumise à une agitation douce et a été immédiatement utilisée.

### **III. 3. Préparation de membranes de globules rouges**

Les membranes de globules rouges ont été préparées selon la méthode de Hanahan et Ekholm (Hanahan et Ekholm, 1974).

#### ***III. 3. 1. Réactifs***

\* Solution tampon isotonique Tris/HCl 0,172 mol/L, pH 7,6.



\* Solution tampon hypotonique Tris/HCl 20 mmol/L, pH 7,6.

### ***III. 3. 2. Collecte de sang et lavage des globules rouges***

Du sang a été prélevé sur tube hépariné et centrifugé immédiatement dans les mêmes tubes à 1000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Le plasma et la couche de globules blancs ont été enlevés par aspiration et les érythrocytes ont été repris avec le tampon Tris/HCl 0,172 mol/L pH 7,6.

Après mélange par retournement, l'échantillon a été centrifugé à nouveau à 1000 g pendant 30 minutes à 4 °C, le surnageant a été enlevé, ainsi que la couche superficielle de globules rouges. Le lavage a été répété 2 fois.

La suspension de cellules dans la solution isotonique Tris/HCl 0,172 mol/L, pH 7,6 a été amenée à un hématocrite de 50 %, transférée dans un tube en propylène de 50 mL et mélangée par retournement avant d'être répartie en aliquots de 5 mL.

### ***III. 3. 3. Préparation des membranes***

A 5 mL de la suspension de cellules à 50 %, ont été ajoutés 30 mL d'une solution hypotonique Tris/HCl 20 mmol/L pH 7,6. La suspension a été laissée à la température ambiante pendant approximativement 5 minutes puis centrifugée à 20 000 g pendant 40 min à 4 °C. Après centrifugation, le surnageant a été décanté en évitant d'entraîner des membranes, puis à nouveau 30 mL de solution tampon hypotonique ont été ajoutés avant une nouvelle centrifugation à 20 000 g à 4 °C. Un total de 4 lavages a été nécessaire pour que les membranes soient dépourvues de toute trace visible d'hémoglobine.

### ***III. 3. 4. Dosage des protéines membranaires***

Après solubilisation, les protéines membranaires ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) dans les conditions suivantes : à 50  $\mu$ L de soude 1 mol/L ont été ajoutés 20  $\mu$ L de suspension de membranes puis, après solubilisation, 1 mL de réactif au bleu de Coomassie. Après 5 min d'incubation à la température ambiante, la lecture de l'absorbance a été réalisée à 595 nm au spectrophotomètre (Kontron Inst, Montigny le Bretonneux, France) contre un blanc réactif. Une droite d'étalonnage a été réalisée avec des solutions de concentrations croissantes d'albumine bovine.

### **III. 4. Marqueurs de peroxydation lipidique membranaire**

Les diènes et les TBARS ont été déterminés sur des membranes de globules rouges préalablement incubées avec de l'Hb humaine, pour évaluer la peroxydation lipidique. La solution d'hémoglobine humaine a été préparée à une concentration de 0,5 mmol/L dans une solution tampon Tris/HCl 50 mmol/L, pH 6,5. Pour les manipulations réalisées en présence d'Hp, celle-ci a été diluée dans le même tampon.

#### ***III. 4. 1. Détermination des diènes***

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer les conditions opératoires optimales permettant de comparer les différents phénotypes d'Hp. Pour cela, la production de diènes a été quantifiée en présence de concentrations croissantes d'hémoglobine et la plus

faible concentration d'Hb permettant d'atteindre le plateau a été choisie pour les expériences ultérieures.

La détermination des diènes a été réalisée selon la méthode de Melamed-Franck modifiée (Melamed-Franck et coll., 2001). A 100  $\mu$ L d'une suspension de membranes (0,3 g/L de protéines totales, concentration finale), ont été ajoutés 3  $\mu$ L de la solution stock d'Hb 0,5 mmol/L, un volume de chaque phénotype d'Hp pour avoir la concentration finale désirée et un volume de tampon supplémentaire pour avoir un volume réactionnel final de 1 mL. Tous les réactifs exceptés l'hémoglobine ont été ajoutés directement dans une cuvette en quartz, mélangés par retournement et pré-incubés à 37 °C. La solution d'hémoglobine a été ajoutée comme réactif déclenchant.

La formation des diènes conjugués au niveau des membranes de globules rouges a été mesurée par suivi de l'augmentation de l'absorbance à 234 nm pendant 60 min à 37 °C au spectrophotomètre Uvikon 922 (Kontron Inst, Montigny le Bretonneux, France). Toutes les expériences ont été réalisées en double.

Les variations d'absorbance pour les expériences réalisées en absence d'Hp ont été prises comme valeur de référence correspondant à 100 % et les changements d'absorbance pour chaque concentration d'Hp ont été déterminés par rapport à cette valeur de référence et exprimés en pourcentage d'oxydation résiduelle.

### ***III. 4. 2. Détermination des TBARS***

Comme pour les diènes, des expériences préliminaires ont été réalisées pour déterminer les conditions opératoires optimales pour comparer les trois phénotypes majeurs d'Hp. Pour cela, les membranes de globules rouges ont été incubées avec des concentrations variables d'Hb, et

la plus faible concentration permettant d'atteindre le plateau a été choisie pour les expériences ultérieures.

L'évaluation de la peroxydation lipidique par la détermination des TBARS formés dans les membranes de globules rouges a été réalisée selon la méthode de Gutteridge (Gutteridge, 1987) et les mesures ont été réalisées par spectrofluorimétrie sur un spectrofluorimètre SFM 25 (Kontron Inst, Montigny le Bretonneux, France).

Les membranes de globules rouges (0,3 g/L de protéines membranaires, concentration finale) ont été incubées pendant 4 h à 37 °C en présence de 6 µmol/L d'Hb (concentration finale) et 10 µmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des concentrations variables de chaque phénotype d'Hp ont été ajoutées au milieu réactionnel. Les valeurs obtenues avec les expériences réalisées en absence d'Hp ont été prises comme correspondant à 100 % et celles obtenues à différentes concentrations d'Hp ont été exprimées en pourcentage de peroxydation résiduelle.

### **III. 5. Marqueurs d'altération de la perméabilité des membranes de globules rouges**

Des aliquots de globules rouges intacts (globules rouges dans SAGM, hématocrite 0,50 ) ont été incubés avec des concentrations variables d'Hb à la température ambiante sous une douce agitation, afin d'identifier les conditions opératoires optimales. A chaque fois, le potassium (K<sup>+</sup>), la lactate déshydrogénase (LDH) et le pH ont été mesurés dans le surnageant après différents temps d'incubation.

Le K<sup>+</sup> a été déterminé par potentiométrie sur un automate Synchron CX5 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), l'activité de la LDH par spectrophotométrie à 37 °C avec des réactifs

provenant de Roche-Diagnostics (Mannheim, Allemagne) et le pH a été mesuré avec un M240 pH meter (Radiometer, Copenhague, Danemark).

Les aliquots de globules rouges ont été incubés en présence d'Hb à la concentration optimale de 5,4  $\mu\text{mol/L}$  (déterminée préalablement) et de chacun des 3 phénotypes d'Hp (5,4  $\mu\text{mol/L}$ , concentration finale). Les expériences ont été réalisées en présence ou en absence de desferrioxamine (10  $\mu\text{mol/L}$ , concentration finale). Les résultats obtenus en absence d'Hp et de desferrioxamine ont été pris comme valeurs de référence et les pourcentage d'inhibition de la libération du  $\text{K}^+$ , et de la LDH ont été déterminés à chaque concentration d'Hp.

### **III. 6. Statistiques**

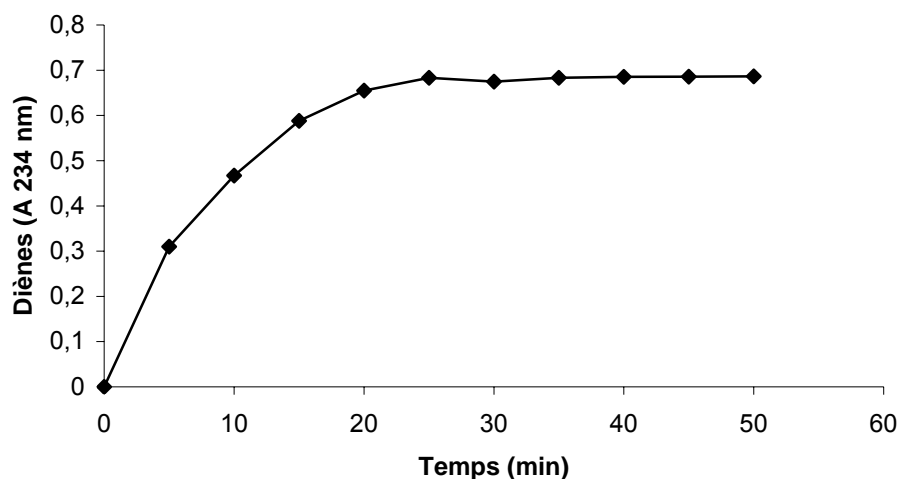
Nous avons réalisé une analyse de variance (ANOVA) pour comparer les effets des 3 phénotypes d'Hp à chaque concentration utilisée. Lorsque les différences se sont avérées significatives d'après ANOVA, un test de Bonferroni, procédure de comparaisons multiples, a été réalisé pour localiser ces différences. Une valeur de P inférieure à 0.05 a été considérée comme significative.

## **IV. Résultats**

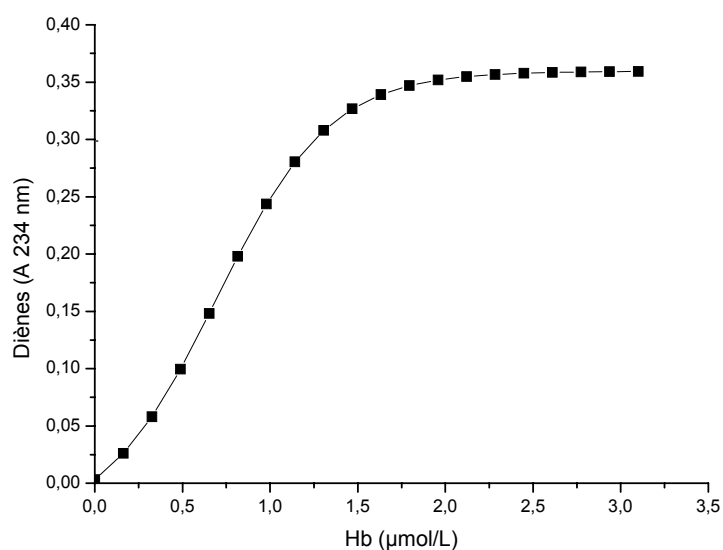
### **IV. 1. Effet de l'haptoglobine sur la peroxydation lipidique des membranes de globules rouges évaluée par la formation des diènes**

#### ***IV. 1. 1. Détermination des conditions optimales d'étude***

Des expériences préliminaires ont été réalisées pour identifier les conditions optimales permettant de comparer l'effet protecteur des 3 phénotypes d'Hp vis-à-vis de la peroxydation lipidique induite par l'Hb sur les membranes de globules rouges. L'effet protecteur a été évalué par le suivi de la formation des diènes conjugués. En effet, au cours d'expériences préliminaires, nous avons observé que l'Hb induisait la formation de diènes conjugués (27). Dans nos conditions (protéines membranaires 0,3 g/L), la formation de diènes conjugués a augmenté en fonction du temps pour atteindre un plateau au bout de 20 min. Ainsi, nous avons choisi de faire les mesures ultérieures durant 60 min avec une lecture toutes les 5 min. De plus, la formation des diènes conjugués a été trouvée être dépendante des concentrations d'Hb jusqu'à la concentration de 2,3  $\mu\text{mol/L}$  (Figure 27). Par conséquent, les conditions optimales de 2,5  $\mu\text{mol/L}$  d'Hb en présence de 0,3 g/L de protéines membranaires ont été choisies pour comparer l'effet protecteur des 3 phénotypes majeurs d'Hp contre le stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire, évalué par la formation des diènes conjugués.



**Figure 27 : Oxydation des lipides membranaires par l'hémoglobine suivie par la formation des diènes conjugués.** La peroxydation lipidique a été initiée au niveau des membranes de globules rouges (protéines membranaires 0,3 g/L) par addition d'hémoglobine (2,5  $\mu\text{mol/L}$ , concentration finale). Les diènes conjugués ( $A_{234\text{ nm}}$ ) ont été mesurés à pH 6,5, 37 °C par le suivi de la variation d'absorbance pendant 60 min à 37 °C avec une lecture toutes les 5 min.



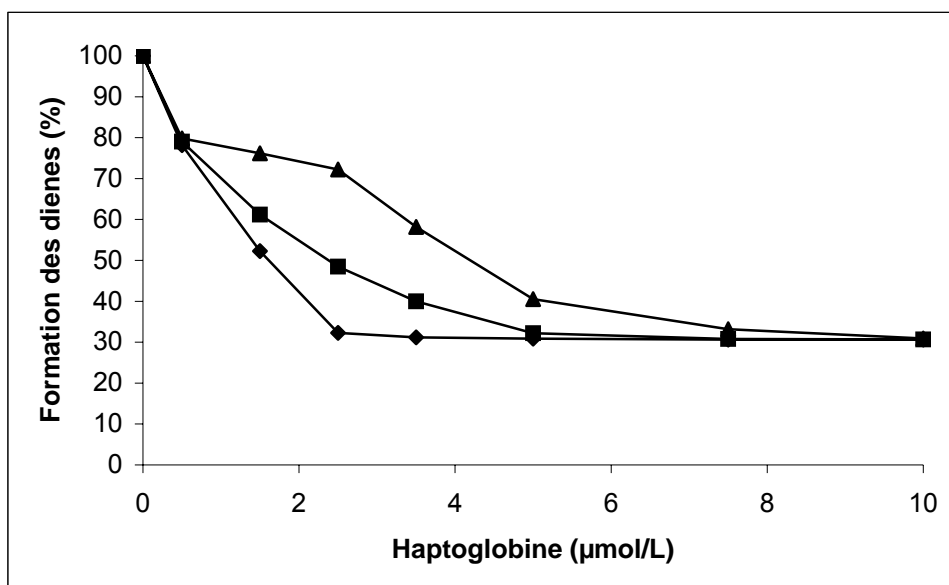
**Figure 28 : Influence de la concentration d'hémoglobine sur la formation des diènes conjugués.** Les membranes de globules rouges (0,3 g/L, protéines membranaires) ont été incubées à 37 °C avec des concentrations croissantes d'Hb. Les variations d'absorbance ont été mesurées pendant 60 min avec une lecture toutes les 5 min.

#### ***IV. 1. 2. Effet protecteur des phénotypes d'Hp***

Les résultats de l'incubation des membranes de globules rouges (0,3 g/L) à 37 °C avec de l'hémoglobine humaine (2,5 µmol/L) en présence de concentrations variables de chaque phénotype d'Hp ont montré que la formation des diènes conjugués est inhibée de manière significative par l'Hp ( $P < 0,05$ ) (Figure 29). Pour des concentrations d'Hp comprises entre 1,5 µmol/L et 3,5 µmol/L, le phénotype Hp 1-1 a inhibé plus fortement la formation des diènes conjugués que le phénotype Hp 2-1, qui a été lui même plus efficace que le phénotype Hp 2-2 ( $P < 0,05$ ).

A la concentration de 5 µmol/L d'Hp, la protection conférée par le phénotype Hp 2-1 a rejoint celle observée pour le phénotype Hp 1-1, mais restait significativement plus importante que celle du phénotype 2-2 ( $P < 0,01$ ). Pour des concentrations supérieures à 7,5 µmol/L, un même degré de protection (70 % d'inhibition) a été retrouvé quel que soit le phénotype considéré.





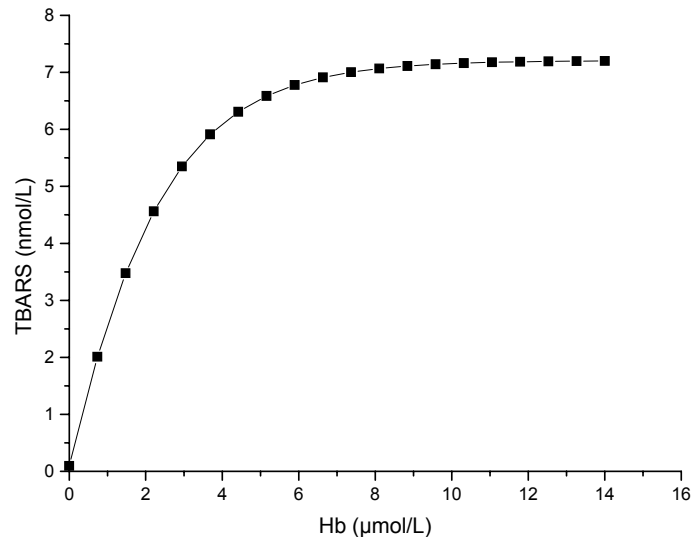
**Figure 29 : Effet protecteur des phénotypes d’Hp sur la formation des diènes conjugués induite par l’Hb sur des membranes de globules rouges.** Les membranes de globules rouges (0,3 g/L de protéines) ont été incubées avec de l’Hb (2,5 µmol/L) en présence d’un phénotype d’Hp : Hp 1-1 (◆), Hp 2-1 (■) et Hp 2-2 (▲). La formation des diènes conjugués au niveau des membranes de globules rouges a été mesurée par suivi du changement de l’absorbance à 234 nm pendant 60 min à 37 °C. Chaque point représente la moyenne de 2 expériences, la différence entre les valeurs étant inférieure à 1 %. Les variations d’absorbance pour les expériences réalisées en absence d’Hp ont été prises comme valeur de référence correspondant à 100 % et les variations d’absorbance à chaque concentration d’Hp ont été déterminées par rapport à cette valeur de référence et exprimé en pourcentage d’oxydation résiduelle.

## IV. 2. Effets de l’haptoglobine sur la peroxydation lipidique des membranes de globules rouges évaluée par la formation des TBARS

### IV 2. 1. Détermination des conditions optimales d’étude

Des expériences préliminaires ont été réalisées dans le but d’identifier les conditions optimales pour comparer les 3 phénotypes d’Hp. Elles ont montré que l’Hb induisait la formation de TARS. Dans nos conditions (protéines membranaires 0,3 g/L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µmol/L), la formation de TBARS s’est révélée être dépendante de l’Hb jusqu’à la concentration de 5 µmol/L, (Figure 30). Par conséquent, les conditions optimales de 6 µmol/L d’Hb en

présence de 0,3 g/L de protéines membranaires ont été choisies pour comparer l'effet protecteur des 3 phénotypes majeurs d'Hp par le suivi des TBARS.

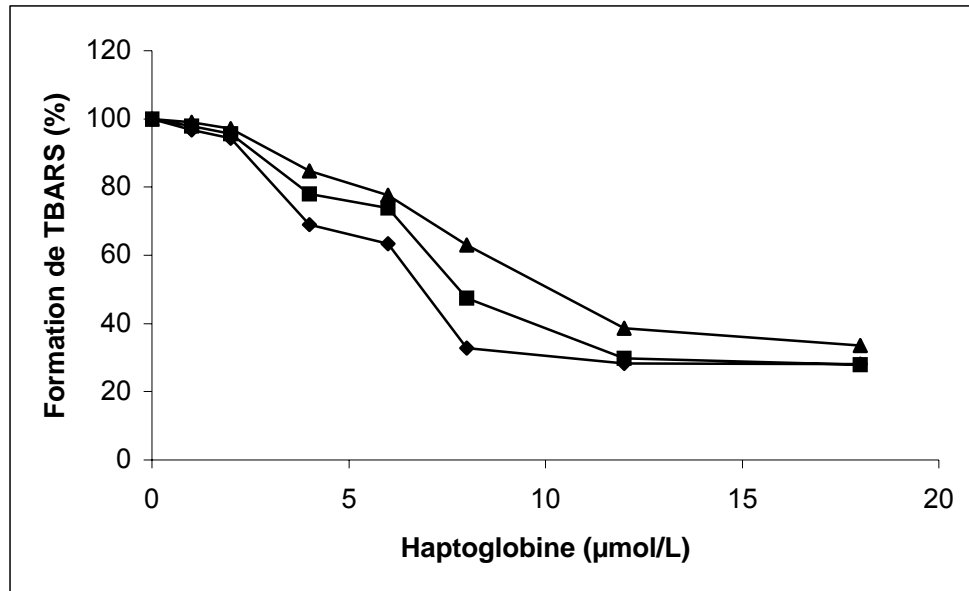


**Figure 30 : Influence de la concentration d'Hb sur la formation des TBARS.** Les membranes de globules rouges (0,3 g/L) ont été incubées à 37 °C avec du peroxyde d'hydrogène (10 µmol/L) et des concentrations croissantes d'Hb pendant 4 h. Le dosage des TBARS a été réalisé par spectrofluorimétrie.

#### *IV. 2. 2. Effet protecteur des phénotypes d'Hp*

Nous avons montré que l'Hb induisait la formation de TBARS sur des membranes de globules rouges incubées à 37 °C en présence de peroxyde d'hydrogène et que l'Hp inhibait la formation de TBARS de manière significative ( $P < 0,05$ ), quel que soit le phénotype considéré (Figure 31). Cette inhibition a été trouvée dépendante des concentrations d'Hp pour des valeurs comprises entre 2 et 12 µmol/L, mais également dépendante du phénotype pour des concentrations d'Hp comprises entre 4 et 12 µmol/L. Dans cet intervalle de concentrations, le phénotype 1-1 a été trouvé plus protecteur que le phénotype 2-1, qui lui-même a été plus efficace que le phénotype 2-2 ( $P < 0,05$ ).

En présence d'un excès d'Hp (concentrations supérieures à 18  $\mu\text{mol/L}$ ), un degré de protection similaire (70 % d'inhibition) a été retrouvé quel que soit le phénotype considéré.



**Figure 31 : Effet protecteur des phénotypes d'Hp sur la formation des TBARS induite par l'hémoglobine sur des membranes de globules rouges.** Les membranes de globules rouges (0,3 g/L de protéines membranaires) ont été incubées avec de l'hémoglobine (6  $\mu\text{mol/L}$ ), du peroxyde d'hydrogène (10  $\mu\text{mol/L}$ ) en absence d'Hp (correspondant à 100 %) ou en présence d'un des phénotypes d'Hp : Hp 1-1 (◆), Hp 2-1(■) et Hp 2-2 (▲) à différentes concentrations pendant 4 h à 37 °C. Les différences entre les trois phénotypes ont été trouvées statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ).

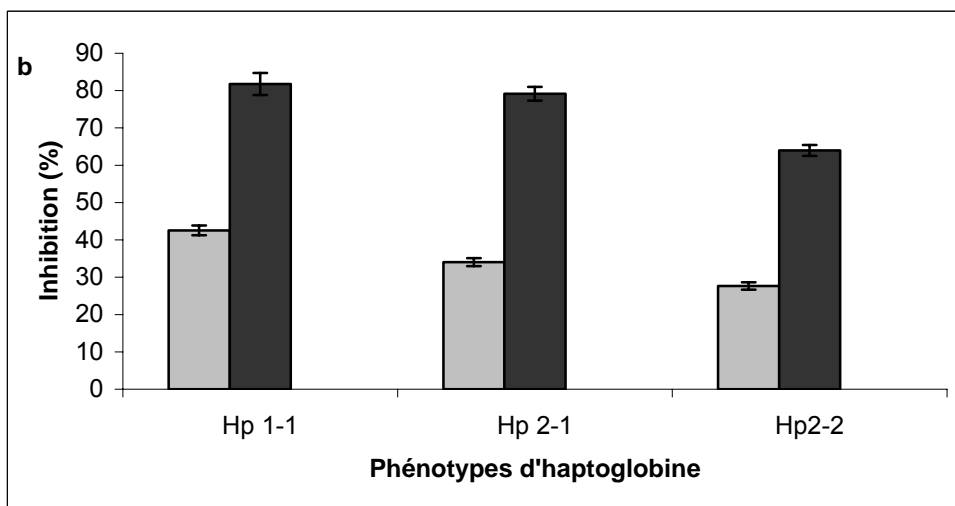
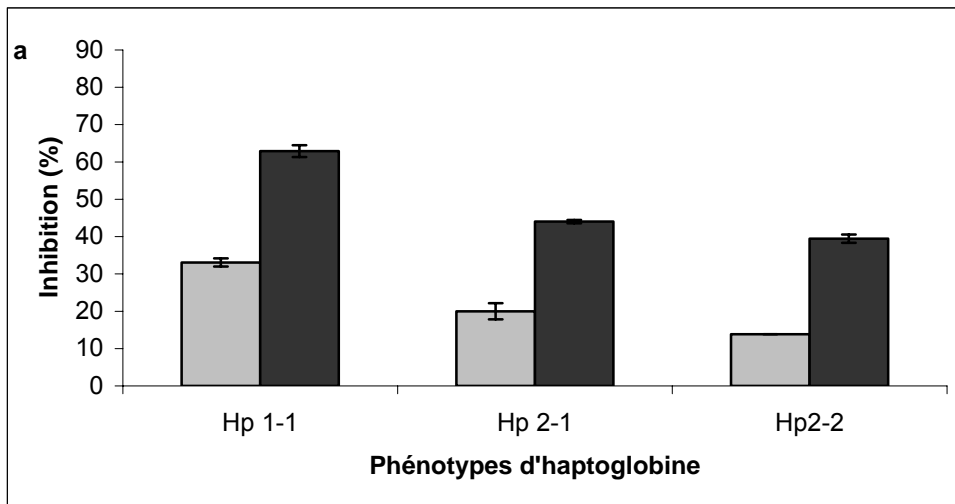
#### IV. 3. Effet de l'haptoglobine sur la perméabilité membranaire des globules rouges conservés dans une solution de conservation (SAGM)

Les changements de la perméabilité membranaire des globules rouges ont été étudiés par le suivi de la libération de  $\text{K}^+$  et de LDH, ainsi que par les variations du pH du milieu extracellulaire. En effet, au cours d'expériences préliminaires, nous avons remarqué qu'en présence de différentes concentrations d'Hb, la libération de  $\text{K}^+$  et de LDH augmentaient lentement mais de façon régulière pendant au moins 24 h. Cette augmentation s'accompagnait

d'une diminution du pH du milieu extracellulaire. Ainsi, nous avons choisi un temps d'incubation optimal de 15 h avec une concentration optimale d'Hb de 5,4  $\mu\text{mol/L}$  (concentration finale) pour les expériences ultérieures.

Les résultats obtenus ont montré que l'addition d'Hp inhibait de manière significative la libération de  $\text{K}^+$  et de LDH, quel que soit le phénotype considéré ( $P < 0,001$ ). Cet effet protecteur a été trouvé plus marqué pour le phénotype Hp 1-1 que pour le phénotype Hp 2-1, le phénotype Hp 2-2 étant le moins efficace (Figure 32a). Les différences de protection entre les phénotypes ont été trouvées significatives ( $P < 0,001$ ). Les résultats ont également montré que l'effet protecteur conféré par l'Hp ne permettait pas d'inhiber totalement les effets délétères de l'Hb. Par ailleurs, les effets protecteurs ont été trouvés plus prononcés en suivant les variations de LDH par rapport à celles du  $\text{K}^+$ . En ce qui concerne le pH du milieu extracellulaire, celui-ci est passé d'une valeur moyenne de 7,37 à une valeur de 7,07 après 15 h d'incubation en présence d'hémoglobine. Les valeurs observées en présence d'Hp étaient de 7,26, 7,12 et 7,14 pour les phénotypes Hp 1-1, Hp 2-1 et Hp 2-2, respectivement. L'analyse de ces valeurs n'a pas montré de différences significatives entre les phénotypes.

L'addition de desferrioxamine dans le milieu d'incubation a amélioré l'effet protecteur observé avec l'Hp seule. Cette amélioration a été significative, aussi bien en observant les résultats obtenus pour la LDH ( $P < 0,01$ ) que pour le  $\text{K}^+$  ( $P < 0,05$ ). Le gain de protection observé en présence desferrioxamine vis-à-vis de la libération de ces deux constituants cellulaires en présence du phénotype Hp 2-2 a été plus marquée en comparaison avec le phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-1 (Figure 32b).



**Figure 32 : Inhibition de la libération de K<sup>+</sup> et de LDH par les globules rouges.**

Les globules rouges ont été incubés à température ambiante sous une agitation douce avec de l'Hb (5.4 μmol/L). Les pourcentages d'inhibition de la libération de K<sup>+</sup> (■) et de LDH (■) ont été déterminés : **a.** en présence Hp (5.4 μmol/L) ; **b.** en présence d'Hp (5.4 μmol/L) et de desferrioxamine (10 μmol/L).

## V. Discussion

Nos résultats, en rapport avec le stress oxydant induit par l'hémoglobine libre sur le globule rouge, ont été obtenus à partir de 2 modèles. Le premier modèle a utilisé des membranes de globules rouges incubées avec une concentration optimale d'hémoglobine en terme de stress oxydant, afin de comparer les capacités anti-oxydantes des 3 phénotypes majeurs d'Hp avec comme critères d'appréciation de la peroxydation lipidique : la production des diènes et celle des TBARS. Le deuxième modèle a consisté à l'utilisation de globules rouges lavés et maintenus dans une solution de conservation (SAGM) avec suivi du  $K^+$ , de la LDH et du pH comme marqueurs de l'atteinte de l'intégrité membranaire.

Les résultats obtenus avec le premier modèle (membranes de globules rouges) confirment que l'hémoglobine induit la production de diènes et de TBARS, qui sont connus comme des marqueurs de la peroxydation lipidique (Sadzadeh et coll., 1984 ; Gutteridge, 1987 ; Melamed-Frank et coll., 2001). Cet effet est observé *in vitro* avec des faibles concentrations en Hb, correspondant à une légère hémolyse (Guder et coll., 1996). Les résultats obtenus avec les 2 marqueurs montrent que l'Hp possède une activité anti-oxydante, même à des concentrations beaucoup plus faibles que celles observées chez les sujets sains. De plus cet effet s'est révélé dépendant du phénotype d'Hp. Les résultats montrent également que l'activité anti-oxydante du phénotype Hp 1-1 est plus élevée que celle du phénotype Hp 2-1, qui elle même l'est plus que celle du phénotype Hp 2-2 aux concentrations testées. Ces différences d'activité anti-oxydante ont été signalées par d'autres auteurs qui ont utilisé des modèles différents (Javid, 1965 ; Wassel, 2000 ; Melamed-Franck et coll., 2001 ; Tseng et coll., 2004b). Par exemple, Melamed-Franck et coll. ont montré *in vitro* que l'Hp était capable d'inhiber la peroxydation lipidique induite par l'Hb sur des micelles d'acides gras (acide

linoléique) et sur des lipoprotéines (LDL) (Melamed-Franck et coll., 2001). Ces auteurs ont également montré que cette action anti-oxydante était dépendante du phénotype, et que le phénotype Hp 1-1 était plus efficace que le phénotype Hp 2-2 lorsque l'inhibition de la peroxydation lipidique a été évaluée par le dosage des diènes et des TBARS.

Dans nos conditions, les différences inter-phénotypes sont maximales aux concentrations équimolaires d'Hp et d'Hb. Par contre, lorsque l'Hp est en excès dans le milieu réactionnel, l'activité anti-oxydante ne dépend plus du phénotype, mais elle n'inhibe pas pour autant complètement la peroxydation lipidique. Le maximum d'inhibition obtenu a été de 70 % quel que soit le phénotype considéré.

L'analyse des résultats montre également que la mesure des diènes (produits intermédiaires d'oxydation) semble être plus sensible que celle des TBARS (produits finaux d'oxydation), comme marqueur de peroxydation lipidique induite par l'hémoglobine. En effet, dans nos conditions (membranes de globules rouges, 0,3 g/L), un léger stress oxydant (2,5  $\mu\text{mol/L}$  d'Hb pendant 20 min) est suffisant pour induire la formation d'une concentration maximale de diènes conjugués. Ces conditions ne nous ont pas permis d'étudier *in vitro* la formation des TBARS. Plusieurs auteurs ont rapporté que lorsque la peroxydation lipidique était suivie par les TBARS dans un modèle utilisant l'hémoglobine comme agent oxydant pour la production de radicaux libres, la quantification d'un stress oxydant nécessitait la présence de peroxyde d'hydrogène (Kanner et Harel, 1985 ; Everse et Hsia, 1997 ; Melamed-Franck et coll., 2001). Ainsi la formation des TBARS a été étudiée en présence d'une concentration de 10  $\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène et d'une concentration optimale de 6  $\mu\text{mol/L}$  d'Hb. De même, il n'y a pas eu de formation significative de TBARS au niveau des membranes en absence de peroxyde d'hydrogène ou d'hémoglobine dans les conditions décrites. Cela explique les conditions opératoires différentes retenues pour l'étude de la production des diènes et des

TBARS. L'effet protecteur de l'Hp ainsi que les différences observées entre phénotypes vis-à-vis de la peroxydation lipidique induite par l'hémoglobine semblent plus marqués lorsqu'ils sont évalués par le suivi de la formation des diènes que celle des TBARS. Ceci a été également observé par Gutteridge sur des micelles d'acide linoléique où la peroxydation a été initiée par l'addition d'hémoglobine. Sur un tel modèle, cet auteur a rapporté que la mesure des diènes conjugués semble être plus sensible à la peroxydation lipidique induite par l'Hb mais aussi plus sensible à son inhibition par l'Hp comparé à la mesure des TBARS (Gutteridge, 1987). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les diènes sont considérés comme des produits intermédiaires donc plus précoces que les TBARS qui sont des produits terminaux d'oxydation (Halliwell et Chirico, 1993).

Le second système a utilisé des globules rouges conservés dans une solution de conservation (SAGM). L'utilisation d'une telle solution permet de limiter les dommages cellulaires spontanés (Lenfant et coll., 2004 ; Weisbach et coll., 2004). Ainsi, cette solution est largement utilisée dans le domaine de la préparation de concentrés de globules rouges destinés à être transfusés, et permet une conservation pendant plusieurs semaines (Hess et coll., 2001 ; Luten et coll., 2004). Le modèle était constitué de globules rouges lavés et conservés dans la solution SAGM avec un hémocrite de 0,50, de l'hémoglobine humaine extracellulaire (5,4  $\mu\text{mol/L}$  en concentration finale), en présence ou en absence de desferrioxamine (10  $\mu\text{mol/L}$ ), l'ensemble étant incubé pendant 15 h. Ces conditions opératoires ont été établies à l'issue d'expériences préliminaires visant à identifier les conditions opératoires optimales permettant de comparer l'effet anti-oxydant des phénotypes de l'haptoglobine humaine.

Nos résultats ont montré que l'Hb provoquait la libération de  $\text{K}^+$  et de LDH de manière significative. L'Hp était capable d'inhiber de manière significative ces effets, confirmant que l'Hb était bien responsable des altérations fonctionnelles des membranes (Babior, 1981;



Advani et coll., 1992). De plus, l'effet protecteur de l'Hp s'est avéré être phénotype-dépendant, comme précédemment retrouvé dans un autre modèle utilisant des LDL humaines (Melamed-Franck et coll., 2001).

Nos résultats montrent également que les différences inter-phénotypes sont plus marquées lorsque les concentrations d'haptoglobine et d'hémoglobine sont équimolaires. Dans ces conditions, une part de l'oxydation des lipides membranaires est sensible à la desferrioxamine, un chélateur de fer. Cette observation est en accord avec le double rôle de l'hémoglobine dans la peroxydation lipidique comme proposé par Gutteridge (Gutteridge, 1987). Le premier est dû à la molécule d'hémoglobine entière alors que le second est lié au fer libéré par cette dernière lors de son catabolisme. L'Hp est considérée comme un anti-oxydant majeur de protection du système vasculaire (Miller et coll., 1997) dans la mesure où elle joue un rôle important dans ces deux mécanismes, d'abord par fixation de l'Hb libre, puis en prévenant la libération de fer par cette dernière (Ziouzenkova et coll., 1999 ; Asleh et coll., 2005). L'effet protecteur de la desferrioxamine est significativement plus important en présence de l'Hp 2-2 comparé aux phénotypes Hp 1-1 et Hp 2-1 confirmant, une fois de plus, des différences inter-phénotypes de l'haptoglobine à prévenir les dommages oxydatifs de l'Hb extracellulaire. L'effet protecteur plus important de la desferrioxamine en présence du phénotype Hp 2-2 pourrait s'expliquer par le fait que ce phénotype, étant le moins efficace dans la fixation de l'hémoglobine, laisserait plus de temps favorable à la libération de fer par cette dernière. Ainsi, la desferrioxamine a un effet protecteur plus important en présence du phénotype Hp 2-2, du fait d'une plus grande disponibilité du fer libre, comparé aux deux autres phénotypes.

Plusieurs auteurs ont rapporté que des modifications de la fluidité membranaire et de l'activité des enzymes membranaires surviennent à la suite des modifications des lipides membranaires (Amler et coll., 1990 ; Yu et coll., 1992), l'hémolyse pouvant survenir par rupture directe de la membrane des globules rouges (Silva, 2000) ou par formation de pores membranaires (Jackson et coll., 1996). Une augmentation des diènes conjugués a été corrélée à un changement de la fluidité membranaire, qui modifierait les propriétés des canaux ioniques (Jamme et coll., 1995 ; Stanimirovic et coll., 1995), tandis que la production des TBARS indiquerait une possible altération des lipides membranaires pouvant expliquer la perméabilité à la LDH.

Dans nos conditions, l'effet protecteur de l'Hp contre le stress oxydant induit par l'Hb libre a été plus marqué pour les variations de la LDH que celles du  $K^+$ . Cette observation semble comparable aux résultats obtenus par Colado Simao et coll., qui indiquent un effet bénéfique du genistein (un flavonoïde) sur l'inhibition de la libération de la LDH, mais non sur celle du  $K^+$  par des globules rouges soumis à un stress oxydant induit par des espèces réactives de l'oxygène (Colado Simao et coll., 2006). Ces auteurs ont montré que ce flavonoïde inhibait la peroxydation des lipides membranaires et l'oxydation des protéines mais pas celle d'une protéine particulière, la bande 3, impliquée dans la sortie de  $K^+$ . Par ailleurs, il faut aussi noter que les entrées et sorties du  $K^+$  sont influencées par la pompe  $Na^+/K^+$  ATPase, et plusieurs auteurs ont rapporté que la peroxydation lipidique induite par les espèces réactives de l'oxygène était associée à une inhibition de l'activité de la  $Na^+/K^+$  ATPase (Richards et coll., 1988 ; Rohn et coll., 1996 ; Rauchova et coll., 1999), ce qui pourrait contribuer à augmenter la concentration du  $K^+$  extracellulaire. De même, il a été rapporté qu'au cours du processus de peroxydation lipidique, les modifications de la fluidité membranaire pouvaient entraîner une inhibition de cette pompe (Rauchova et coll., 1999).

Les capacités différentes des phénotypes de l'haptoglobine à prévenir le stress oxydant induit par l'hémoglobine extracellulaire pourraient laisser penser que les différences observées seraient expliquées essentiellement par des différences d'affinités des 3 phénotypes vis-à-vis de l'hémoglobine. Or, Asleh R et coll. ont récemment rapporté que les différences pourraient également être dues à des différences d'affinité des complexes Hb-Hp pour les récepteurs CD163 des monocytes/macrophages (Asleh et coll., 2003 ; Asleh et coll., 2005), ce qui va à l'encontre de ce qui avait été avancé jusqu'à présent par d'autres auteurs (Langlois MR 1996 ; Melamed-Franck et coll., 2001). Ces données parfois contradictoires confirment le fait que les mécanismes par lesquels les phénotypes d'Hp exercent un effet protecteur ne sont actuellement pas bien élucidés (Javid, 1978 ; Lim et coll., 2001).

## **VI. Conclusion**

Les résultats de cette étude ont confirmé que l'Hb extracellulaire et le fer susceptible d'être libéré au cours de son catabolisme, peuvent être à l'origine d'effets délétères sur le globule rouge, même à de faibles concentrations. Les résultats obtenus avec le premier modèle que nous avons présenté ont permis de mettre en évidence une peroxydation des lipides membranaires caractérisée par une augmentation significative de marqueurs du stress oxydant, comme les diènes et les TBARS. Le deuxième modèle a permis de montrer une atteinte de l'intégrité membranaire se traduisant par une modification de la perméabilité membranaire avec libération de  $K^+$  et de LDH suite à l'action de l'Hb. Les résultats obtenus avec ces 2 modèles laissent suggérer que l'Hb a été capable d'induire une oxydation des lipides susceptible de modifier la fluidité membranaire. En effet, les fonctions de la membrane cellulaire dépendent de sa composition et de son organisation. Toute modification

(notamment une oxydation) est susceptible d'entraîner une altération fonctionnelle. Ces altérations peuvent affecter l'activité des enzymes membranaires, l'accessibilité de ses récepteurs, et bon fonctionnement de ses systèmes de transports. Par ailleurs, ces modifications peuvent entraîner une modification de la fluidité membranaire, laquelle peut aboutir à une fragilité accrue donc à la lyse des cellules.

L'H<sub>p</sub> possède un effet protecteur contre les dommages oxydants et cet effet s'est révélé être phénotype-dépendant à de faibles concentrations. L'effet protecteur de l'H<sub>p</sub> a été trouvé plus marqué dans les phases initiales de l'oxydation. En effet, cette action protectrice a été mise en évidence par une inhibition plus importante d'un marqueur précoce de la peroxydation lipidique qu'est la mesure des diènes, comparée au dosage de produits terminaux que sont les TBARS. Nos résultats ont aussi montré que le pouvoir anti-oxydant du phénotype H<sub>p</sub> 1-1 est supérieur à celui du phénotype H<sub>p</sub> 2-1, le phénotype H<sub>p</sub> 2-2 étant le moins efficace. La comparaison des pouvoirs anti-oxydants des 3 phénotypes a montré des différences significatives aux concentrations physiologiques d'H<sub>p</sub>, ce qui semble corroborer l'hypothèse que le phénotype d'H<sub>p</sub> peut être prédictif de la protection contre les dommages oxydants liés à l'hémolyse.

**Sixième Partie : Qualité des globules rouges re-transfusés en  
récupération sanguine péri-opératoire**

## **I. Introduction**

La transfusion sanguine est souvent nécessaire en chirurgie orthopédique et peut consister en une transfusion homologue ou en une autotransfusion (transfusion autologue programmée ou récupération sanguine péri-opératoire). La transfusion autologue programmée est une méthode qui a tendance à être de moins en moins utilisée du fait des risques infectieux qu'elle présente et de son coût (Lefèvre, 2000). En outre, la totalité des culots globulaires recueillis avant l'opération n'est pas toujours transfusée, alors que ce mode de transfusion impose plusieurs trajets aux patients pour se rendre à l'établissement français du sang (EFS). Les patients sont souvent fatigués sur le plan clinique, voire anémiques, malgré la mise en place d'un traitement martial (Colmar et coll., 2004). La récupération sanguine péri-opératoire permet, quant à elle, de transfuser un patient avec ses propres hématies obtenues à partir du sang épanché au cours de l'intervention chirurgicale, dans le but de réduire ainsi l'utilisation des culots globulaires homologues et de s'affranchir des contraintes liées à leur utilisation.

Le recours à la récupération sanguine péri-opératoire n'est pas récent. En effet, dès 1818, James Blundell a expérimenté avec succès la technique chez l'animal (Blundell, 1818), mais il a fallu attendre 1886 pour que les premiers succès cliniques soient publiés (Ducan, 1886).

L'ère moderne de la récupération sanguine péri-opératoire a débuté dans les années soixante avec le développement de techniques de récupération sans lavage et de techniques de récupération avec lavage des hématies à re-transfuser (Dyer, 1966 ; Klebanoff, 1970). Depuis, des systèmes de récupération de plus en plus performants ont été développés et testés dans de nombreuses spécialités chirurgicales réputées hémorragiques et la place respective de ces deux techniques a donné lieu à un débat. Un début de réponse semble être obtenu à travers le rapport de la conférence de consensus de décembre 1993 de la Société Française d'Anesthésie

et de Réanimation et de l'Agence Nationale pour le Développement de l'Evaluation Médicale (A.N.D.E.M), puis celui de la Haute Autorité de Santé (HAS) de juillet 2006. En effet, ces rapports montrent clairement que les hématies obtenues par les systèmes avec concentration et lavage sont de meilleure qualité et doivent être préférées si possible à celles obtenues avec les systèmes sans lavage.

## **I. 1. Principe et dispositifs techniques utilisés**

### ***I. 1. 1. Principe***

La récupération sanguine péri-opératoire (RSPO) permet d'administrer par voie intraveineuse au patient son propre sang récupéré au niveau du site chirurgical ou la plaie opératoire lors d'une intervention chirurgicale hémorragique. Elle fait partie des techniques d'économie de sang qui permettent d'éviter de recourir à la transfusion homologue. La récupération de sang peut se faire en deux périodes distinctes : en per-opératoire au niveau du champ opératoire, ou en post-opératoire au niveau des systèmes de drainage (HAS, 2006). En France, deux dispositifs de récupération de sang qui utilisent du matériel stérile à usage unique sont actuellement disponibles : un système sans lavage avec filtration sous haute ou basse pression, et un système avec filtration, concentration et lavage.

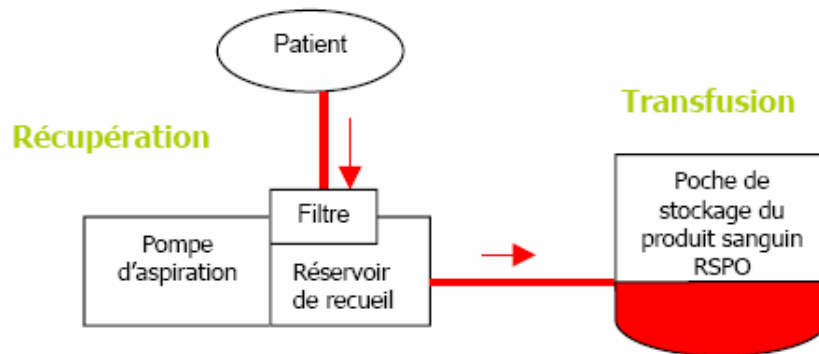
### ***I. 1. 2. Dispositifs techniques utilisés***

#### ***\* Dispositifs de récupération sans lavage***

Le sang récupéré à partir du champ opératoire est transfusé au patient après filtration simple. Cette méthode a été expérimentée aussi bien en chirurgie vasculaire (Duchateau et coll., 1990 ; Ouriel et coll., 1993) qu'en chirurgie orthopédique (Clements et coll., 1992 ; Heddel et coll., 1992). Le sang est aspiré dans un réservoir stérile de capacité comprise entre 500 et 1000 mL, puis re-transfusé au patient après simple filtration. Le système est en général composé d'une enceinte rigide soumise à une dépression et à laquelle s'adapte la tubulure d'aspiration (qui peut être équipée d'un pré-filtre) et la poche filtrante (Figure 33). Lorsque la poche est pleine, elle est transfusée au patient à travers un filtre de 40  $\mu\text{m}$ . Le type d'anticoagulation dans le circuit extra-corporel peut consister, soit en une héparinisation seule, soit en l'utilisation d'une solution citratée seule, soit en une association des deux anticoagulants.

Ce système présente l'avantage d'une simplicité de mise en œuvre et d'utilisation, en plus d'un coût de fonctionnement raisonnable. Cependant, cette méthode est peu satisfaisante pour des interventions très hémorragiques, qu'il s'agisse de saignements trop abondants ou trop rapides (Bricard et coll., 1992). De plus, afin de réduire l'hémolyse mécanique, il est nécessaire d'aspirer le sang épanché avec une dépression basse, comprise entre 50 et 80 mm de Hg. Cette contrainte n'est pas compatible avec des saignements à fort débit. Enfin avec ce système, on note chez les patients auto-transfusés une augmentation de l'hémoglobine extra-érythrocytaire (0.6 g/L) qui se normalise en 4 heures selon certains auteurs (Clifford et coll., 1987) et en 24 heures selon d'autres (Duchateau et coll., 1990 ; Endresen et coll., 1991).



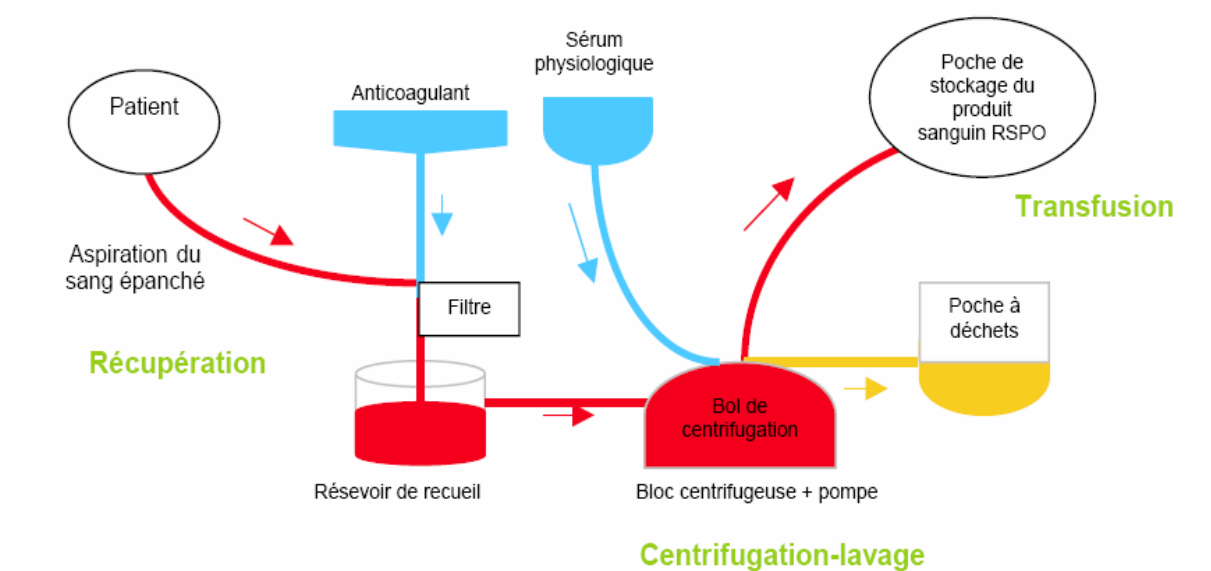


**Figure 33 : Principe de fonctionnement d'un récupérateur de sang sans lavage dont le système aspiratif utilise une pompe.** (source : brochures techniques des fournisseurs et Institut national de la transfusion sanguine, 2000 ; HAS, 2006).

**\* Dispositifs de récupération avec lavage**

Le principe de fonctionnement de ces dispositifs est représenté sur la Figure 34. La première étape de cette technique est identique à celle de la récupération sans lavage ; le mélange du sang récupéré et d'anticoagulant est stocké dans un réservoir équipé d'un filtre de 120 à 180  $\mu\text{m}$  de porosité. Le mélange filtré est ensuite concentré, puis lavé avec une solution de Ringer-lactate ou de chlorure de sodium 9 g/L (Figure 34). Le produit final est un concentré d'hématies lavées dont l'hématocrite varie de 50 % à 65 %. Il est stocké dans une poche qui sera transfusée au patient en fonction des besoins dans un délai de 6 heures (Lefèvre, 2000). La durée de recyclage varie de 3 à 7 minutes en fonction des caractéristiques du saignement et du système utilisé. Les appareils actuellement disponibles pour réaliser ce type de recyclage dérivent des séparateurs de cellules par centrifugation à flux discontinu. En 1974, la société Haemonetics a commercialisé un tel système, en créant le terme de "Cell-Saver". Depuis, les avancées technologiques ont permis d'automatiser les procédures et d'évoluer vers des

machines moins encombrantes et facilement transportables (Kalra et coll., 1993 ; Lefèvre, 2000 ; HAS, 2006).



**Figure 34 : Principe de fonctionnement des récupérateurs de sang avec concentration-lavage** (source: brochures techniques des fournisseurs, Institut National de la Transfusion Sanguine, 2000 et HAS, 2006).

La récupération sanguine péri-opératoire avec filtration, concentration et lavage permet de préparer un produit sanguin de meilleure qualité que la filtration simple (consensus, HAS). La durée de vie des hématies lavées est comparable à celle d'hématies conservées et destinées à une transfusion homologue (Thorley et coll., 1990 ; Kent et coll., 1991). Des résultats satisfaisants ont été obtenus, même en chirurgie particulièrement traumatisante pour les cellules telle que la chirurgie du rachis, du fait du saignement en nappe qui majore l'hémolyse mécanique due à l'aspiration, ainsi que la présence de particules osseuses et de gouttelettes lipidiques (Ray et coll., 1986). Une grande partie de l'hémoglobine extra-érythrocytaire, ainsi que les débris cellulaires et la quasi-totalité des substances récupérées avec le sang épanché sont éliminés par le lavage (Lawrence-Brown et coll., 1989). Il est à noter que l'élimination

du plasma expose à un risque de perte des facteurs de la coagulation et l'apport de plasma frais décongelé homologue peut être nécessaire (Lefèvre et coll., 1989 ; Horst et coll., 1992).

## **I. 2. Contexte de l'étude**

La récupération sanguine péri-opératoire (RSPO) suivie de l'administration des érythrocytes par voie intraveineuse est une technique d'économie de sang qui permet de limiter les transfusions de culots globulaires homologues. C'est une technique largement utilisée dans les interventions chirurgicales cardiovasculaires, orthopédiques, rachidiennes, neurologiques et les transplantations d'organes. Un système largement employé dans cette technique utilise un "Cell-saver". Cet appareil consiste en un dispositif de récupération du sang avec cycle de concentration-lavage. Il permet la préparation de concentrés d'hématies lavées, à partir du sang épanché au niveau du champ opératoire. L'avantage de l'utilisation de la récupération sanguine péri-opératoire est la disponibilité immédiate d'érythrocytes frais réchauffés ayant un pH et un contenu en 2,3-diphosphoglycérate normaux et donc une demi-vie *in vivo* plus longue que les hématies homologues conservées. Cela permet un gain de temps considérable car évitant les retards liés à l'approvisionnement et aux contrôles à réaliser avant toute transfusion homologue. Elle ne présente pas de risques immunologiques et les risques infectieux sont moindres.

Dans une étude précédente (la cinquième partie de ce mémoire), nous avons montré que l'hémoglobine libre (extra-érythrocytaire) était susceptible d'entraîner des effets délétères sur le globule rouge en terme de stress oxydant. Or, la récupération, la concentration et le lavage des hématies avant leur re-transfusion peut s'accompagner d'une hémolyse importante (Clifford et coll., 1987 ; Lefèvre et coll., 1989 ; Duchateau et coll., 1990), susceptible

d'exposer les cellules destinées à être réinjectées à un stress oxydant pouvant être à l'origine d'une transfusion inefficace. L'objectif de cette étude a été d'évaluer la qualité des globules rouges préparés par ce système et d'étudier les conséquences de l'hémolyse en terme de stress oxydant.

### **I. 3. Démarche expérimentale et paramètres étudiés**

Pour atteindre nos objectifs, des prélèvements sanguins ont été réalisés chez des patients bénéficiant d'une autotransfusion péri-opératoire utilisant un "Cell-Saver" (Haemonetics® Cell Saver 5), juste avant le début de l'opération chirurgicale (échantillon noté A), puis 2 heures après l'opération s'accompagnant d'une autotransfusion (échantillon C) et 24 heures plus tard (échantillon D). Pour chaque patient, des spécimens sanguins ont été prélevés également au niveau de la première poche (échantillon B1) et de la dernière poche (échantillon B2) re-transfusées. Tous les échantillons prélevés ont été acheminés rapidement au laboratoire pour leur traitement. Sur les différents spécimens, les dosages de l'hémoglobine, de l'Hp et de l'orosomucoïde plasmatiques ont été réalisés. Le dosage des thiols non protéiques (NPSH) a été réalisé pour évaluer le statut anti-oxydant du sang total. Le stress oxydant a été évalué par la détermination de marqueurs de l'oxydation des lipides (diènes et TBARS) et des protéines (protéines carbonylées) au niveau des membranes de globules rouges des différents spécimens. Nous nous sommes également intéressés aux paramètres mécaniques des membranes de globules rouges par l'étude de la fragilité osmotique et de la fluidité membranaire (par mesure d'anisotropie de fluorescence). Enfin, des marqueurs de la perméabilité membranaire ( $K^+$  et LDH) ont été déterminés dans les milieux extracellulaires des différents spécimens.

## II. Spécimens et Méthodes

### II. 1. Spécimens

Cette étude a été réalisée pour 5 patients âgés de 63 à 89 ans (moyenne  $\pm$  écart type :  $71 \pm 11$  ans) ayant bénéficié de la mise en place d'une prothèse totale de hanche. Aucun patient n'a fait l'objet d'une transfusion homologue pendant ou dans les 24 heures suivant la fin de l'intervention chirurgicale. Le recueil des échantillons a été rendu possible grâce à la collaboration du service d'anesthésie et de réanimation du Centre de Traumatologie et d'Orthopédie d'Illkirch.

Pour chaque patient, 6 échantillons de 2,7 mL ont été prélevés :

- Echantillon A : sang du patient, juste avant le début de l'intervention chirurgicale
- Echantillon B1 : au niveau de la première poche de sang traitée et destinée à être re-transfusée
- Echantillon B2 : au niveau de la dernière poche de sang traitée et destinée à être re-transfusée
- Echantillon C : sang du patient, 2 heures après l'opération chirurgicale
- Echantillon D : sang du patient, 24 heures après l'opération chirurgicale.

Les différents prélèvements ont été réalisés sur héparinate de lithium et acheminés rapidement au laboratoire.

## **II. 2. Méthodes**

### ***II. 2. 1. Dosage de l'hémoglobine extra-érythrocytaire***

L'hémoglobine libre a été déterminée avec un coffret réactif (Sigma Chemicals Co, St Louis, Etats Unis) utilisant la méthode de Standefer (Standefer et Vanderjagt, 1977) en présence de 3,3',5,5'- tétraméthylbenzidine.

Le principe de la réaction est basée sur l'action catalytique de l'hémoglobine sur l'oxydation de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine par le peroxyde d'hydrogène. L'intensité de la coloration mesurée à 520 nm sur un spectrophotomètre Uvikon 922 (Kontron Inst, Montigny le Bretonneux, France) est proportionnelle à la concentration en hémoglobine de l'échantillon à doser.

### ***II. 2. 2. Dosages des marqueurs biochimiques dans le plasma***

L'haptoglobine et l'orosomucoïde ont été dosées par mesure immunonéphélométrique en mode cinétique avec l'automate Image (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), en utilisant les réactifs du fabricant. Le  $K^+$  a été déterminé par potentiométrie sur un automate Synchron CX5 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), l'activité de la LDH a été déterminée sur le même automate avec des réactifs provenant de Roche-Diagnostics (Mannheim, Allemagne).

### ***II. 2. 3. Dosage des thiols non protéiques (NPSH) dans le sang total***

#### ***\* Réactifs***

\* Solution de précipitation des protéines (acide métaphosphorique 1,6 % - d'EDTA 0,02 % - NaCl 30 % dans de l'eau).

\* Réactif d'Ellman : 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) 1 mmol/L – EDTA 0,034 mmol/L.

#### ***\* Mode opératoire***

Le dosage a été réalisé selon la méthode de Riddels utilisant le réactif d'Ellman (Riddels et coll., 1979). Le 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) ou DTNB a été décrit par ce dernier comme un réactif spécifique des groupements sulfhydryles, suffisamment sensible pour détecter la présence de résidus cystéines dans les échantillons. La réaction a consisté en un dosage de l'ensemble des groupements SH à 412 nm par mesure du nitrobenzoate formé, de coloration jaune vive.

300 µL de sang hépariné dilué au 1/10 dans du PBS pH 7,4 (dans de la glace) ont été mélangés à 700 µL d'une solution de précipitation des protéines. Le mélange ainsi obtenu a été agité au vortex® pendant 5 minutes avant d'être centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes. Le surnageant a été filtré, puis 500 µL du filtrat ont été mélangés à 60 µL d'une solution de NaOH (1 mol/L), et 250 µL du réactif d'Ellman. Le mélange ainsi obtenu a été incubé à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance de la solution a été ensuite lue au spectrophotomètre à 412 nm et une gamme d'étalonnage a été réalisée à partir de dilutions de

glutathion réduit dans du tampon phosphate, de telle sorte à obtenir des concentrations allant de 0.005 à 0.2 mmol/L.

## **II. 2. 4. Préparation des membranes de globules rouges**

### **\* Réactifs**

\* Solution tampon isotonique : Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7,4.

\* Solution tampon phosphate hypotonique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 5 mmol/L, pH 8,5.

### **\* Mode opératoire**

Les membranes de globules rouges ont été préparées selon la méthode de Chernomordik et Sowers (Chernomordik et Sowers, 1991).

Les spécimens sanguins ont été immédiatement centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant et la couche de globules blancs ont été enlevés. Le culot de globules rouges a été lavé 2 fois avec le tampon isotonique PBS, pH 7,4, puis l'hémolyse a été réalisée par addition de 30 volumes de tampon phosphate hypotonique 5 mmol/L, pH 8,5 à un volume de culot de globules rouges et le mélange a été centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Les membranes obtenues après lavage à 2 reprises ont présenté, à ce stade, une teinte rose. Elles ont ensuite été lavées à nouveau avec du PBS, pH 7,4, puis avec la solution hypotonique. Ces 2 dernières étapes ont permis d'obtenir des membranes de couleur blanche.



## **II. 2. 5. Marqueurs du stress oxydant dans les membranes de globules rouges**

### ***\* Dosage des diènes***

Le dosage des diènes a été réalisé selon la méthode décrite par Buege et Aust (Buege et Aust, 1978).

A 1 mL d'une solution de membranes (concentration finale en protéines, 1g/L), ont été ajoutés 5 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1). Après une agitation vigoureuse pendant 5 minutes pour optimiser l'extraction, le mélange a été centrifugé à 1000 g pendant 5 minutes. La phase supérieure a été enlevée par aspiration, puis la phase chloroformique a été recueillie à l'aide d'une seringue et évaporée au Maxi Dry Lyo (Heto-Holton, Allerod, Denmark). Le résidu a été repris par 1,5 mL de cyclohexane et l'absorbance a été lue à 234 nm contre du cyclohexane.

### ***\* Dosage des Substances Réagissant avec l'Acide Thiobarbiturique (TBARS)***

La détermination des TBARS formés dans les membranes de globules rouges a été réalisée selon la méthode de Gutteridge (Gutteridge, 1987).

A 1 mL d'une solution de membranes (concentration finale en protéines, 1 g/L), ont été ajoutés 2 ml d'une solution d'acide trichloroacétique – acide thiobarbiturique - HCl. Le mélange a été agité au vortex® pendant 5 minutes avant d'être incubé à 100 °C pendant 30 minutes. Les TBARS ont été ensuite extraites par 1,5 mL de n-butanol, puis centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes. La fluorescence de la couche butanolique a été lue à 553 nm avec une excitation à 532 nm sur un spectrofluorimètre SFM 25 (Kontron Inst, Montigny le Bretonneux, France), et les résultats ont été exprimés en nmol de TBARS par gramme de

protéines après établissement d'une courbe d'étalonnage avec du 1,1',3,3'-tetraéthoxypropane (analogue du MDA).

***\* Dosage des protéines carbonylées***

Le dosage des protéines carbonylées a été réalisé au niveau des membranes de globules rouges selon la méthode décrite par Levine (Levine et coll., 1990).

500  $\mu\text{L}$  de la solution de membranes (1 g/L de protéines membranaires) ont été mélangés avec 500  $\mu\text{L}$  d'une solution à 10 mmol/L de 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) et 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de sulfate de streptomycine (10 % dans 50 mmol/L de tampon HEPES, pH 7,2). Le mélange a été incubé pendant 60 minutes à température ambiante avec agitation au vortex® toutes les 15 minutes, puis 1 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 20 % a été ajouté avant une centrifugation à 11 000 g pendant 3 minutes. Le surnageant a été enlevé et le culot lavé 3 fois avec 1 mL du mélange éthanol/acétate d'éthyle (1:1) pour éliminer le DNPH libre. Le précipité protéique a été solubilisé dans 600  $\mu\text{L}$  d'une solution à 6 mol/L de guanidine pendant 15 minutes à 37 °C, puis tout matériel insoluble a été enlevé par une centrifugation à 11 000 g pendant 3 minutes. L'absorbance du surnageant a été lue à 370 nm et les résultats exprimés en mmol par mg de protéines grâce à l'utilisation du coefficient d'absorbance molaire de la 2,4-dinitrophénylhydrazone formée (22 000  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

## II. 2. 6. Paramètres mécaniques du globule rouge

### *\* Détermination de la fragilité osmotique des globules rouges*

La fragilité osmotique des globules rouges a été déterminée selon la méthode de Beutler (Beutler, 1977). Pour cela, 10  $\mu$ L de globules rouges lavés avec du PBS pH 7,4 ont été mélangés avec 1 mL de solution de concentration variable en NaCl (0 ; 3,0 ; 3,5 ; 4,0 ; 4,5 ; 5,0 ; 5,5 ; 6,0 ; 7,0 ; 9,0 g/L de NaCl). Après une heure d'incubation à la température ambiante, la suspension érythrocytaire a été centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant a été lue à 540 nm contre le surnageant du blanc (globules rouges dans la solution isotonique de NaCl à 9 g/L). Le tube ne contenant pas de NaCl (uniquement de l'eau distillée) a été pris comme correspondant à 100 % d'hémolyse. Les valeurs de concentrations en NaCl permettant d'obtenir 50 % d'hémolyse ( $H_{50}$ ) pour chaque échantillon ont été calculées à partir des valeurs de pourcentage d'hémolyse obtenues aux différentes concentrations de NaCl grâce au logiciel graphPad Prism 3.0.

### *\* Etude de la fluidité membranaire des globules rouges par anisotropie de fluorescence*

#### *\* Principe de l'étude*

L'anisotropie de fluorescence d'une molécule fluorescente résulte directement de l'amplitude de la rotation brownienne de la molécule considérée. Ce paramètre peut donc être assimilé à la facilité avec laquelle cette molécule tourne sur elle-même. L'étude de l'anisotropie de fluorescence d'une sonde fluorescente préalablement introduite dans la bicouche lipidique constitutive d'une biomembrane est une méthode de choix pour mesurer la fluidité de cette

membrane (ou inversement sa microviscosité) (Lentz et Burgess, 1989). La fluidité est assimilée à la plus ou moins grande amplitude des mouvements des chaînes d'acides gras des phospholipides. En effet, lorsqu'un fluorophore intégré dans la membrane est excité avec de la lumière linéairement polarisée, il émettra une lumière de fluorescence qui restera d'autant plus polarisée que ses mouvements sont restreints pendant la durée de vie de son état excité. Dans le cas considéré, on admet que le mouvement de la sonde est restreint par la présence des chaînes d'acides gras, autrement dit le mouvement de la sonde "épouse" celui des acides gras. Ceci est particulièrement confirmé dans le cas d'une sonde de forme linéaire comme le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH). Nous avons donc mesuré l'anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans les membranes de globules rouges des différents spécimens. La fluidité des lipides membranaires peut, en première approche, être considérée comme inversement proportionnelle à l'anisotropie de fluorescence (Hayam et coll., 1993).

*\* Mode opératoire*

20  $\mu$ L d'une solution stock de DPH à 1 mmol/L (concentration finale, 2  $\mu$ mol/L) ont été ajoutés sous une agitation constante à une suspension de membranes (0,1 mg de protéines par mL) dans du PBS, pH 7,4. Ces conditions correspondent à un taux de sonde de 1 % par rapport aux phospholipides, taux considéré comme non perturbant pour la bicouche (Hope et coll., 1985). Le mélange a été incubé à la température ambiante pendant 2 heures à l'abri de la lumière pour éviter toute photolyse du DPH. Les mesures d'anisotropie de fluorescence ont été réalisées à 20 °C sur un spectrofluorimètre SLM-Aminco 8000 (Urbana-Champaign) spécialement adapté à ce type de mesures (format en T, prismes de Glan comme polarisateurs, filtres interférentiels à 435 nm à l'émission, mesure simultanée des deux composantes polarisées  $I_{//}$  et  $I_{\perp}$ ). Les échantillons ont été excités par une lumière polarisée à 350 nm

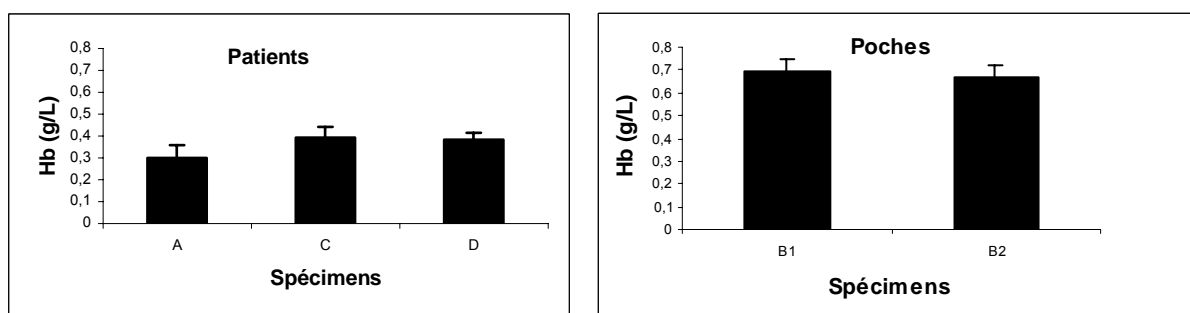
(longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du DPH) verticalement polarisée. L'anisotropie de fluorescence a été déterminée par mesure simultanée des deux composantes, verticale ( $I_{//}$ ) et horizontale ( $I_{\perp}$ ), de la lumière émise à 435 nm avec calcul du coefficient d'anisotropie  $r$  (10). Chaque détermination d'anisotropie correspond à une moyenne sur 3 minutes de 9 mesures consécutives de 20 secondes, la moyenne étant donnée directement par le logiciel de l'appareil.

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2 \times I_{\perp}} \quad (10)$$

### III. Résultats

#### III. 1. Hémoglobine extra-érythrocytaire des patients et des poches d'autotransfusion

Les résultats du dosage de l'Hb libre dans les différents spécimens (plasmas des patients et surnageants des poches d'autotransfusion) ont été représentés sur la Figure 35.



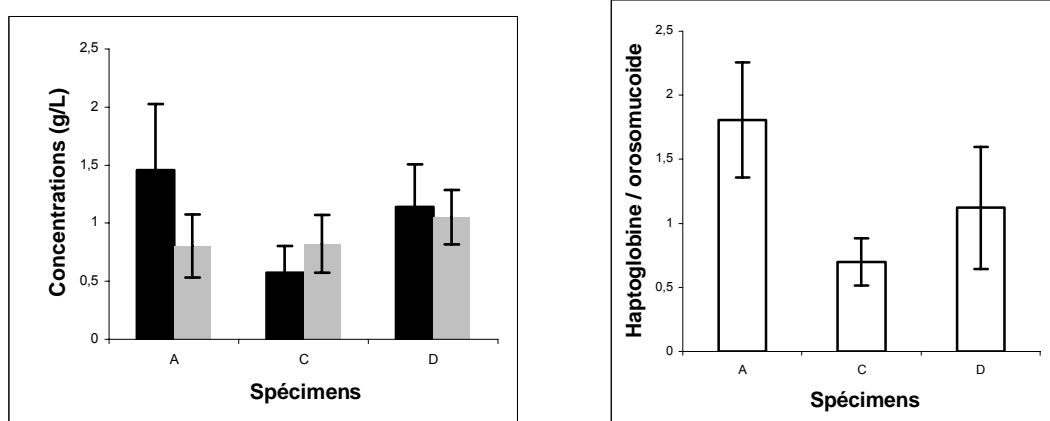
**Figure 35 : Hémoglobine libre chez les patients et dans les poches d'autotransfusion.**

Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. A : sang du patient juste avant le début de l'intervention chirurgicale, B1 : sang de la première poche traitée et re-transfusée, B2 : sang de la dernière poche traitée et re-transfusée, C : sang du patient 2 heures après l'opération, D : sang du patient 24 heures après l'opération.

L'analyse statistique des résultats du dosage de l'hémoglobine libre a montré une augmentation marquée des concentrations retrouvées dans les concentrés de globules rouges à re-transfuser et rapportées à l'hématocrite du patient, comparées aux concentrations chez le patient, avant l'opération. Les différences ont été trouvées statistiquement significatives ( $P < 0,001$ ). Deux heures après l'opération, la concentration en hémoglobine libre chez les patients a été trouvée significativement plus importante que la concentration initiale ( $P < 0,001$ ). L'étude de la concentration en Hb libre chez les patients 24 heures plus tard a montré une diminution de l'Hb libre par rapport à celle obtenue 2 heures après l'opération, mais les concentrations retrouvées demeuraient significativement augmentées en comparaison avec les concentrations initiales. Nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les poches d'autotransfusion.

### III. 2. Haptoglobine et orosomucoïde des plasmas de patients

Les résultats du dosage de l'haptoglobine et de l'orosomucoïde dans les plasmas de patients ont été représentés sur la Figure 36, ainsi que ceux du rapport haptoglobine/orosomucoïde.



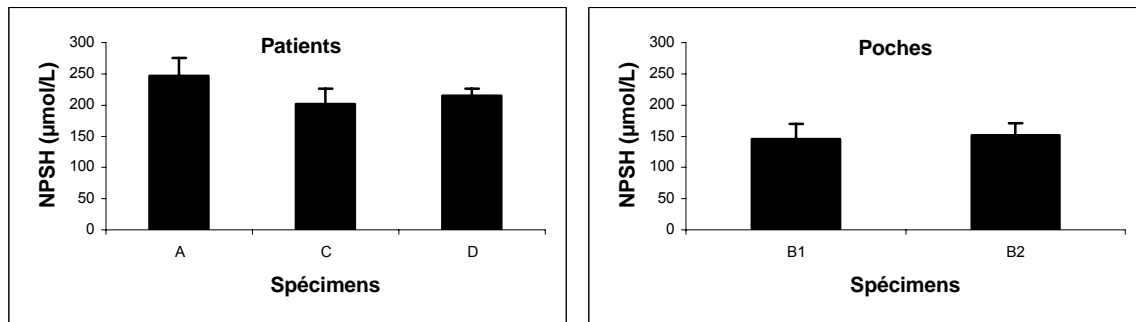
**Figure 36 : Haptoglobine et orosomucoïde chez les patients avant et après autotransfusion.** Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. Hp (■), orosomucoïde (■). A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale, C : 2 heures après l'opération, D : 24 heures après l'opération.

Les concentrations en Hp ont diminuées de manière significative 2 heures après l'opération et la transfusion des poches de sang, traduisant probablement une forte consommation par l'hémoglobine libre. Les valeurs obtenues 24 heures plus tard sont restées inférieures aux valeurs initiales. Les différences ont été trouvées statistiquement significatives ( $P < 0,005$ ). Par contre, nous n'avons pas observé de différence significative entre les concentrations d'Hp 2 h et 24 heures plus tard. En ce qui concerne l'orosomucoïde, nous n'avons pas noté de différence entre les concentrations avant l'opération et celles obtenues 2 heures plus tard. Cependant, nous avons observé une augmentation significative des concentrations d'orosomucoïde 24 heures plus tard par rapport à celles observées avant opération ( $P < 0,005$ ), ce qui est sans doute en rapport avec un syndrome inflammation post-opératoire. L'étude du rapport haptoglobine/orosomucoïde 2 h et 24 h après transfusion a montré une baisse significative en comparaison à sa valeur avant transfusion, permettant d'objectiver chez les patients transfusés une hémolyse (consommation d'haptoglobine) en présence d'un syndrome inflammatoire (augmentation parallèle des concentrations d'Hp et d'orosomucoïde).

### **III. 3. Thiols non protéiques (NPSH) du sang des patients et des poches d'autotransfusion**

Nous avons étudié les variations des concentrations de thiols non protéiques (NPSH) pour évaluer le statut anti-oxydant du sang total. Nous avons observé une baisse significative de la concentration en NPSH dans les poches de sang à re-transfuser par rapport à celle présente initialement dans le sang des patients ( $P < 0,0001$ ) (Figure 37), traduisant une forte diminution des NPSH durant les opérations de concentration et de lavage des globules rouges. Chez les

patients, des valeurs plus faibles ont été trouvées après transfusion, mais les différences observées n'étaient pas significatives.

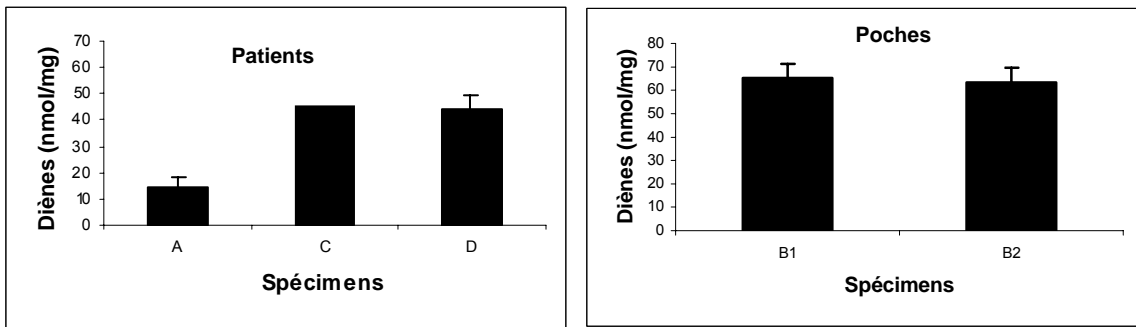


**Figure 37 : Thiols non protéiques du sang des patients et des poches d'autotransfusion.**  
Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale, C : 2 heures après l'opération, D : 24 heures après l'opération, B1 : première poche, B2 : dernière poche.

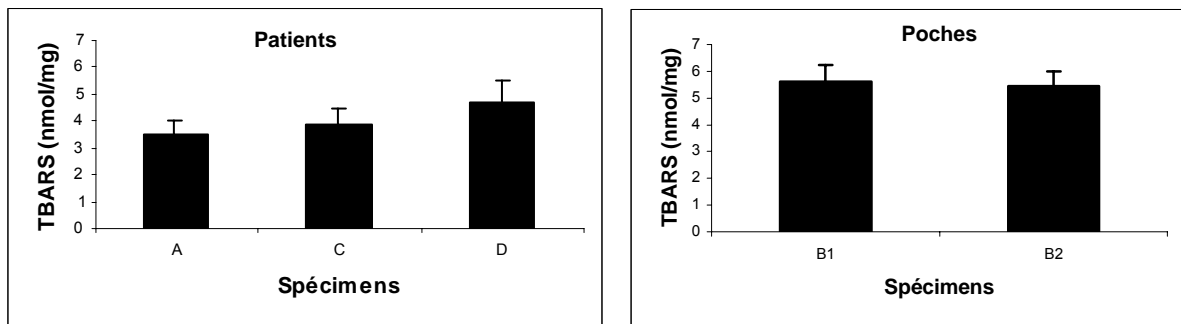
#### III. 4. Marqueurs de stress oxydant dans les membranes de globules rouges

Différents marqueurs de stress oxydant ont été déterminés dans les membranes de globules rouges des poches destinées à être re-transfusées, ainsi que chez les patients. Les résultats des marqueurs d'oxydation des lipides ont été représentés sur la Figure 38 (diènes) et la Figure 39 (TBARS). Ceux des marqueurs d'oxydation des protéines ont été représentés sur la Figure 40 (protéines carbonylées).

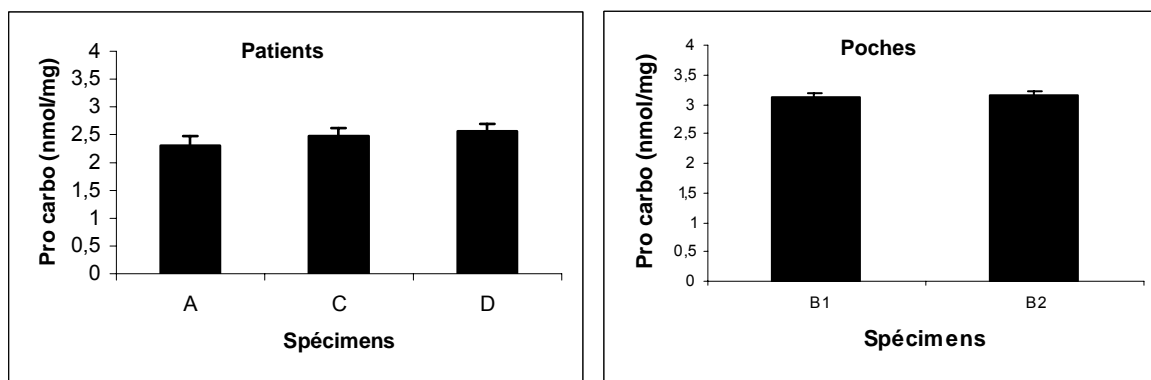




**Figure 38 : Diènes conjugués dans les membranes de globules rouges des patients et des poches d'autotransfusion.** Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale, C : 2 heures après l'opération, D : 24 heures après l'opération, B1 : première poche, B2 : dernière poche. Les diènes ont été exprimés en nmol/mg des protéines membranaires.



**Figure 39 : TBARS dans les membranes de globules rouges des patients et des poches d'autotransfusion.** Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale, C : 2 heures après l'opération, D : 24 heures après l'opération, B1 : première poche, B2 : dernière poche. Les TBARS ont été exprimés en nmol/mg de protéines membranaires.



**Figure 40 : Protéines carbonylées dans les membranes de globules rouges des patients et des poches d'autotransfusion.** Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale, C : 2 heures après l'opération, D : 24 heures après l'opération, B1 : première poche, B2 : dernière poche. Les protéines carbonylées (Pro carbo) ont été exprimées en nmol/mg de protéines membranaires.

Les résultats des marqueurs de stress oxydant des membranes de globules rouges contenus dans les poches destinées à être re-transfusées ont été comparés à ceux obtenus chez les patients avant transfusion. Nous avons observé une augmentation significative des marqueurs d'oxydation lipidique et protéique. Parmi les 3 marqueurs étudiés, les diènes conjugués ont été trouvés les plus sensibles pour mettre en évidence un stress oxydant, avec des concentrations 4 fois plus importantes au niveau des membranes de globules rouges des poches à re-transfuser que celles des membranes des globules rouges du patient avant l'opération. Les augmentations des TBARS et des protéines carbonylées ont été de 1,6 et 1,4 fois, respectivement. Les marqueurs du stress oxydant ont été également étudiés dans les membranes de globules rouges des patients à partir des prélèvements réalisés après transfusion, et comparés aux résultats obtenus avant transfusion. Les diènes ont montré une augmentation de 3,2 fois 2 heures après transfusion, alors que les TBARS et les protéines carbonylées n'étaient augmentées respectivement que d'environ 10 % sur les mêmes prélèvements. La cinétique de production des TBARS a été trouvée plus lente que celle des diènes puisqu'elle a continué à augmenter alors que celle des diènes a baissé entre 2 h et 24 heures. Par ailleurs, parmi les trois marqueurs étudiés, les TBARS étaient les seuls qui

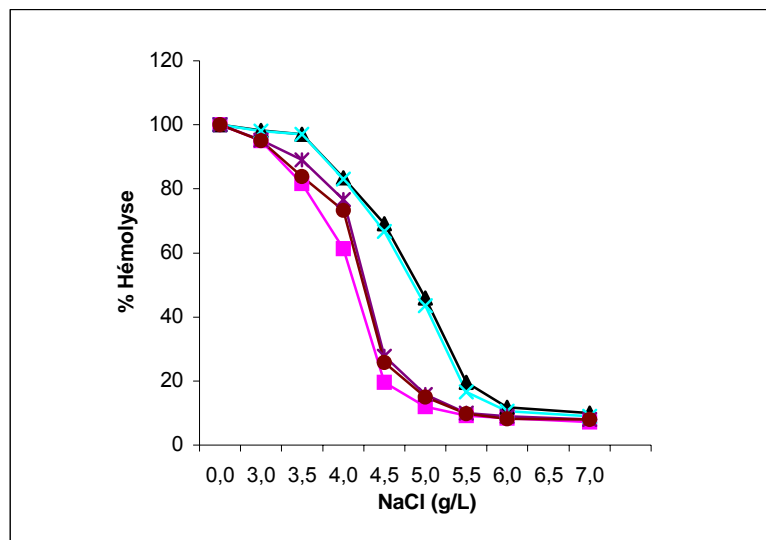
présentaient une augmentation significative entre les prélèvements réalisés à 2 h et ceux réalisés à 24 h ( $P < 0,001$ ).

### III. 5. Etude des paramètres mécaniques des globules rouges

Les "paramètres mécaniques" des globules rouges ont été appréhendés par leur fragilité osmotique d'une part, et par leur fluidité membranaire d'autre part.

#### III. 5 .1. Fragilité osmotique

Les résultats de l'étude de la fragilité osmotique des globules rouges des patients et des poches d'autotransfusion ont été représentés sur la Figure 41

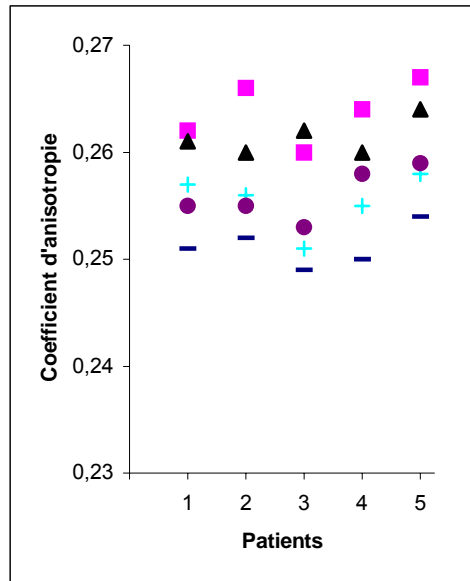


**Figure 41 : Fragilité osmotique des globules rouges des patients et des poches à re-transfuser.** 10  $\mu$ L de globules rouges lavés de chaque spécimen ont été dilués au 1/100 dans du PBS pH 7,4 et mis à incuber avec des concentrations variables de NaCl pendant 1 heure. L'absorbance du surnageant, obtenu après centrifugation, a été lue au spectrophotomètre à 540 nm. A (■) : hématies du patient juste avant le début de l'intervention chirurgicale, B1 (▲) : hématies de la première poche traitée et re-transfusée, B2 (x) : hématies de la dernière poche traitée et re-transfusée), C (\*): hématies du patient 2 heures après l'opération, D (●) : hématies du patient 24 heures après l'opération.

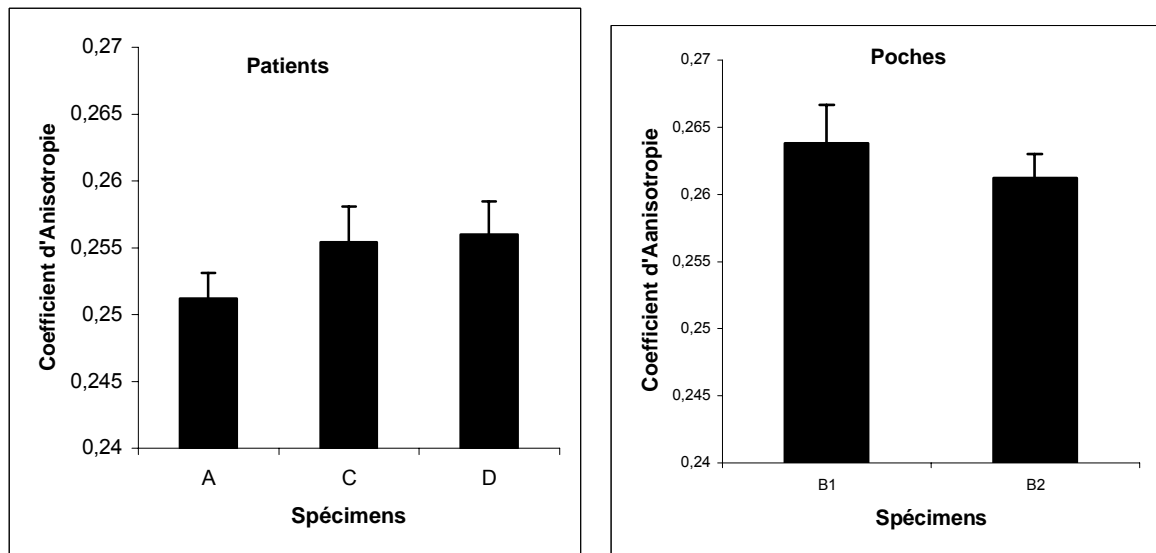
L'étude des courbes de fragilité osmotique des différents spécimens de globules rouges a montré que celles des globules rouges à re-transfuser étaient déviées vers la droite par rapport à celles des globules rouges du patient. L'analyse statistique des valeurs de  $H_{50}$  a montré que les globules rouges des poches à re-transfuser présentaient une fragilité osmotique plus élevée comparés à celle des globules rouges prélevés chez les patients en début d'opération, avec des différences significatives ( $P < 0,05$ ). Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les globules des patients avant opération, 2 h et 24 h plus tard, malgré une légère déviation vers la droite des courbes obtenues après re-transfusion.

### ***III. 5. 2. Fluidité membranaire des globules rouges***

Les résultats de la mesure de l'anisotropie de fluorescence de la sonde DPH incorporée dans les membranes de globules rouges des patients et des poches destinées à être re-transfuser ont été représentés par patient (Figure 42) et par type de prélèvement (Figure 43).



**Figure 42 : Anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans les membranes de globules rouges.** Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients. A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale (-), B1 première poche (■), B2 dernière poche (▲), C : 2 heures après l'opération (+); D : 24 heures après l'opération (●). La précision d'une mesure d'anisotropie est de  $\pm 0,001$ , ce qui est largement inférieur à la variabilité observée pour les différents prélèvements.

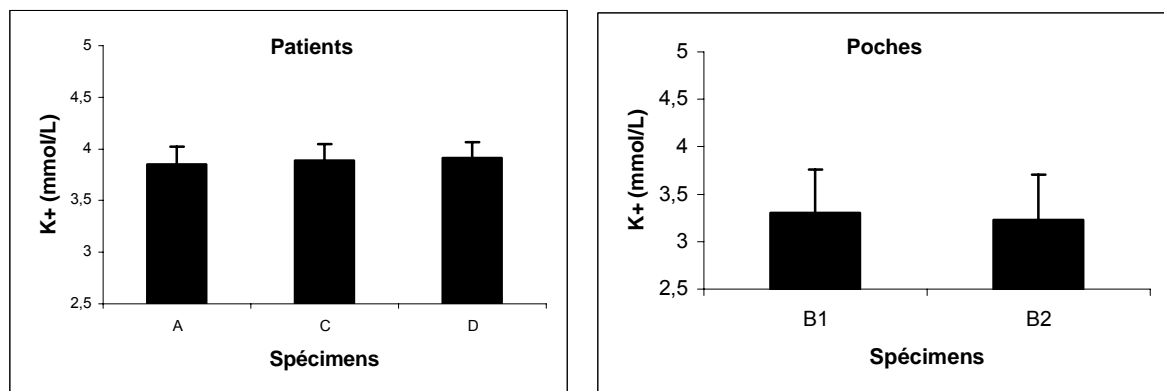


**Figure 43 : Anisotropie de fluorescence du DPH incorporé dans les membranes de globules rouges des patients et des poches à re-transfuser.** Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale, C : 2 heures après l'opération, D : 24 heures après l'opération, B1 : première poche, B2 : dernière poche.

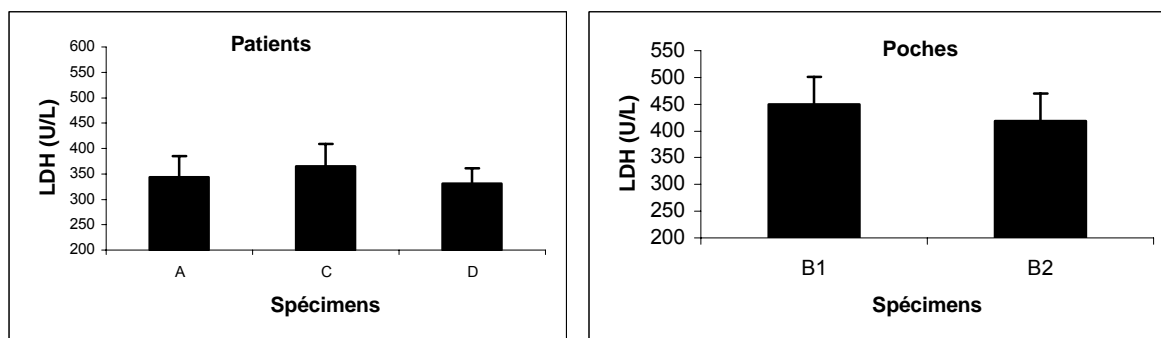
L'analyse statistique des résultats d'anisotropie de fluorescence a montré des différences significatives entre les membranes de globules rouges des poches à re-transfuser et les membranes obtenues à partir des échantillons prélevés en début d'opération ( $P < 0,005$ ). Ces résultats ont montré que la fluidité de la membrane des globules rouges des poches à re-transfuser est altérée dans le sens d'une diminution. Par contre, aucune différence significative n'a été constatée en comparant les échantillons des patients, malgré des valeurs systématiquement augmentées pour les coefficients d'anisotropie de fluorescence des prélèvements réalisés après transfusion par rapport aux valeurs initiales.

### III. 6. Marqueurs de perméabilité membranaire

Des marqueurs d'altération de la perméabilité membranaire des globules rouges ont été déterminés dans les milieux extracellulaires des poches destinées à être re-transfusées, ainsi que dans des prélèvements plasmatiques des patients. Les résultats obtenus pour le potassium ont été représentés sur la Figure 44 ; ceux obtenus pour la LDH sur la Figure 45.



**Figure 44 : Concentrations de K<sup>+</sup> dans le milieu extracellulaire des différents spécimens.** Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale, C : 2 heures après l'opération, D : 24 heures après l'opération, B1 : première poche, B2 : dernière poche. Les valeurs du K<sup>+</sup> des poches à re-transfuser ont été rapportées à l'hématocrite du patient.



**Figure 45 : Concentrations de LDH dans le milieu extracellulaire des différents spécimens.** Les résultats ont été obtenus à partir de 5 patients et sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. A : juste avant le début de l'intervention chirurgicale, C : 2 heures après l'opération, D : 24 heures après l'opération, B1 : première poche, B2 : dernière poche. Les valeurs de LDH des poches à retransfuser ont été rapportées à l'hématocrite du patient.

Les dosages réalisés sur les milieux extracellulaires des poches destinées à être re-transfusées ont montré que ceux-ci contenaient des quantités importantes de  $K^+$  et de LDH libérées par les globules rouges lors des étapes de concentration-lavage. En ce qui concerne les résultats obtenus pour les plasmas des patients, les concentrations en  $K^+$  et en activité LDH ont été trouvées en moyenne légèrement plus élevées 2 h après l'opération et la transfusion par rapport aux valeurs mesurées juste avant l'opération. Cependant, les différences observées n'ont pas été trouvées statistiquement significatives.

#### IV. Discussion

L'autotransfusion utilisant la récupération sanguine per-opératoire constitue un outil précieux dans le cadre des économies de sang et trouve son application dans de nombreux domaines de spécialités chirurgicales. Au cours cette partie du mémoire, la qualité des globules rouges préparés par le "Cell-Saver" (Haemonetics® Cell-Saver 5) et les conséquences de leur ré-injection chez le patient ont été étudiées. Les résultats obtenus à partir de 5 patients opérés au

Centre de Traumatologie et d'Orthopédie d'Illkirch et bénéficiant d'une récupération sanguine per-opératoire ont montré que, malgré les lavages, les concentrations d'hémoglobine libre dans les poches à re-transfuser restaient élevées et pouvaient atteindre 0,7 g/L. Ces valeurs sont cependant inférieures à celles rapportées par d'autres auteurs (Rosencher et coll., 1999). En effet, selon ces derniers, si la concentration en hémoglobine libre dans la poche de transfusion est en moyenne 9 fois moins élevée qu'après utilisation d'un système sans lavage, elle reste variable et peut atteindre des valeurs proches de 1,70 g/L en chirurgie orthopédique où le type de saignement per-opératoire expose à une hémolyse importante (Rosencher et coll., 1999). Des concentrations élevées d'hémoglobine libre dans une poche de récupération sanguine péri-opératoire s'expliquent par le fait que les systèmes de lavage-concentration basés sur la centrifugation en solution saline sont peu efficaces pour l'élimination de molécules de haute masse moléculaire. En réalité, c'est la dilution dans le bol de centrifugation qui est responsable de l'élimination des 9/10 de l'hémoglobine libre (Rosencher et coll., 1999). Une étude nationale permettant de vérifier les procédures d'utilisation de la RSPO et la qualité des produits destinés à être transfusés a d'ailleurs été suggérée par la HAS dans son rapport de juillet 2006 (HAS, 2006).

Après transfusion, une augmentation significative de l'hémoglobine libre plasmatique a été observée chez les patients ( $P < 0,005$ ). Des valeurs moyennes d'hémoglobine plasmatique de l'ordre 0,5 g/L ont été atteintes 2 heures après la transfusion. Ces données ont été mises en comparaison avec celles rapportées par d'autres auteurs (Clifford et coll., 1987) dans d'autres conditions et faisant état d'une concentration d'hémoglobine plasmatique de l'ordre de 0,6 g/L, se normalisant au bout de 4 ou 24 heures après transfusion (Duchateau et coll., 1990). Dans nos conditions, les concentrations en hémoglobine extra-érythrocytaire sont restées significativement augmentées 24 h après la transfusion.



L'augmentation de l'hémoglobine libre a été accompagnée d'une baisse significative de la concentration en haptoglobine plasmatique évaluée 2 heures plus tard ( $P < 0,005$ ). Cette baisse de la concentration en Hp a probablement été causée par la présence d'hémoglobine libre. En effet, comme nous l'avons indiqué par ailleurs, l'Hp fixe l'hémoglobine libre pour former un complexe qui sera capté par le système monocytaire-macrophagique pour son élimination. Par ailleurs, l'haptoglobine est une protéine de la phase inflammatoire dont la concentration plasmatique augmente lors d'un phénomène inflammatoire. Pour faire la part des deux causes de variations d'haptoglobine allant en sens inverse (hémolyse et inflammation), nous avons comparé les concentrations d'haptoglobine à celles de l'orosomucoïde, qui est une autre protéine de la phase inflammatoire de cinétique comparable, mais non influencée par l'hémolyse. L'évolution du rapport haptoglobine/orosomucoïde 2 h et 24 h après transfusion a montré une baisse du rapport, indiquant que la baisse d'haptoglobine est liée à une hémolyse malgré la présence concomitante d'un syndrome inflammatoire. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs (Duwig et coll., 1989).

Les thiols non protéiques (NPSH) jouent un rôle important dans la protection contre les dommages oxydants causés par les radicaux libres (Tibbetts et coll., 2002 ; Pompella et coll., 2003 ). 90 à 95 % des NPSH sont constitués par du glutathion, qui représente un anti-oxydant majeur car étant capable de piéger les radicaux libres mais également de participer à la régénération d'enzymes impliquées dans leur élimination. Le glutathion est un tripeptide constitué de glutamate, de cystéine et de glycine, qu'on trouve en concentration assez élevée (1-10 mmol/L) dans les cellules des animaux, des plantes et des champignons. Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion est un composé important pour le maintien de l'état réduit de la cellule. Cette fonction thiol peut aussi fixer des fonctions électrophiles et sert

donc à la détoxification de nombreuses molécules. Les 5 à 10 % restants de thiols non protéiques intracellulaires sont constitués d'acides aminés soufrés comme la cystéine et la méthionine. Ces acides aminés soufrés participent, à côté du glutathion, à la défense cellulaire contre les dommages oxydants induits par l'hémoglobine et le fer libres (Ferrali et coll., 2000, Schulpis et coll., 2006). Le dosage des NPSH permet d'apprécier une capacité anti-oxydante des globules rouges à la suite d'une exposition de ces cellules à des radicaux libres (Ferrali et coll., 2000; Signorini et coll., 1995 ; Brandao et coll., 2005). En effet, ces auteurs ont montré que la présence de fer libre entraîne une augmentation de la peroxydation des lipides membranaires et une augmentation de l'oxydation des protéines avec génération d'antigènes de sénescence à la surface des cellules (SCA), l'augmentation des marqueurs du stress oxydant s'accompagnant d'une baisse de la concentration en NPSH. Nos résultats ont montré une réduction de 40 % de la concentration en NPSH des poches à re-transfuser par rapport au sang total du patient avant opération, cette baisse intervenant durant les processus de concentration-lavage. La réduction des concentrations en NPSH que nous avons observée pourrait traduire une exposition des cellules à l'action de radicaux libres durant ce processus (Tibbetts, 2002). De même, l'étude des concentrations en NPSH chez le patient avant et après opération et transfusion a montré une baisse de 20 % deux heures plus tard, avec un retour à des concentrations de départ (avant opération) au bout de 24 heures.

L'étude des marqueurs de la peroxydation lipidique membranaire a été réalisée par le dosage des diènes et des TBARS. Le dosage des diènes conjugués a été trouvé plus sensible que celui des TBARS. En effet, les diènes ont augmenté d'un facteur de 4 alors que les TBARS n'ont augmenté que d'un facteur de 1,6 dans les membranes des globules rouges des poches par rapport aux membranes de globules rouges des patients avant transfusion. En ce qui concerne les variations observées au niveau des globules rouges des patients avant et après transfusion,

le fait que les diènes ont augmenté d'un facteur de 3,2 alors que les TBARS n'ont augmenté que de 10 % 2 heures après transfusion, laisserait penser que les diènes ont été également les plus précoces. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les diènes, produits intermédiaires de la peroxydation lipidique (phases initiales), sont plus précoces que les TBARS qui sont des produits terminaux d'oxydation (Halliwell et Chirico, 1993). La mesure des diènes a d'ailleurs été considérée comme surtout intéressante dans l'évaluation précoce des peroxydations lipidiques (Halliwell et Chirico, 1993 ; Bonnefont-Rousselot et coll., 2003).

Les protéines carbonylées, porteuses de fonctions aldéhydes ou cétones sont formées au cours de réactions variées comme l'oxydation de certains acides aminés, la fragmentation des chaînes polypeptidiques, ou de l'interaction de certains acides aminés avec des produits de la peroxydation lipidique comme le MDA, le HNE, ou l'acroléine. L'origine des protéines carbonylées permet de comprendre tout l'intérêt que peut présenter leur mesure comme marqueurs du stress oxydant (Bonnefont-Rousselot et coll., 2005). Les résultats du dosage des protéines carbonylées ont montré une augmentation significative d'un facteur de 1,4 dans les membranes des globules rouges des poches à re-transfuser comparées à celles des globules rouges prélevés chez les patients avant opération. L'étude des variations des concentrations en protéines carbonylées au niveau des globules rouges des patients avant et après transfusion a montré une augmentation de 7 % deux heures après transfusion. Les protéines carbonylées sont dégradées par les cellules en quelques heures voire en quelques jours par des systèmes protéolytiques (Grune et coll., 1995 ; Grune et coll., 1996 ; Grune et coll., 1998), alors que les produits de la peroxydation lipidique sont détoxifiés en quelques minutes (Siu et Draper, 1982 ; Grune et coll., 1994 ; Siems et coll., 1995 ; Siems et coll., 1997). C'est pourquoi les

protéines carbonylées sont considérées comme des marqueurs "stables" du stress oxydant (Pantke et coll., 1999).

L'étude des paramètres mécaniques des membranes de globules rouges a montré une diminution significative de la fluidité membranaire accompagnée d'une augmentation de la fragilité osmotique des globules rouges des poches à re-transfuser comparées aux membranes de globules rouges obtenues à partir des échantillons prélevés chez les patients en début d'opération et avant transfusion ( $P < 0,005$ ). Ces résultats pourraient être expliqués en partie par une atteinte de l'intégrité membranaire par divers mécanismes incluant la présence de l'hémoglobine libre, le contact de l'air, ou un effet de pression lors de l'aspiration du sang épanché pendant la récupération peri-opératoire. En effet, Les fonctions de la membrane cellulaire dépendent notamment de sa composition et de son organisation (Levine et coll., 1990). En particulier, la fluidité membranaire est influencée par les modifications du taux d'insaturation des chaînes d'acides gras des phospholipides, et du ratio phospholipides/cholestérol (Clamp et coll., 1997).

L'activité des enzymes membranaires, l'accessibilité des récepteurs hormonaux et des systèmes de transport d'ions et de métabolites sont modulés, donc optimisés, par la fluidité membranaire, qui elle même dépend de la composition en lipides de la membrane (Hochgraf et coll., 1997). Ainsi toute modification de la composition en lipides (notamment en cholestérol) est susceptible d'affecter les fonctions de transport et l'activité des enzymes membranaires (Stubbs, 1983). Les lipides membranaires, du fait de leur composition riche en acides gras polyinsaturés, représentent des cibles privilégiées des radicaux libres dont l'action est à l'origine d'altérations de la dynamique et de la fonction membranaire (Sevanian et Hochstein, 1985). L'oxydation de ces lipides membranaires entraîne la formation de produits comme le MDA ou la 4-HNE, qui peuvent interagir avec les chaînes latérales de certains

acides aminés (notamment la lysine) pour former des bases de Schiff. Le réarrangement de ces bases de Schiff va aboutir à la formation de produits d'oxydation des protéines tels que les protéines carbonylées (Bonnefont-Rousselot et coll., 2005). Les produits d'oxydation des lipides peuvent ainsi constituer un lien entre l'oxydation des lipides à celle des protéines. L'oxydation de ces deux types de substrats biologiques rendent les membranes plus rigides et donc moins fluides (Levin et coll., 1990).

En ce qui concerne les variations de la fluidité membranaire observées au niveau des globules rouges des patients avant et après transfusion, l'analyse des résultats a montré systématiquement une diminution de la fluidité membranaire des globules rouges 2 h et 24 h après transfusion, même si l'augmentation du coefficient d'anisotropie de fluorescence n'a pas été trouvée significative. L'absence de conséquences significatives après transfusion peut être liée, d'une part à un effet de dilution des globules rouges des poches dans la circulation générale, d'autre part au fait que les modifications de fluidité membranaire constatées pour les échantillons B1 et B2 restent compatibles avec un état physiologique, l'augmentation d'anisotropie n'étant en moyenne que de 4 à 5 %. A titre comparatif, des membranes de globules rouges soumises à des doses de radiations comprises entre 6 et 220 Gray présentent une variation de fluidité membranaire correspondant à une augmentation du coefficient d'anisotropie de fluorescence de 15 % (Parasassi et coll., 1991), ce qui est une variation nettement supérieure à celle constatée dans la présente étude.

La fragilité osmotique est un autre phénomène, associé à la fonction membranaire, qui reflète la susceptibilité des globules rouges à la lyse et qui dépend également de la composition en lipides de la membrane (Niranjan et Krishnakantha, 2000). Une fragilité osmotique accrue des globules rouges a été décrite à la suite d'une augmentation de la peroxydation lipidique membranaire (Dariyerli et coll., 2004). Ainsi, la mesure de la fragilité osmotique des globules rouges a été appliquée au diagnostic de plusieurs maladies hémolytiques et à l'étude de la

perméabilité et d'altérations membranaires, pouvant aboutir l'hémolyse (Jain et coll., 1983). Nos résultats ont montré que les courbes de fragilité osmotique des globules rouges à re-transfuser ont été déviées vers la droite par rapport à celles des hématies prélevées chez les patients. Cette observation constitue un indicateur d'une augmentation de la fragilité osmotique des globules rouges (Dariyerli et coll., 2004). L'analyse statistique des valeurs de  $H_{50}$  a confirmé cette augmentation de fragilité osmotique entre les globules rouges prélevées chez les patients avant transfusion et ceux des poches à re-transfuser, avec des différences significatives ( $P < 0,05$ ). Par contre, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les globules des patients avant transfusion et ceux prélevés 2 h et 24 h après transfusion, malgré une légère déviation vers la droite des courbes de fragilité osmotique des globules rouges des patients après transfusion.

Des marqueurs d'altération de la perméabilité membranaire des globules rouges (LDH et  $K^+$ ) ont été étudiés au niveau des milieux extracellulaires. Des concentrations importantes de ces deux marqueurs de perméabilité membranaire ont été observées au niveau des poches à re-transfuser. Ces résultats mettent clairement en évidence la libération de constituants intracellulaires dans le liquide de lavage, traduisant une augmentation de la perméabilité membranaire des globules rouges des poches à re-transfuser. Par contre, aucune différence significative n'a été observée en comparant les concentrations de ces 2 paramètres chez les patients avant et après transfusion, malgré une tendance à l'augmentation après transfusion.

## V. Conclusion

La récupération sanguine péri-opératoire correspond à une technique d'économie de sang, qui permet de transfuser un patient avec ses propres hématies, obtenues à partir du sang épanché au cours d'une intervention chirurgicale. Elle permet de réduire ainsi l'utilisation des concentrés de globules rouges homologues et d'éviter les délais liés à leur utilisation. Le choix du type de dispositif à utiliser a été posé et un début de réponse semble avoir été obtenu à travers les rapports de la conférence de consensus de décembre 1993 de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation et de l'Agence Nationale pour le Développement de l'Evaluation médicale (A.N.D.E.M), ainsi que le rapport la Haute Autorité de Santé (HAS) de juillet 2006. Cependant, des études récemment réalisées et incluant les 5 dispositifs de récupération avec concentration-lavage disponibles dans le commerce, ont montré que la qualité des concentrés globulaires était variable et dépendait du type de dispositif utilisé (Serrick et coll., 2003). Les auteurs de ces études avaient retenu comme critères de comparaison les rendements obtenus, ainsi que les pourcentages d'hémoglobine libre, de potassium, d'héparine, de leucocytes et de plaquettes éliminés. L'hématocrite des culots globulaires, ainsi que le temps nécessaire pour réaliser la récupération ont été également pris en compte.

L'analyse de la littérature concernant la qualité des concentrés de globules rouges obtenus par récupération sanguine péri-opératoire avec ou sans lavage donne des résultats parfois contradictoires et a amené la HAS à suggérer la réalisation d'une étude nationale devant permettre de vérifier les procédures d'utilisation de la RSPO et la qualité des produits obtenus dans la pratique courante.

Au cours de cette partie de mémoire, la qualité des globules rouges préparés par le "Cell-Saver" (Haemonetics® Cell-Saver 5) et les conséquences de leur transfusion chez le patient ont été étudiées. Des concentrations élevées en hémoglobine libre ont été trouvées dans les concentrés globulaires, malgré la mise en œuvre de procédures de concentration et lavage. L'évaluation des marqueurs du stress oxydant a montré au niveau des poches destinées à être réinjectés, une diminution des défenses anti-oxydantes (NPSH) accompagnée d'une augmentation des marqueurs lipidiques et protéiques du stress oxydant. Ces résultats ont montré que la qualité des globules rouges contenus dans les poches à re-transfuser était altérée. La présence d'hémoglobine libre en grande quantité, le contact avec l'air ainsi que la pression d'aspiration du sang pourraient exposer les lipides membranaires des globules rouges à des processus oxydants. La peroxydation lipidique qui en découle peut induire l'oxydation des lipides, notamment du cholestérol, qui va aboutir d'une part à une diminution de la fluidité membranaire, et d'autre part produire des métabolites d'oxydation comme le MDA et le HNE qui vont se déposer au niveau des membranes et augmenter la fragilité osmotique, avec comme conséquence potentielle une diminution de la durée de vie des globules rouges réinjectés. La mise en évidence d'un stress oxydant au niveau des membranes érythrocytaires *in vivo* et découlant de la transfusion des globules "stressés" et/ou de l'injection d'hémoglobine libre a été moins évidente. En effet, 24 heures après l'opération, seul le dosage des TBARS érythrocytaires (produits terminaux de la peroxydation lipidique) a montré des différences significatives. Ce résultat peut s'expliquer en partie par l'effet de la dilution dans la circulation générale des globules rouges "stressés", mais aussi par la mise en jeu des systèmes de réparation, illustrée par exemple par la reconstitution des réserves en thiols non protéiques au bout de 24 heures. Toutefois, il est apparu clairement, à travers cette étude préliminaire réalisée sur cinq patients, que l'hémolyse dans les poches à re-transfuser est significative, et entraîne chez les patients une augmentation de l'hémoglobine extracellulaire,



ainsi qu'une consommation d'haptoglobine. En tout état de cause, cette hémolyse dans les poches d'autotransfusion doit être maîtrisée au cours de la récupération sanguine péri-opératoire pour ne pas exposer certains patients plus vulnérables à un stress oxydant et garantir l'efficacité de l'autotransfusion.

## Conclusion générale et perspectives

Les principaux objectifs de ces travaux de thèse ont été d'étudier l'interaction des phénotypes majeurs de l'haptoglobine avec l'hémoglobine et l'influence de ces phénotypes sur le stress oxydant induit par l'hémoglobine libre sur le globule rouge *in vitro*. Par ailleurs, s'il est connu que la récupération sanguine péri-opératoire peut s'accompagner d'une hémolyse, celle-ci est susceptible d'exposer les cellules destinées à être ré-injectées à un stress oxydant pouvant être à l'origine d'une transfusion inefficace. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la qualité des globules rouges destinés à être re-transfusés, ainsi qu'aux conséquences dans la circulation générale en terme de stress oxydant.

Les principaux résultats obtenus grâce à la mesure du pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb *in vitro* ont montré que l'affinité de l'haptoglobine avec l'hémoglobine était dépendante des phénotypes à pH 4,0. Des résultats complémentaires en microcalorimétrie ont permis de montrer que la formation du complexe Hp-Hb était exothermique, mais que l'affinité de l'haptoglobine pour l'hémoglobine était trop élevée pour pouvoir être mesurée par cette technique. Cependant, les quantités de chaleur déterminées lors des interactions Hp/Hb ont montré des différences en fonction des phénotypes, avec de larges variations probablement en rapport avec l'existence de liaisons hydrogènes dans un environnement hydrophobe, comme suggéré par d'autres auteurs.

Les principales informations obtenues concernant le pouvoir protecteur de l'haptoglobine contre le stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire *in vitro* ont montré que le pouvoir anti-oxydant de l'haptoglobine était dépendant du phénotype et que le phénotype Hp 1-1 présentait l'effet protecteur le plus marqué, comme cela a été démontré par ailleurs *in vivo* dans de nombreuses situations pathologiques.

Enfin, les résultats de étude portant sur la qualité des globules rouges préparés lors de la récupération sanguine péri-opératoire ont montré que, malgré l'amélioration des techniques, les poches destinées à être re-transfusées contenaient des quantités importantes d'hémoglobine libre. Nous avons montré que la récupération sanguine péri-opératoire s'accompagnait d'une diminution de la fluidité membranaire et d'une augmentation de la fragilité osmotique des globules rouges destinés à être re-transfusés. L'évaluation de marqueurs du stress oxydant au niveau des membranes de globules rouges a également montré que les cellules étaient soumises à un stress oxydant durant les processus de concentration-lavage. Cette étude préliminaire devrait être complétée par la réalisation d'une étude à plus grande échelle, afin d'étudier l'influence du phénotype d'haptoglobine sur la susceptibilité des individus bénéficiant d'une récupération sanguine péri-opératoire à développer un stress oxydant. Une autre étude à envisager est d'évaluer l'intérêt de l'utilisation d'anti-oxydants pour prévenir le stress oxydant pouvant survenir à la suite d'une récupération sanguine péri-opératoire, l'objectif étant en particulier d'améliorer l'efficacité transfusionnelle. Toujours est-il que les résultats obtenus montrent clairement que, compte-tenu des effets délétères de l'hémoglobine extra-érythrocytaire, des efforts doivent être réalisés en vue de maîtriser l'hémolyse au cours de la récupération sanguine péri-opératoire.

## Références bibliographiques

- Abraham, NG., Da Silva, JL., Dunn, MW., Kigasawa, K., Shibahara, S. (1998). Retinal pigment epithelial cell-based gene therapy against hemoglobin toxicity. Int J Mol Med **1** (4) : 657-663.
- Adams, EC., Weiss MR. (1969). Calorimetric studies of the haemoglobin-haptoglobin reaction. Biochem J **115** (3) : 441-447.
- Advani, R., Rubin, E., Mohandas, N., Schrier, SL. (1992). Oxidative red blood cell membrane injury in the pathophysiology of severe mouse  $\beta$  thalassemia. Blood **79** (4) : 1064-1067.
- Alayash, AI. (1999). Haemoglobin-based blood substitutes : oxygen carriers. Pressor agents, or oxidants ? Nat Biotechnol **17** (6) : 545-549.
- Allison, AC., Blumberg, BS., Rees, W. (1958). Haptoglobin types in British, Spanish Basque and Nigerian African population. Nature **181** (4612) : 824-825.
- Alonso, A., Visedo, G., Sancho, M., Fernandez-Piqueras, J. (1990). Characterization of human catalase by isoelectric focusing in presence of urea. Electrophoresis. **11** (8) : 635-638.
- Amler, E., Jasinska, R., Drahota, Z., Zborowski, J. (1990). Membrane lateral pressure as a modulator of glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity. FEBS Lett **271** (1-2) : 165-168.
- Ang, IL., Poon, TC., Lai, PB., Chan, AT., Ngai, SM., Hui, AY., Johnson, PJ., Sung, JJ. (2006). Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. J Proteome Res. **5** (10) : 2691-2700.
- Arcoleo, JP., Greer, J. (1982). Hemoglobin binding site and its relationship to the serine protease-like active site of haptoglobin. J Biol Chem **257** (17) : 10063-10068.
- Arredouani, M., Matthijs, P., Van Hoeyveld, E., Kasran, A., Baumann, H., Ceuppens, JL., Stevens, E. (2003). Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. Immunology. **108** (2) : 144-151.
- Asayama, K., Burr, IM. (1985). Rat superoxide dismutases. Purification, labeling, immunoassay, and tissue concentration. J Biol Chem. **260** (4) : 2212-2217.
- Asleh, R., Marsh, S., Shilkrot, M., Binah, O., Guetta, J., Lejbkowitz, F., Levy, NS., Levy, AP. (2003). Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. Circ Res **92** (11) : 1193-1200.
- Asleh, R., Guetta, J., Litman, SK., Lotan, RM., Levy, AP. (2005) Haptoglobin genotype-and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. Circ Res **96** (4) : 435-441.
- Babior, BM. Oxidizing radicals and red cells destruction. (1981). Prog Clin Biol Res **51** : 173-195.
- Balla, J., Jacob, HS., Balla, G., Nath, K., Eaton, JW., Vercelotti, GM. (1993). Endothelial-cell heme uptake from heme proteins : induction of sensitisation and desensitisation to oxidant damage. Proc Natl Acad Sci **90** (20) : 9285-9289.
- Barclay, R. (1985). The role of iron in infection. Med Lab Sci **42** (2) : 166-177.

- Baseler, MW., Burrell, R. (1983). Purification of haptoglobin and its effects on lymphocyte and alveolar macrophage responses. Inflammation **7** (4) : 387-400.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem **44** (1) : 276-287.
- Beaudeau, JL., Delattre, J., Peynet, J. Lipoprotéines et athérosclérose : mécanismes moléculaires et cellulaires. In Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique : 91-107. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 2003.
- Beaudeau, JL., Vasson, MP. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. In Delattre J, Beaudeau, JL, Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques : 45-86. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris, 2005.
- Beauvieux, MC., Peuchant, E. (2002). Le stress oxydant et ses marqueurs biologiques. Cahiers de nutrition et de diététique **37** (1) : 45-51.
- Benesch, RE., Ikeda, S., Benesch, R. (1976). Reaction of haptoglobin with hemoglobin covalently cross-linked between the  $\alpha\beta$  dimers. J Biol Chem **251** (2) : 465-470.
- Benzinger, TH., Kitzinger, C. Direct calorimetry by means of the gradient principle (1949) Rev Sci Instrum **20** (12) : 849-860.
- Bernini, LF., Borri-Voltattorni, C. (1970). Studies on the structure of human haptoglobins. I. Spontaneous refolding after extensive reduction and dissociation. Biochim Biophys Acta **200** (2) : 203-219.
- Berr, C., Nicole, A., Godin, J., Ceballos-Picot, I., Thevenin, M., Dartigues, JF., Alperovitch, A. (1993). Selenium and oxygen-metabolizing enzymes in elderly community residents : a pilot epidemiological study. J Am Geriatr Soc **41** (2) : 143-148.
- Beutler, E. Osmotic fragility. In Williams JW. Beutler E, Erslev AJ. Rundles RW (eds) : Hematology (ed 2). New York, McGraw-Hill, 1977, p 1609.
- Bias, WB., Zachary, AA. Basic principles of paternity determination. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. Manual of clinical laboratory immunology, 3<sup>th</sup> ed. Washington, DC : Am Soc for Microbiol, 1986 : 902-911.
- Bienvenu, J. (1984). Les protéines de la réaction inflammatoire. Définition, physiologie et méthodes de dosage. Ann. Biol Clin **42** : 47-52.
- Bieth, J. (1974) Some kinetic consequences of the tight binding of protein-proteinase-inhibitors to proteolytic enzymes and their application to the determination of dissociation constants. Bayer-symposium V "proteinase inhibitors", 463-469 by Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Black, JA., Dixon, GH. (1968). Amino-acid sequence of alpha-chains of human haptoglobins. Nature **218** (5143) : 736-741.
- Blackwell, RQ. (1963). Thephusdin C. Distribution of haptoglobin among Thais. Nature **197** : 503.
- Blundell, J.(1818). Experiments on the transfusion of blood by the syringe. Med Chir Trans **9** : 56-92.
- Boggs, DR. (1967) The kinetics of neutrophils leukocytes in health and disease. Semin.Hematol. **4** : 359-386

- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Beaudoux, JL., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J. (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? Ann Biol Clin **59** (4) : 453-459.
- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. Radicaux libres et anti-oxydants. In Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires : 59-81. Médecine-sciences Flammarion Paris, 2003.
- Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, JL., Delattre, J. In Delattre J, Beaudoux, JL, Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques : 147-167. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris, 2005.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Satan, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies. Methods in Enzymol **186** : 343-355.
- Boudier, C., Gils, Ann., Declerck, JP., Bieth, JG. (2005). The conversion of active to latent plasminogen activator inhibitor-1 is an energetically silent event. Biophys J **88** (4) : 2848-2854.
- Boulière, M. Comment évaluer la fibrose hépatique en dehors de la PBH ? 23<sup>e</sup> journées nationales de formation continue en hépato-gastro-entérologie ; Paris, 2005.
- Boussuyt, X, Blanckaert, N. (1999). Evaluation of interferences in rate and fixed-time nephelometric assays of specific serum proteins. Clin Chem **45** : 62-67.
- Bowman, BH., Kurosky, A. (1982). Haptoglobin : the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. Adv Hum Genet **12** : 189-261.
- Bowman, BH., Barnett, DR., Lum, JB., Yang, F. (1988). Haptoglobin. Methods Enzymol. **163** : 452-474.
- Bowman, BH. Haptoglobin. In Bowman, BH., ed. Hepatic plasma proteins. San Diego : Academic Press.1993 : 159-167.
- Bowman, JE. (1964). Haptoglobin and transferrin differences in some Iranian populations. Nature **201** : 88.
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72** : 248-254.
- Brando, R., Lara, FS., Pagliosa, LB., Soares, FA., Rocha, JB., Nogueira, CW., Farina, M. (2005). Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. Drug Chem Toxicol **28** (4) : 397-407.
- Braun HJ, Aly FW. (1969). Problems in the quantitative estimation of human serum haptoglobin by single radial immunodiffusion. Clin Chim Acta **26** (3) : 588-590.
- Bricard, H., Zerr, C., Levesque, C., Thomassin, C. Transfusion autologue. Techniques.1-17. In : Encycl Méd Chir, 36736 A 10 : anesthésie réanimation. Editions Techniques, Paris, 1992.
- Buechler, C. Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J., Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. J Leukoc Biol **67** (1) : 97-103.
- Buege, JA., Aust, SD. (1978). Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol **52** : 302-310.

- Buehler, PW., Alayash, AI. (2004). Toxicities of hemoglobin solutions: in search of in-vitro and in-vivo model systems. Transfusion **44** (10) : 1516-1530.
- Cadenas, E., Davies, JA. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. Free Radic Biol Med **29**(3-4) : 222-230.
- Carini, M., Aldini, G., Bombardelli, P., Morazzoni, R., Facino, RM. (2000). UVB-induced hemolysis of rat erythrocytes: Protective effect of procyanidins from grape seeds. Life Sci **67** (15) : 1799-1814.
- Cassatt, JC., Steinhardt, J. (1971). Effects of pH on the rate of acid denaturation of horse oxy-deoxy-, and other ferrohemo-globins. Biochemistry **10** (2) : 264-269.
- Ceballos-Picot, I., Trivier, JM., Nicole, A., Sinet, PM., Thevenin, M. (1992). Age-corrated modifications of copper-zinc dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem **38** (1) : 66-70.
- Chance, B. In Enzymes and enzyme system, J.T. Edsall Editor Harvard University Press, Cambridge, 1951 p 93.
- Chapelle, JP., Albert, A., Smeets, JP., Heusghem, C., Kulbertus, HE. (1982). Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct. N Engl J Med. **307** (8) : 457-463.
- Chernomordik, LV., Sowers, AE. (1991). Evidence that the spectrin network and a nonosmotic force control the fusion product morphology in electrofused erythrocyte ghosts. Biophys J **60** (5) : 1026-1037.
- Chiu, D., Vichinsky, E., Yee, M., Kleman, K., Lubin, B. (1982). Peroxidation, vitamin E, and sickle-cell anemia. Ann N Y Acad Sci. **393** : 323-335.
- Cid, MC., Grant, DS., Hoffman, GS., Auerbach, R., Fauci, AS., Kleinman, HK. (1993). Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. J Clin Invest **91** (3) : 977-985.
- Clamp, AG., Ladha, S., Clark, DC., Grimble, RF., Lund, EK. (1997). The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. Lipids **32** (2) : 179-184.
- Clements, DH., Sculco, TP., Burke, SW., Mayer, K., Levine, DB. (1992). Salvage and reinfusion of postoperative sanguineous wound drainage. J Bone and Join Surgery **74** (5) : 646-651.
- Clifford, PC., Fruger, AR., Smith, A., Chant, ADB., Webster, JHH. (1987). Salvage autotransfusion in aortic surgery: initial studies using a disposable reservoir. Br J Surg **74** (8) : 755-757.
- Colado Simao, AN., Suzukawa, AA., Casado, MF., Oliviera, RD., Guarnier, FA., Cecchini, R. (2006). Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2, 2'- azobis (amidinopropane). Life Sci **78** (11) : 1202-1210.
- Collins, P., Burman, J., Chung, H., Fox, K. (1993). Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries in vivo. Circulation **87** (1) : 80-85.
- Colmar, M., Renaud, B., Artieres, X., Gangloff, S., Le Guep, AR. (2004). Autotransfusion périopératoire et prothèse totale du genou. Indications et résultats à propos d'une série de 68 cas. Ann Orthop Ouest **36** : 89-92.

- Comings, DE. (1980). Arrangement of chromatin in the nucleus. Hum. Genet. **53** : 131-143.
- Conconi, M., Szweda, LI., Levine, R.L., Stadtman, ER., Friguët, B. (1996). Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. Arch. Biochem. Biophys. **331** (2) : 232-240.
- Conconi, M., Friguët, B. (1997). Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of heat shock protein 90. Mol. Biol. Rep. **24** : 45-50.
- Conconi, M., Petropoulos, I., Emod, I., Turlin, E., Biville, F., Friguët, B. (1998). Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. Biochem J **333** (2) : 407-415.
- Connell, GE., Smithies, O. (1959). Human haptoglobins : estimation and purification. Biochem J **72** (1) : 115-121.
- Cook, PR., Brazell, IA. (1976). Conformational constraints in nuclear DNA. J. Cell Science **22** : 287-302.
- Cracowski, JL., Stanke-Labesque, F., Souvignet, C., Bessard, G. (2000). Isoprostanes : nouveaux marqueurs du stress oxydant en pathologie humaine. Presse Med **29** (11) : 604-610.
- Creteur, J., Sibbald, W., Vincent, JL. (2000). Hemoglobins solutions - not just red blood cell substitutes. Crit Care Med **28** (8) : 3025-3034.
- Cruz-Silva, MM., Madeira, VMC., Almeida, LM., Custodio, JBA. (2000). Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. Biochim. Biophys Acta **1464** (1) : 49-61.
- Cutler, P. (1989). Desferoxamine therapy in high ferritin diabets. Diabetes. **38** (10) : 1207-1210.
- Dariyerli, N., Toplan, S., Akyolcu, MC., Hatemi, H., Yigit, G. (2004). Erythrocyte osmotic fragility and oxidative stress in experimental hypothyroidism. Endocrine **25** (1) : 1-5.
- D'Armiento, J., Dalal, SS., Chada, K. (1997). Tissue, temporal and inducible expression pattern of haptoglobin in mice. Gene **195** (1) : 19-27.
- Davies, KJA. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I- General aspects. J Biol Chem **262** : 9895-9901.
- Davies, MJ., Fu, S., Wang, H., Dean, RT. (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Radic Biol Med **27** (11-12) : 1151-1163.
- De Kleijn, DP., Smeets, MB., Kemmeren, PP., Lim, SK., Van Middelaar, BJ., Velema, E., Schoneveld, A., Pasterkamp, G., Borst, C. (2002). Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring. FASEB J **16**: 1123-1125.
- Delanghe, JR., Duprez, DA., De Buyzere, ML., Bergez, BM., Callens, BY., Leroux-Roels, GG., Clement, DL. (1993). Haptoglobin polymorphism and complications in established essential arterial hypertension. J Hypertens **11** (8) : 861-867.
- Delanghe, JR., Duprez, DA., De Buyzere, ML., Bergez, BM., Claeys, LR., Leroux-Roels, GG., Clement, DL. (1995). Refractory hypertension is associated with the haptoglobin 2-2 phenotype. J Cardiovasc Risk. **2** (2) : 131-136.
- Delanghe, JR., Van Acker, J., Hemmer, R., Van der Groen, G., Van Wanzeele, F., Verhofstede, K. Haptoglobin polymorphism and progression of human immune



- deficiency virus infection [abstract]. Proceedings of the XVI international congress of clinical chemistry. London: Association of Clinical Biochemists, 1996 : 77.
- Delanghe, J., Cambier, B., Langlois, M., De Buyzere, M., Neels, H., De Bacquer, D., Van Cauwelaert, P. (1997). Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery. Atherosclerosis **132** (2) : 215-219.
- Delanghe J, De Hemptinne, B., Vandebussche, H., Troisi, R., Langlois, MR., Decruyenaere, J. (1998a). Donor organ haptoglobin phenotype determines outcome in liver transplantation following hepatitis. Clin Chem **44** : A159.
- Delanghe, J., Langlois, M., De Buyzere, (1998b). Congenital anhaptoglobinemia versus acquired hypohaptoglobinemia. Blood. **91** (9) : 3524.
- Delanghe, J., Langlois, MR., Bolaert, JR. (1998c). Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. AIDS. **12** (9) : 1027-1032.
- Delanghe, J., Allcock, K., Langlois, M., Claeys, L., De Buyzere, M. (2000). Fast determination of haptoglobin phenotype and calculation of Hb binding capacity using high pressure gel permeation chromatography. Clin Chim Acta **291** (1) : 43-51.
- Delattre, J., Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D. Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In Delattre J, Beaudeau, JL, Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques : 281-351. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris, 2005.
- Delers, F., Lombart, C., Domingo, M., Musquera, S. (1981). A novel and specific method for the purification of hemoglobin-binding proteins. Analyt Biochem **118** (2) : 353-357.
- Demple B, (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. Annu Rev Genet. **25** : 315-337.
- Dickerson, RE., Geis, I. In Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, 1983 : 20-64.
- Dizdaroglu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. Free Radic Biol Med **10** (3-4) : 225-242.
- Dobryszczycka, W., Przyiecki, B. (1984). Structural similarities among concanavalin A, haptoglobin, and trypsin. FEBS lett **171** (1) : 85-88.
- Dobryszczycka, W (1992). Relevance of haptoglobin in clinical medicine. Folia Histochem Cytobiol. **30** (4) : 197-200.
- Dobryszczycka, W. (1997). Biological function of haptoglobin: new pieces to an puzzle. Eur J Clin Chem Clin Biochem **35** (9) : 647-654.
- Ducan, J. (1886). On reinfusion of blood in primary and other amputations. Br Med J **19** : 192-193.
- Duchateau, J., Nevelsteen, A., Suy, R., Demeyere, R., Vandecraen, J., Goossens, M., Bogaerts, M., Arnout, J., Vermylen, J. (1990). Autotransfusion during aorto-iliac surgery. Eur J Vasc Surg **4** (4) : 349-354.
- Duwig, I., Camberlein, V., Irrman, C., Berezak, A., Waller, C., Laustriat, D., North, ML. (1989). Déformabilité et hémolyse des globules rouges traités par "Cell-Saver". Rev Fr Transfus Hémobio **32** : 67-68.
- Dyer, RH. Intraoperative autotransfusion. A preliminary report and new method. Am J Surg **112** (6) : 874-878.

- Easson, LH., Stedman, E. (1936). The absolute activity of cholineesterase. Proc. R. Soc. Lond. B **121** : 142-164.
- Eaton, JW., Brandt, P., Mahoney, JR., Lee, JT. (1982). Haptoglobin : a natural bacteriostat. Science **215** (4533) : 691-693.
- Edwards, DH., Griffith, TM., Ryley, HC., Henderson, AH. (1986). Haptoglobin-haemoglobin complex in human plasma inhibits endothelium dependent relaxation: evidence that endothelium derived relaxing factor acts as a local autocoid. Cardiovasc Res **20** (8) : 549-556.
- El Ghmati, SM., Van Hoeyveld, EM., Van Strijp, JG., Ceuppens, JL., Stevens, EA. (1996). Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. J Immunol. **156** (7) : 2542-2552.
- Elson EC. (1974). Quantitative determination of serum haptoglobin. A simple and rapid method. Am J Clin Pathol **62** (5) : 655-663.
- Endresen, GKM., Spiechowicz, J., Pahle, A., Espeland, B. (1991). Intraoperative autotransfusion hip joint surgery of patient with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Scand J rheumatol **20** (1) : 28-35.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med **13** (4) : 341-390.
- Everse, J., Hsia, N. The toxicities of native and modified hemoglobins. (1997). Free Radic Biol Med **22** (6) : 1075-1099.
- Fairbairn, DW., Olive, PL., O'Neill, KL. (1995). The comet assay : a comprehensive review. Mutat. Res. **339** : 37-59.
- Faure, P., Bonnefont-Rousselot, D. Stress oxydant, diabète sucré et produits de glycation avancée. In Delattre J, Beaudeau, JL, Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques : 354-376. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris, 2005.
- Favier A. (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Ann Biol Clin **55** (1) : 9-16.
- Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique 108-115.
- Fedoseeva, SV., Tusopova, MM., Chukanova, VP., Pospelov, LE. (1993). Course of infiltrating pulmonary tuberculosis depending on the patient's genotype. Probl Tuberk. **2** : 8-10.
- Ferard, G., Bienvenu, J., Lessinger, JM., Later, R. (1995). Un progrès décisif dans la transférabilité interlaboratoire des résultats grâce aux matériaux de référence d'enzymes et de protéines. Ann Biol Clin **53** : 469-471.
- Ferard, G., Imbert-Bismut; F., Messous, D., Piton, A., Abella, A., Burnat, P., Hainque, B., Glasser, N., Lessinger, JM. (2004). Influence of pyridoxal phosphate in measuring aminotransferases activities in patients with viral hepatitis. Ann Biol Clin **62** (6) : 717-720.
- Ferrali, M., Signorini, C., Ciccoli, L., Bambagioni, S., Rossi, V., Pompella, A., Comporti, M. (2000). Protection of erythrocytes against oxidative damage and autologous immunoglobulin G (IgG) binding by iron chelator fluor-benzoil-pyridoxal hydrazone. Biochem Pharmacol **59** (11) : 1365-73.

- Ferris, TG., Easterling, RE., Budd, RE. (1963). Determination of haptoglobin types by electrophoresis in acrylamide gel. Clin Chim Acta **8** : 792-793.
- Flohe, L., Gunzler, WA. (1984). Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. **105** :114-121
- Ford, ES., Cogswell, ME. (1999). Diabetes and serum ferritin concentrations among US adults. Diabetes care **22** (12) : 1978-1983.
- Friedrichs, WE., Navarrijo-Ashbaugh, AL., Bowman, BH., Yang, F. (1995). Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. Biochem Biophys Res Commun **209** (1) : 250-256.
- Fröhlander, N., Johnson, O. (1989). Haptoglobin groups in acute myocardial infarction. Hum Hered **39** (6) : 345-350.
- Funk, CD. (1996). The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenases-deficient mice. Biochim Biophys Acta **1304** (1) : 65-84.
- Galatius-Jensen, F. The haptoglobins. A genetical study. Thesis University Institute of forensic Medecine, Copenhagen, Danemark, 1960.
- Ganther, HE. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. Carcinogenesis **20** (19) : 1657-1666.
- Giblett, ER. (1959). Haptoglobin types in American negroes. Nature **183** (4655) : 192-193.
- Giulivi C, Davies KJA. (1990). A novel antioxydant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. J Biol Chem **265** : 19453-19460.
- Giulivi, C., Davies, KJ. (1994). Hydrogen peroxide-mediated ferrylhemoglobin generation in vitro and in red blood cells. Methods Enzymol **231** : 490-496.
- Giulivi, C., Cadenas, E. (1998). Heme protein radicals: Formation, fate, and biological consequences. Free Radic Biol Med **24** (2) : 269-279.
- Glaser, RW., Hausdorf, G. (1996). Binding kinetics of an antibody against HIV p24 core protein measured with real-time biomolecular interaction analysis suggest a slow conformational change in antigen p24. Journal Immunol Methods **189** (1) : 1-14.
- Glasscock, RJ. Hematuria and pigmenturia. In: Massry SG. Glascock RJ (eds) Textbook of Nephrology, vol 1, 2<sup>nd</sup> edn. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995 ; 557-566.
- Gogishvili, AV., Kavtaradze, VG., Mamaladze, GT., Arutiunova, MS., Takadze, GSH. (1985). Haptoglobin phenotype distribution in patients at high risk of developing myocardial infarct. Kardiologia. **25** (2) : 55-58.
- Gold, ME., Buga, GM., Wood, KS., Byrns, RE., Chaudhuri, G., Ignarro, LJ. (1990). Antagonistic modulatory roles of magnesium and calcium on release of endothelium-derived relaxing factor and smooth muscle tone. Cir Res **66** (2) : 355-366.
- Goldman, DW., Breyer, RJ., Yeh, D., Brockner-Ryan, BA., Alayash, AI. (1998). Acellular hemoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium: a role for ferryl iron. Am J Physiol **275** (3 Pt 2) : H1046-1053.

- Gorbunov, NV., Osipov, AN., Day, BW., Zayas-Rivera, B., Kagan, VE., Elsayed, NM. (1995). Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide : a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations. Biochemistry **34** (20) : 6689-6699.
- Gordon, S., Cleve, H., Bearn, AG. (1968). An improved method of preparing haptoglobin polypeptide chains using guanidine hydrochloride. Proc Soc Exp Biol Med. **127** (1) : 52-59.
- Graversen, JH., Madsen, M., Moestrup, SK. (2002). CD163 : a signal receptor scavenging haptoglobin-haemoglobin complexes from plasma. Int J Biochem Cell Biol **34** (4) : 309-314.
- Green, NM. (1966). Thermodynamics of the binding of biotin and some analogues by avidin. Biochem J **101** (3) : 774-780.
- Green, SJ. (1995). Nitric oxide in mucosal immunity. Nat Med **1** (6) : 515-517.
- Griffith, TM., Edwards, DH., Lewis, MJ., Newby, AC., Henderson, AH. (1984). The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. Nature **308** (5960) : 645-647.
- Grune, T., Schoenheit, K., Blasig, I., Siems, W. (1994). Reduced 4-hydroxynonenal degradation in hearts of spontaneously hypertensive rats during normoxia and postischemic reperfusion. Cell Biochem Fun. **12** : 143-147.
- Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M., Davies, KJA. (1995). Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress-role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. J. Biol. Chem. **270** : 2344-2351.
- Grune, T., Reinheckel, T., Davies, KJA. (1996). Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. J. Biol. Chem. **271** : 15504-15509
- Grune, T., Blasig, IE., Sitte, N., Roloff, E.; Haseloff, R.; Davies, KJA. (1998). Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. J Biol Chem. **273** : 10857-10862.
- Guder, WG., Narayanan, S., Wisser, H., Zawta, B., editors. Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. Darmstadt: GIT Verlag GmbH, 1996.
- Guetta, J., Strauss, M., Levy, NS., Fahoum, L., Levy, AP. (2006). Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free haemoglobin. Atherosclerosis doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.032
- Gutteridge, JM., Stocks, J., Dormandy, TL. (1974). Thiobarbituric acid - reactive substances derived from autoxidizing linoleic and linolenic acids. Anal Chim Acta **70** (1) : 107-111.
- Gutteridge, JM. (1987). The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. Biochim Biophys Acta **917** (2) : 219-223.
- Gutteridge, JMC. (1992). Invited review free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequence. Free Rad Res Comm **19** : 598-620.
- Gutteridge, JMC. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem **41** (12) : 1819-1828.
- Haber, F., Weiss, J. (1934). the catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc R Soc A **147** : 332

- Haines, JL., Panter, SS., Rich, SS., Eaton, JW., Tsai, MY., Anderson, VE. (1986). Reduced plasma haptoglobin and urinary taurine in familial seizures identified through the multisib strategy. Am J Med Gen. **24** (4) : 723-734.
- Halfon, P., Imbert-Bismut, F., Messous, D., Antoniotti, G., Benchetrit, D., Cart-Lamy, P., Delaporte, G., Doutheau, D., Klump, T., Sala, M., Thibaud, D., Trepo, E., Thabut, D., Myers, RP. (2002). A prospective assessment of the inter-laboratory variability of biochemical markers of fibrosis (FibroTest) and activity (ActiTest) in patients with chronic liver disease. Comp Hepatol. **1** (1) : 3.
- Hall, DR., Cann, JR., Winzor, DJ. (1996). Demonstration of an upper limit to the range of association rate constants amenable to study by biosensor technology based on surface plasmon resonance. Anal Biochem **235** (2) : 175-184.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overview. In Methods in Enzymology. Academic Press, San Diego 1990 **186** : 1-85.
- Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr **57** (5Suppl) : S715-S725.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. In Halliwell B., Gutteridge JMC, eds, 1999a : 1-543.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Free radicals in biology and medicine, 3<sup>rd</sup> ed Oxford University Press 1999b ; 396.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Reactive species as useful biomolecules. In : Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, England: Oxford University Press; 2000 : 467-481.
- Hamaguchi, H. (1969). Purification and some properties of the three common genetic types of haptoglobins and the hemoglobin-haptoglobin complexes. Am J Hum Genet **21** (5) : 440-456.
- Hanahan, DJ., Ekholm, JE. The preparation of red cell ghosts (membranes). In Fleischer, S.; Packer, L., eds. Subcellular fractions and derived membranes, part A. Methods in enzymology, volume 331. San Diego : Academic Press ; 1974 : 168-172.
- Hanasaki, K., Powell, LD., Varki, A. (1995). Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin. J Biol Chem. **270** (13) : 7543-7550.
- Hanley, JM., Heath, EC. (1985). A novel proteolytic activity in serum processes rat prohaptoglobin. Arch Biochem Biophys **239** : 404-419.
- Hansson, LO., Einarsson, R., Johansson, JO., Hjalmarsson, K. Typing of haptoglobin using PhastSystem. Application note 373 PhastSystem. Amersham Biosciences AB 1998.
- Haute Autorité de Santé. Récupération de sang périopératoire (RSPO) suivie de son administration par voie veineuse. Service évaluation médico-économique et santé publique. Haute Autorité de Santé (HAS) juillet 2006, Paris (France).
- Hayam, I., Cogan, U., Mokady, S. (1993). Dietary oxidized oil enhances the activity of (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>) ATPase and acetylcholinesterase and lowers the fluidity of rat erythrocyte membrane. J Nutr Biochem **4** : 563-568.

- Heddel, NM., Brox, WT., Klama, LN., Dickson, LL., Levine, MN. (1992). A randomized trial on the efficacy of an autologous blood drainage and transfusion device in patients undergoing elective knee arthroplasty. Transfusion **32** (8) : 742-746.
- Herman-Boussier, G., Moretti, J., Jayle, MF. (1960). Etude de l'haptoglobine: Préparation des haptoglobines humaines des types I et II. Bull Soc Chim Biol **42** : 817-835.
- Hess, JR., Rugg, N., Knapp, AD., Gormas, JF., Silberstein, EB., Greenwalt, TJ. (2001). RBC storage for 11 weeks. Transfusion **41** (12) : 11586-11590.
- Hever, O. (1969). Relations entre les phénotypes d'haptoglobine dans diverses maladies. Presse Méd **30** : 1081-1082.
- Higa, Y., Oshiro, S., Kino, K., Tsunoo, H., Nakajima, H. (1981). Catabolism of globin-haptoglobin in liver cells after intravenous administration of hemoglobin-haptoglobin to rats. J Biol Chem **256** (23) : 12322-12328.
- Hochberg, I., Roguin, A., Nikolsky, E., Chandrashekar, PV., Cohen, S., Levy, AP. (2002). Haptoglobin phenotype and coronary artery collaterals in diabetic patients. Atherosclerosis **161**: 441-446.
- Hochgraf, E., Mokady, S., Cogan, U. (1997). Dietary oxidized linoleic acid modifies lipid composition of rat liver microsomes and increases their fluidity. J Nutr **127** (5) : 681-686.
- Hope, MJ., Bally MB., Webb, G., Cullis, PR. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. Biochim Biophys Acta, **812** (1) : 55-65.
- Horst, HM., Dlugos, S., Fath, JJ., Sorensoen, VJ., Obeid, FN., Bivins, BA. (1992). Coagulopathy and intraoperative blood salvage. J Trauma **32** (5) : 646-652.
- Hwang, PK., Greer, J. (1979). Identification of residues involved in the binding of hemoglobin alpha chains to haptoglobin. J Biol Chem **254** (7) : 2265-2270.
- Hwang, PK., Greer, J. (1980). Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin-haptoglobin complex. J Biol Chem **255** (7) : 3038-3041.
- Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Pieroni, L., Charlotte, F., Benhamou, Y., Poynard, T. (2001). Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection : a prospective study. Lancet **357** : 1069-1075.
- Imbert-Bismut, F., Messous, D., Thibaut, V., Myers, RB., Piton, A., Thabut, D., Devers, L., Hainque, B., Mercadier, A., Poynard, T. (2004). Intra-laboratory analytical variability of biochemical markers of fibrosis (Fibrotest®) and activity (Actitest®) and reference ranges in healthy blood donors. Clin Chem Lab Med **42** (6) : 323-333.
- Institut National de Transfusion Sanguine. (2000). Glossaire illustré relatif aux dispositifs médicaux à usage unique de récupération par centrifugation et lavage per et postopératoire. <http://www.ints.fr/materiov/identification/recupglo.htm>.
- Jackson, JK., Winternitz, CI., Burt, HM. (1996). Mechanism of hemolysis of human erythrocytes exposed to monosodium urate monohydrate crystals. Preliminary characterization of membrane pores. Biochim Biophys Acta **1282** (1) : 45-52.
- Jain, SK., Mohandas, N., Clark, MR., Shobel, SB. (1983). The effect of malonyldialdehyde, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and <sup>51</sup>Cr-survival of erythrocytes. Br J Haematol **53** (2) : 247-252.

- Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, JM., Nouvelot, A. (1995) Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. Neuroreport **7** (1) : 333-337.
- Javid, J. (1965). The effect of haptoglobin polymer size on hemoglobin binding capacity. Vox Sang **10** : 320-325.
- Javid, J., Liang, JC. (1973). The hemoglobin-haptoglobin bond. I. Dissociation of the complex and recovery of the native haptoglobin in an affinity chromatography system. J Lab Clin Med. **82** (6) : 991-1002.
- Javid J. (1978). Human haptoglobins. Curr top Hematol **1** : 151-192.
- Jayle, MF., Judas, O. (1946). Formule glycoprotidique du plasma sanguin. Helv Chim Acta **61** : 629-641.
- Jayle, MF. (1951). Méthode de dosage de l'haptoglobine sérique. Bull Soc Chim Biol **33** (7) : 876-880.
- Jelesarov II., Leder L., Bosshard, HR. (1996). Probing the Energetics of Antigen-Antibody Recognition by Titration Microcalorimetry. Methods **9** (3) : 533-541.
- John, A., Hence, J., Morich, FJ. (1985). Identification of a so-far not characterized human serum protein associated with essential hypertension. Electrophoresis **6** : 292-295.
- Jue, DM., Shim, BS., Kang, YS. Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. (1983). Mol Cell Biochem **51** (2) : 141-147.
- Kalra, M., Beech, MJ., Al-Khaffaf, H., Charlesworth, D. (1993). Autotransfusion in aortic surgery: the Haemocell System 350 cell saver. Br J Surg **80** (1) : 32-35.
- Kalsheker, NA., Bradwell, AR., Burnett, D. (1981). The inhibition of cathepsin B by plasma haptoglobin biochemistry (enzymes, metabolism). Experientia **37** (5) 447-448.
- Kanakoudi, F., Drossou, V., Tzimouli, V., Diamanti, E., Konstantinidis, T., Germenis, A., Kremenopoulos, G. (1995). Serum concentrations of 10 acute-phase proteins in healthy term and preterm infants from birth to age 6 months. Clin Chem **41** (4) : 605-608.
- Kanner, J., Harel, S. (1985). Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. Arch Biochem Biophys **237** (2) : 314-321.
- Kasvosve, I. Gomo ZA, R., Mvundura, E., Moyo, VM., Saungweme, T., Khumalo, H., Gordeuk, VR., Boelaert, JR., Delanghe, JR., De Bacquer, D., Gangaidzo, IT. (2000a). Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis **4** (8) : 771-775.
- Kasvosve, I. Gomo-ZA, R., Gangaidzo, IT., Mvundura, E., Saungweme, T., Moyo, VM. (2000b). Reference range of serum haptoglobin is haptoglobin phenotype-dependent in blacks. Clin Chimica Acta **296** (1-2) : 163-170.
- Katnik, I., Dobryszczyka, W. (1992). Development of concanavalin A - enzyme immunosorbent assay for glycated haptoglobin using polyclonal and monoclonal antibodies. J Immunoassay **13** (2) : 145-162.
- Katnik, I., Jadach, J. (1993). Immunoaffinity purification of human haptoglobin using monoclonal antibodies. Arch Immunol Ther Exp **41** (5-6) : 303-308.
- Katnik, I., Goodarzi, MT., Turner, GA. (1996). An improved ELISA for the determination of sialyl lewis (x) structures on purified glycoconjugates. Glycoconj J **13** (6) : 1043-1047.

- Keaney, JF. Jr., Schwaery, GT., Xu, A., Nicolosi, RJ., Loscalzo, J., Foxall, TL., Vita, JA. (1994). 17  $\beta$ -oestradiol preserves endothelium vasodilator function and limits low density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. Circulation **89** (5) : 2251-2259.
- Kelm, M., Feelisch, M., Spahr, R., Piper, HM., Noack, E., Schrader, J. (1988). Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun **154** (1) : 236-244.
- Kendall, PA., Saeed, SA., Collier, HOJ. (1979). Identification of endogenous inhibitor of prostaglandin synthetase with haptoglobin and albumin. Biochem Soc Trans **7**:543-545.
- Kent, P., Ashley, S., Thorley, PJ., Shaw, A., Parkin, P., Kester, RC. (1991). 24-hour survival of transfused red cells in elective aortic surgery: a comparison of two intraoperative autotransfusion systems. Br J Surg **78** (12) : 1473-1475.
- Kickler, TS., Gong, PF., Johnson, GF., Solomon, HM. (1976). Kinetic determination of serum haptoglobin with a centrifugal analyzer. Clin Chem **22** (12) : 1962-1967.
- Kino, K., Tsunoo, H., Higa, Y., Takami, M., Hamaguchi, H., Nakajima, H. (1980) Hemoglobin-haptoglobin receptor in rat liver plasma membrane. J Biol Chem **255** (20) : 9616-9620.
- Kitzinger, C., Steiner, RF. (1956). A calorimetric determination of the heat of an antigen-antibody reaction. J Biol Chem **222** (1) : 271-284.
- Klebanoff, G. (1970). Early clinical experience with a disposable unit for the intraoperative salvage and reinfusion of blood loss (intraoperative autotransfusion). Am J Surg **120** (6) : 718-722.
- Koch, W., Latz, W., Eichinger, M., Roguin, A., Levy, AP., Schomig, A. (2002). Genotyping of common haptoglobin polymorphism Hp 1/2 based on the polymerase chain reaction. Clin Chem **48** (9) : 1377-1782.
- Koda, Y., Soejima, M., Yoshika, N., Kimura H. (1998) The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaploglobinemia. Am J Hum Genet **62** (2) : 245-252.
- Koerselman, J., van der Graaf, Y., de Jaegere, PP. Grobbee, DE. (2003). Coronary collaterals: an important and underexposed aspect of coronary artery disease. Circulation **107** : 2507-2511.
- Krauth, W. & Werner, D. (1979) Analysis of the most tightly bound proteins in eukaryotic DNA. Biochim. Biophys. Acta **564** : 390-401.
- Krinsky, NI. (1989). Antioxydants function of carotenoides. Free Rad Biol Med **7** (6) : 617-635.
- Kristiansen, M., Graversen, JH., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, HJ., Law, SK., Moestrup, SK. (2001). Identification of the hemoglobin scavenger receptor. Nature **409** (6817) : 198-201.
- Kurosky, A., Barnett, DR., Lee, TH., Touchstone, B., Hay, RE., Arnott, MS., Bowman, BH., Fitch, WM. (1980). Covalent structure of human haptoglobin : a serine protease homog. Proc Natl Acad Sci **77** (6) : 3388-3392.
- Kushner, I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. Ann. N.Y. Acad. Sci **389** : 39-48.
- Lange, V., (1992). Haptoglobin polymorphism - not only a genetic marker. Anthropol Anz **50** (4) : 281-302.



- Langlois, MR., Delanghe, JR. (1996). Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. Clin Chem **42** (10) : 1589-1600.
- Langlois, MR., Delanghe, J., Philipe, J., Ouyang, J., Bernard, D., De Buyzere, M., Van Nooten, G., Leroux-Roels, G.(1997). Distribution of lymphocyte subsets in bone marrow and peripheral blood is associated with haptoglobin type. Binding of haptoglobin to the B-cell lectin CD22. Eur J Clin Chem Clin Biochem **35** (3) : 199-205.
- Langlois, MR., Martin, ME., Boelaert, JR. Beaumont, C., Taes, YE., De Byzere, ML., Bernard, DR., Neels, HM., Delanghe, JR. (2000). The haptoglobin 2-2 phenotype affects serum markers of iron status in healthy males. Clin Chem **46** (10) : 1619-1625.
- Laurell, CB. (1959a). Determination of the haptoglobin group. Scand J Clin Lab Invest **11** (1) : 18-19.
- Laurell, CB. (1959b). Purification and properties of different haptoglobins. Clin Chim Acta **4** (1) : 79-81.
- Laurent, P. (1984). Relation between acute phase proteins and body defense : application to the monitoring of infectious states. Ann Biol Clin **42** (1) : 53-59.
- Lavialle, F., Rogard, M., Alfsen, A. (1974). Calorimetric determination of the enthalpy and heat capacity changes for the association of haptoglobin with hemoglobin. I. Demonstration of two interacting systems. Biochemistry **13** (10) : 2231-2234.
- Lawrence-Brown, MM., Couch, C., Halliday, M., Hellings, M., Barr, A., Marshall, L. (1989). D-dimer levels in blood salvage for autotransfusion. Aust N Z J Surg **59** (1) : 67-70.
- Lazarous, DF., Shou, M., Scheinowitz, M., Hodge, E., Thirumurti, V., Kitsiou, AN., Stiber, JA., Lobo, AD., Hunsberger, S., Guetta, E., Epstein, SE., Unger, EF. (1996). Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. Circulation **94** : 1074–1082.
- Leder, L., Berger, C., Bornhauser, S., Wendt, H., Ackermann, F., Jelesarov, I., Bosshard, HR. (1995). Spectroscopic, calorimetric, and kinetic demonstration of conformational adaptation in peptide antibody recognition. Biochemistry **34** : 16509-16518.
- Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, JP., Thérond, P., Torreilles, J. (1998). Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. Ann Biol Clin **56** (3) : 305-319.
- Lefèvre, P., Begou, D., Vincentelli, F., Durand, JM., Grazzani, N., Merlhe, G., Grisoli, F. (1989). Autotransfusion by peroperative recuperation in neurosurgery. Preliminary study apropos of 40 cases. Neurochirurgie **35** (4) : 217-221.
- Lefèvre P. Quelle technique choisir pour récupérer en vue de sa réinjection , le sang épanché pendant l'intervention ? Le type de chirurgie constitue-t-il une contre-indication à la réutilisation de ce sang (cancer, infection) ? (1995) Ann Fr Anesth Réanim **14** (suppl 1) : 53-62.
- Lefèvre P. Matériel de récupération sanguine périopératoire. (2000). Encycl Méd Chir Anesth Réanim 36-735-B-50.
- Lenfant, F., Lahet, J., Chaillot, B., Freysz, M. (2004). The protective effects of lidocaïne on human erythrocytes stored for seven days at 4 °C. Cell Mol Biol Lett **9** (2) : 301-304.

- Lentz, BR., Burgess, SW. (1989). A dimerization model for the concentration dependent photophysical properties of diphenylhexatriene and its phospholipid derivatives. DPHpPC and DPHpPA. Biophys J **56** (4) : 723-733.
- Lessinger, JM., Schiele, F., Vialle, A., Ferard, G., Myara, A., Guechot, J., Imbert-Bismut, F., Lasnier, E., Piton, A., Voitot, H. (2002). Le calibrage en enzymologie clinique : principe, conditions d'application et résultats. Ann Biol Clin **60** (3) : 281-286.
- Levin, G., Cogan, U., Mokady, S. (1990). Riboflavin deficiency and the function and fluidity of rat erythrocyte membranes. J Nutr **120** (8) : 857-861.
- Levine, RL., Garland, D., Oliver, CN., Amici, A., Climent, I., Lenz, AG., Ahn, BW., Shaltiel, S., Stadtman, ER. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol **186** : 464-478.
- Levine, RL., William, JA., Stadtman, ER., Shacter, E. (1994). Carbonyls assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol **233** : 346-347.
- Levine, SA., Kidd, PM. Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California. Eds A. Biocurrents division, Allergy Research Group, 1996.
- Levy, AP., Roguin, A., Hochberg, I., Herer, P., Marsh, S., Nakhoul, FM. (2000). Haptoglobin phenotype and vascular complications in patients with diabetes. N Engl J Med **343** (13) : 969-970.
- Levy, AP., Hochberg, I., Jablonski, K., Resnick, HE., Lee, ET., Best, L., Howard, BV. (2002). Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The Strong Heart Study. J Am Coll Cardiol **40** (11) : 1984-1990.
- Levy, AP. (2006). Application of pharmacogenomics in the prevention of diabetic cardiovascular disease : Mechanistic basis and clinical evidence for utilization of the haptoglobin genotype in determining benefit from antioxidant therapy. Pharmacol Ther **112**(2) : 501-512.
- Levy, NS., Levy, AP. (2004). ELISA for determination of the haptoglobin phenotype. Clin Chem **50** (11) : 2148-2150.
- Liau, CY., Chang, TM., Pan, JP., Chen, WL., Mao, SJT. (2003). Purification of human plasma haptoglobin by hemoglobin-affinity column chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **790** (1-2) : 209-216.
- Lim, SK., Kim, H., Ali, A., Lim, YK., Wang, Y., Chong, SM., Costantini, F., Baumman, H. 1998. Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. Blood. **92** (6) : 1870-1877.
- Lim, YK., Jenner, A., Ali, AB. Wang, Y., Hsu, SI., Chong, SM., Baumman, H., Halliwell, B., Lim, SK. (2000). Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. Kidney Int. **58** (3) : 1033-1044.
- Lim, SK., Ferraro, B., Moore, K., Halliwell, B. (2001). Role of haptoglobin in free hemoglobin metabolism. Redox Report **6** (4) : 219-227.
- Livingstone, JR. (1996). Antibody characterization by isothermal titration calorimetry. Nature **384** (6608) : 491-492.
- Lohr, NL., Warltier, DC., Chilian WM., Weihrauch, D. Haptoglobin expression and activity during coronary collateralisation. ( 2005) Am J Physiol Heart Circ Physiol **288** : 1389-1395.

- Louagie, HK., Delanghe, J., De Sombere, I., De Buyere, M., Hauser, P., Leroux-Roels, GG. (1993). Haptoglobin polymorphism and immune response after hepatitis B vaccination. Vaccine **11** (12) : 1188-1190.
- Louagie, HK., Brouwer, JT., Delanghe, JR., De Buyere, ML., Leroux-Roels, GG. (1996). Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C. J Hepatol **25** : 10-14.
- Luten, M., Roerdinkholder, SB., Bost, HJ., Bosman, GJ. (2004). Survival of the fittest ? survival of stored red blood cells after transfusion. Cell Mol Biol **50** (2) : 197-203.
- Maeda, N. (1991). DNA polymorphisms in the controlling region of the haptoglobin genes: a molecular explanation for the haptoglobin 2-1 modified phenotype. Am J Hum Genet **49** (1) : 158-166.
- Maeda, S., Saikawa, Y., Kubota, T., Aoki, M., Otani, Y., Furukawa, T., Watanabe, M., Kumai, K., Kitajima, M. (2003) No cross-resistance of taxotere and taxol to conventional chemotherapeutic agents against gastric cancers as detected by MTT assay. Anticancer Res **23** (4) : 3147-3150.
- Maes, M., Scharpe, S., Van Grootel, L., Uyttenbroeck, W., Cooreman, W., Cosyns, P., Suys, E. (1992). Higher alpha 1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin and lower retinol binding protein plasma levels during depression: further evidence for the existence of an inflammatory response during that illness. J Affect Disord **24** (3) : 183-192.
- Maes, M., Delanghe, J., Scharpé, S., Meltzer, HY., Cosyns, P., Suy, E., Bosmans, E. (1994). Haptoglobin phenotypes and gene frequencies in unipolar major depression. Am J Psychiatry **151** : 112-116.
- Malliaraki, N., Mpliamplias, D., Kampa, M., Perakis, K., Margioris, AN., Castanas, E. (2003). Total and corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. BMC Nephrol **4** : 4.
- Mann, AC., Record, CO., Self, CH., Turner, GA. (1994). Monosaccharide composition of haptoglobin in liver disease and alcohol abuse : large changes in glycosylation associated with alcoholic liver disease. Clin Chim Acta **227** (1-2) : 68-78.
- Manoharan, A. (1997). Congenital haptoglobin deficiency. Blood **90** (4) : 1709-1720.
- Maridonneau, I., Braquet, P., Garay, RP. (1983). Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport damage induced by oxygen free radicals in human red blood cell membranes. J Biol Chem **258** (5) : 3107-3113.
- Marles, SL., McAlpine, PJ., Zelinski, T., Phillips, S., Maeda, N., Greenberg, CR. (1993). Identification of an uncommon haptoglobin type using DNA and protein analysis. Hum Genet **92** : 364-366.
- Martin, W., Villani, GM., Jothianandan, JV., Furchgott, RF.(1985). Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. J Pharmacol Exp Ther **232** (3) : 708-716.
- Matsunaga, T., Warltier, DC., Tessmer, J., Weihrauch, D., Simons, M., Chilian, WM. (2003). Expression of VEGF and angiopoietins-1 and -2 during ischemia-induced coronary angiogenesis. Am J Physiol Heart Circ Physiol **285** : H352-H358.
- McCormick, DJ., Atassi, MZ. (1990). Hemoglobin binding with haptoglobin: delineation of the haptoglobin binding site on the alpha-chain of human haemoglobin. J Protein Chem **9** (6) : 735-742.

- Melamed-Frank, M., Lache, O., Enav, BI., Szafranek, T., Levy, NS., Ricklis, RM. (2001). Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. Blood **98** (13) : 3693-3698.
- Mena, P., Maynar, M., Gutierrez, JM. (1991). Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. Int J Sports Med **12** (6) : 563-566.
- Miller, YI., Altamentova, SM., Shaklai, N. (1997). Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiating globin radical: antioxidant role of haptoglobin. Biochemistry **36** (40) : 12189-12198.
- Misra, HP, Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. J Biol Chem **247** (21) : 6960-6922.
- Mitchell, RJ. (1988). ABO-haptoglobin interaction in the white Australian population: further evidence from Tasmania. Gene Geogr **2** (2-3) : 123-127.
- Moatti, N. Athérosclérose: concepts actuels. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique: 83-90. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 2003.
- Moison, RM., Palinckx JJ., Roest, M., Houdkamp, E., Berger, HM. (1993). Induction of lipid peroxidation of pulmonary surfactant by plasma of preterm babies. Lancet **341** (8837) : 79-82.
- Montagnier, L., Olivier, R., Pasquier, C. Oxidative stress in cancer. AIDS, and neurodegenerative diseases. Marcel Dekker, New-York, 1998.
- Mortelmans, Y., Vermaut, G., Van Aken, H., Goossens, W., Boogaerts, M. (1994). Quality of salvaged red blood cells during total hip replacement: a comparison between the use of heparin and citrate as anticoagulants. Anesth Analg **79** : 357-363.
- Moullec, J., Fine, JM., Linhard, J. (1960) Les groupes d'haptoglobine dans un échantillon de population Africaine de Dakar. Revue d'hématologie **15** : 174-182.
- Nagababu, E., Rifkind, JM. (2000). Heme degradation during auto-oxidation of oxyhemoglobin. Biochem Biophys Res Commun **273** (3) : 839-845.
- Nagel, RL. (1967). Kinetics and mechanism of complex formation between hemoglobin and haptoglobin. J Biol Chem **242** (2) : 3428-3434.
- Nagel, RL., Etcheverry, R. (1963). Types of haptoglobins in Araucanian Indians of Chile. Nature **197** : 187-188.
- Naghibi, H., Tamura, A., Sturtevant, JM. (1995). Significant discrepancies between vant Hoff and calorimetric enthalpies. Pro Natl Acad Sci USA **92** (12) : 5597-5599.
- Nakai, K., Ohta, T., Sakuna, I. (1996). Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips : comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. J Cardiovasc Pharmacol **28** (1) : 115-123.
- Nakhoul, F., Marsh, S., Hochberg, I., Leibur, R., Miller, BP., Levy, AP. (2000). Haptoglobin genotype as a risk factor for diabetic retinopathy. JAMA **284** (10) : 1244-1245.
- Nakhoul, FM., Zoabi, R., Kanter, Y., Zoabi, M., Skorecki, K., Hochberg, I. (2001). Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. Diabetologia **44** (5) : 602-604.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J **6** (12) : 3051-3064.

- Neuzil, J., Stocker, R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. FEBS Lett **331** (3) : 281-284.
- Nevos, S., Sutton, H. (1979). Association between response to typhoid vaccination and known genetic markers. Am J Hum Genet **20** : 461-469.
- Nielsen, MJ., Petersen, SV., Jacobsen, C., Thirup, S., Enghild, JJ., Graversen, JH., Moestrup, SK. (2006). A unique loop extension in the serine protease domain of haptoglobin is essential for CD163 recognition of the haptoglobin-hemoglobin complex. J Biol Chem [Epub ahead of print].
- Niranjan, TG., Krishnakantha, TP. (2000). Membrane changes in rat erythrocyte ghosts on ghee feeding. Molecular and Cellular Biochemistry **204** (1-2) : 57-63.
- Nishiyama, T., Hanaoka, K. (2001). Hemolysis in stored red blood cell concentrates: modulation by haptoglobin or ulinastatin, a protease inhibitor. Crit Care Med **29** (10) : 1979-1982.
- Oberley L.W., Spitz, DR. (1985). Nitroblue tetrazolium. In 'Handbook of methods for oxygen radical research'. Greenwald R.A. Ed° CRC Press Boca Raton 217220
- O'Bryan, MK., Grima, J., Mruk, D., Cheng, CY. (1997). Haptoglobin is a Sertoli cell product in the rat seminiferous epithelium: its purification and regulation. J Androl **18** (6) : 637-645.
- Oh, SK., Paylotsky, N., Tauber, AI. (1990). Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. J Leukoc Biol **47** (2) :142-148.
- Oh, SK., Leung, MF., Knee, T., Williams, JM. (1987). Biological properties of suppressive E-receptor factor on lymphokine function. Eur J Immunol **17** (10) : 1403-1409.
- O'Shannessy, DJ., Winzor, D.J. (1996). Interpretation of deviations from pseudo-first-order kinetic behavior in the characterization of ligand binding by biosensor technology. Anal Biochem **236** : 275-283.
- Okazaki, T., Yanagisawa, Y., Nagai, T. (1996) Determination of intermediates of hemoglobin-haptoglobin complex of haptoglobin polymers by "Crossed hemoglobin electrophoresis". Anal Biochem **239** (2) : 123-129.
- Oliviero, S., Cortese, R. The human haptoglobin gene promoter: interleukin-6-response elements interact with a DNA-binding protein induced by interleukin-6. (1989). EMBO J **8** : 1145-1151.
- Ostrowski, RS., Travis, JC., Talley, ES. (1987). The association of Hp 1 and sickle cell disease. Hum Hered **37** : 193-195.
- Ouriel, K., Shortell, CK., Green, RM., De Weese, JA. (1993). Intraoperative autotransfusion in aortic surgery. J Vasc surg **18** : 16-22.
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. Am J Clin Nutr **53** (4) : 1050S-1055S.
- Padma, T., Valli, W. (1988). ABO blood, intestinal alkaline phosphatase and haptoglobine types in patients with serum hepatitis. Hum Hered **38** : 367-371.
- Paglia DE, Valentine WN. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. **70**(1) : 158-169

- Panter, SS., Sadrzadeh, SMH., Hallaway, PE., Haines, JL., Anderson, VE., Eaton, JW. (1985). Hypohaptoglobinemia associated with familial epilepsy. J Exp Med **161** (4) : 748-754.
- Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M. (1999). Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. Free Radic Biol Med **27** (9-10) : 1080-1086.
- Parasassi, T., Saporà, O., Giusti, AM., De Stasio, G., Ravagnan, G. (1991). Alterations in erythrocyte membrane lipids induced by low doses of ionizing radiation as revealed by 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence lifetime. Int J Radia Biol **59** (1) : 59-69.
- Pastewka, JV., Reed, RA., Ness, AT., Peacock, AC. (1973). An improved haptoglobin subtyping procedure using polyacrylamide gel electrophoresis. Haptoglobin gene frequency distribution among a group of blood bank donors. Anal Biochem **51** (1) 153-162.
- Pastewka, JV., Ness, AT., Peacock, AC. (1975). Hemoglobin binding by isolated polymeric proteins from human haptoglobin types 2-1 and 2-2. Some suggested polymer subunit compositions. Biochim Biophys Acta **386** (2) : 530-537.
- Peacock, AC., Pastewka, JV., Reed, RA., Nees, AT. (1970). Haptoglobin-hemoglobin interaction. Stoichiometry. Biochemistry **9** (11) : 2275-2280.
- Perutz, MF. (1965). Structure and function of haemoglobin: a tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin. J Mol Biol **13** : 646-668.
- Peynet, J., Beaudeau, JL., Legrand, A. Stress oxydant et athérosclérose. In Delattre J, Beaudeau, JL, Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques : 312-351. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris, 2005.
- Piessens, MF., Marien, G., Stevens, E. (1984). Decreased haptoglobin levels in respiratory allergy. Clin Allergy **14** (3) : 287-293.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J. (1999). Evaluation du stress oxydant : une réalité pour le médecin généraliste. Vaisseaux, Cœur, Poumon **4** : 148-154.
- Pincemail, J., Lecomte, J., Collart E., Castiaux, JP., Defraigne J. (2001). Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. Vaisseaux, Cœur, Poumons **6** (5) : 1-3.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, AF. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem Pharmacol **66** (8) :1499-1503.
- Polonovski, M., Jayle, MF. (1938). Existence dans le plasma humain d'une substance activant l'activité peroxydasique de l'hémoglobine. C R Soc Biol **129** : 457-461.
- Pouget, JP. (2000). Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées. Thèse, Grenoble, France.
- Poynard, T., Ratziu, V., Benmaov, Y., Di Martino, V., Bedossa, P., Opolon, P. (2000). Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. Semin Liver Dis **20** (1) : 47-55.
- Prior, RL., Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radic Biol Med **27** (11-12) : 1173-1181.
- Putnam, PW. The plasma proteins. Academic Press New York, 1975 ; 1-50.
- Rademacher, BE., Steele, WJ. (1987). A general method for the isolation of haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 from human plasma. Anal Biochem **160** (1) : 119-126.

- Rantapää Dahiqvist, S., Fröhlander, N. (1985). Haptoglobin groups and rheumatoid arthritis. Hum Hered **35** : 207-211.
- Rauchova, H., Drahota, Z., Koudelova, J. (1999). The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity. Physiol Res **48** (1) : 73-78.
- Raugei, G., Bensi, G., Colantuoni, V., Romano, V., Santoro, C., Costanzo, F., Cortese, R. (1983). Sequence of human haptoglobin cDNA: evidence that the alpha and beta subunits are coded by the same mRNA. Nucleic Acids Res **11** (17) : 5811-5819.
- Ray, JM., Flynn, JC., Bierman, AH. (1986). Erythrocyte survival following intraoperative autotransfusion in spinal surgery : An in vivo comparative study and 5-years update. Spine **11** (9) : 879-882.
- Raymond, S. (1962). A convenient apparatus for vertical gel electrophoresis. Clin Chem **8** : 455-470.
- Raynes, JG., Eagling, S., McAdam, KP. (1991). Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. Clin Exp Immunol **83** : 488-491.
- Richard, MJ., Belleville, FJ. Chalas, I. Ceballos-Picot, D., Vitoux, MJ. Boyer, Chaudière J., Favier, A. (1997). Glutathion peroxydase : son intérêt en biologie clinique. Ann Biol Clin **55** (3) : 195-208.
- Richard, MJ., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A., Favier, A. (1992a). Malonaldehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react thiobarbituric. Clin Chem. **38** : 704-709.
- Richard, MJ., Guiraud, P., Meo, J., Favier, A. (1992b). High-performance liquid chromatographic separation of malonodialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. J Chromat **577** : 9-18.
- Richards, DMC., Dean, RT., Jessup, W. (1988). Membrane proteins are critical targets in free radical mediated cytolysis. Biochim Biophys Acta **946** (2) : 281-288.
- Riddles, PW., Blakeley, RL., Zerneck, B. Ellman's reagent: (1979). 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - A reexamination. Anal Biochem **94** (1) : 75-81.
- Roberts, LJ., Moores, KP., Zackert, WE., Oates, JA., Morrow, JD. (1996). Identification of the major urinary metabolite of the  $\text{F}_2$ -isoprostanes 8-isoprostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  in humans. J Biol Chem **271** (34) : 20617-20620.
- Roberts, LJ., Morrow, JD. (2000). Measurement of the  $\text{F}_2$ -isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med **28** (4) : 505-513.
- Rohn, TT., Hinds, TR., Vincenzi, FF. (1996). Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  pump ATPase and the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump ATPase by iron-generated free radicals. Protection by 6,7-dimethyl-2,4-D1-1 pyrrolidiny-7H-pyrrolo[2,3-d] pyridine sulfate (U-89843D), a potent, novel, antioxidant/free radical scavenger. Biochem Pharmacol **51** (4) : 471-476.
- Rosencher, N., Ozier, Y., Conseiller, C. Autotransfusion per- et postopératoire. Conférences d'actualisation. Elsevier, Paris, et SFAR 1999 : 147-160.
- Rother, RP., Bell, L., Hillmen, P., Gladwin, MT. (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. A novel mechanism of human disease. JAMA **293** (13) : 1653-1662.

- Ryter, SW., Kvam, E., Tyrrell, RM. (2000). Heme oxygenase activity. Current methods and applications. Methods Mol Biol **99** : 369-391.
- Sadrzadeh, SMH., Graf, E., Panter, SS., Hallaway, PE., Eaton, JW. (1984). Hemoglobin, a biologic Fenton reagent. J Biol Chem **259** (23) : 14354-14356.
- Sadrzadeh, SMH., Anderson, DK., Panter, SS., Hallaway, PE., Eaton, JW. (1987). Hemoglobin potentiates central nervous system damage. J Clin Invest **79** (2) : 662-664.
- Sadrzadeh, SMH., Bozorgmehr, MD. (2004). Haptoglobin phenotypes in health and disorders. Am J Clin Pathol **121** (Suppl 1) : S97-S104.
- Sasaki, MS., Norman, A. (1966). DNA fiber from human lymphocytes nuclei. Exp. Cell Res. **66** : 642-645.
- Sasazuki, T., Tsunoo, H., Nakajima, H. (1974). Interaction of human hemoglobin with haptoglobin or antihemoglobin antibody. J Biol Chem **249** (8) : 2441-2446.
- Schuck, P., Minton, A.P. (1996). Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent wave biosensors. Anal Biochem **240** : 262-272.
- Schultz, A., Lavie, L., Hochberg, I., Beyar, R., Stone, T., Skorecki, K., Lavie, P., Roguin, A., Levy, AP. (1999). Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. Circulation **100** : 547-552.
- Schultze, HE. Heremans, JF., eds. Molecular biology of human proteins, vol 1 : nature and metabolism of extracellular proteins. Amsterdam: Elsevier, 1966 : 384-402.
- Schulpis, KH., Papassotiriou, I., Parthimos, T., Tsakiris, T., Tsakiris, S. (2006). The effect of L-cysteine and glutathione on inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by aspartame metabolites in human erythrocyte membrane. Eur J Clin Nutr **60** (5) : 593-597.
- Sen, CK. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. Med Sci Sports Exer **33** (3) : 368-370.
- Serrick, CJ., Scholz, M., Melo, A., Singh, O., Noel, D. (2003). Quality of red blood cells using autotransfusion devices: a comparative analysis. J Extra Corpor Technol. **35** (1) : 28-34.
- Sevanian, A., Hochstein, P. (1985). Mechanism and consequence of lipid peroxidation in biological systems. Ann Rev Nutr **5** : 365-390.
- Shim, BS., Jue, DM. (1984). Simple spectrophotometric determination of haptoglobin level in serum. Clin Chim Acta **136** (2-3) : 145-53
- Shindo, S. (1990). Haptoglobin subtyping with anti-haptoglobin alpha chain antibodies. Electrophoresis **11** (6) : 483-488.
- Siems, WG., Grune, T., Esterbauer, H. (1995) 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. Life Sci **57** : 785-789.
- Siems, WG., Zollner, H., Grune, T., Esterbauer, H. (1997). Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. J. Lipid Res **38** : 612-622.
- Signorini, C., Ferrali, M., Ciccoli, L., Sugherini, L., Magnani, A., Comporti, M. (1995). Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. FEBS Lett **362** (2) : 165-170.



- Silva, MM., Madeira, VM., Almeida, LM., Custodio, JB. (2000). Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. Biochim Biophys Acta **1464** : 49–61.
- Singh, NP., McCoy, MT., Tice, RR., Schneider, EL. (1988). A simple technic for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res **175** : 184-191.
- Siu, GM., Draper, HH. (1982). Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. Lipids **17** (5) : 349-355.
- Slater, TF. (1984). Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. Methods in Enzymol **105** : 283-305.
- Smith, H., Edman, P., Owen, JA. (1962). N-Terminal amino-acids of human haptoglobins. Nature **193** : 286-287.
- Smith, JA., Kolbuch-Braddon, M., Gillam, I., Telford, RD., Weidemann, MJ. (1995). Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise. Eur J Appl Physiol Occup Physiol **70** (5) : 427-436.
- Smithies, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal humans adults. Biochem J **61** (4) : 629-641.
- Smithies, O. (1959). An improved procedure for starch gel electrophoresis: future variations in the serum proteins of normal individuals. Biochem J **71** : 585-587.
- Smithies, O., Connell, GE., Dixon, GH. (1962). Inheritance of haptoglobin subtypes. Am J Hum Genet **14** : 14-21.
- Société de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation. 2<sup>e</sup> Conférence de Consensus Européen Réanimation et Médecine d'Urgence. 9 - 10 décembre 1993, Maison de la Chimie, Paris (France).
- Sohal, RS., Mockett, RJ., Orr, WC. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Rad Biol Med **33** (5) : 575-586.
- Souza, HP., Laurindo, FRM., Ziegelstein, RC., Berlowitz, CO., Zweier, JL. (2001). Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular activity control. Am J Physiol Heart Circ Physiol **280** (2) : H658-H667.
- Stadtman, ER. (1990). Metal-ion catalysed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. Free Rad Biol Med **9** (4) : 315-325.
- Stadtman, ER. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acids résidus in proteins by metal-catalysed reactions. Annu Rev Biochem **62** : 797-821.
- Standefer JC, Vanderjagt D. (1977). Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. Clin Chem **23** : 749-751.
- Standing, S., Price, CP. (1976). A kinetic method for the determination of haptoglobin as haemoglobin binding capacity. Clin Chim Acta **66** (3) : 393-403.
- Stanimirovic, DB., Wong, J., Ball, R., Durkin, JP. (1995). Free radical-induced endothelial membrane dysfunction at the site of blood-brain barrier: relationship between lipid peroxidation, Na,K-ATPase activity and <sup>51</sup>Cr release. Neurochem Res **20** (12) : 1417-1427.
- Steinbuch, M., Loeb, J. (1961). Isolation of an alpha2-globulin from human plasma. Nature **192** : 1196.

- Straus, OH., Goldstein, A. (1943). Zone behavior of enzymes. Illustrated by the effect of dissociation constant and dilution on the system cholinesterase-physostigmine. J. Gen. Physiol. **26**, 559-585.
- Stubbs, CD. Membrane fluidity: Structure and dynamics of membrane lipids. In: P.N. Campbell, R.D. Marshall (eds). Assays in Biochemistry. Academic Press, London, 1983 : 1-39.
- Sutton HE, Matson GA, Robinson AR, Kouchy RW. (1960). Distribution of haptoglobin, transferrin, and hemoglobin types among Indians of Southern Mexico and Guatemala. Am J Hum Genet:**12** : 338-347.
- Szebeni, J., Winterbourn, CC., Carrel, RW. (1984). Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid: A liposome model. Biochem J **220** (3) : 685-692.
- Tabbara, IA. (1992). Hemolytic anemias. Diagnostics and management. Med Clin North Am **76** (3) : 649-668.
- Takahashi, K., Avissar N, Whitin, J., Cohen, H. (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. Arch Biochem Biophys. **256** (2):677-686.
- Tam, SC., Wong, JT. (1988). Impairment of renal function by stroma-free hemoglobin in rats. J Lab Clin Med **111** (2) : 189-93.
- Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Davit-Spraul, A., Conti, M., Legrand A. (2000). Biomarkers of oxidative stress : an analytical approach. Curr Opin Nutr Metab Care **3** (5) : 373-384.
- Thérond, P., Denis, B. Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote : effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. In Delattre J, Beaudoux, JL, Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques : 114-167. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris, 2005.
- Thomas, L. Haptoglobin/hemopexin, In: Thomas L ed, Labor und Diagnose, 4<sup>th</sup> ed. Marburg : Medizinische Verlags 1992 : 813-820.
- Thompson, A., McGarry, AE., Valeri, CR., Lieberthal, W. (1994). Stroma-free haemoglobin increases blood pressure and GFR in the hypotensive rat: role of nitric oxide. J Appl Physiol **77** (5) : 2348-2354.
- Thompson, S., Dargan, E., Turner, GA. (1992). Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer. Cancer Lett **66** (1) : 43-48.
- Thorley, PJ., Shaw, A., Kent, P., Ashley, S., Parkin, A., Kester, RCTI. (1990). Dual tracer technique to measure salvaged red cell survival following autotransfusion in aortic surgery. Nucl Med Commun **11** (5) : 369-374.
- Tibbetts, J. (2002). Under construction: building a safer industry. Environ Health Perspect **110** (3) : A134-141.
- Tietz, NW., ed. Clinical guide to laboratory tests, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995 : 306-309.
- Tolasano, E., Fagoonee, S., Garuti, C., Valli, L., Andrews, NC., Altruda, F., Pietrangelo, A. (2005). Haptoglobin modifies the hemochromatosis phenotype in mice. Blood **105** (8) : 3353-3355.

- Torreilles, J., Guerin, MC. (1995). Free radicals and natural or synthetic chemiluminescent systems. C R Seances Soc Biol Fil. **189** (6) : 1149-1170.
- Tosa, N., Morimatsu, M., Nakagawa, M., Miyoshi, F., Uchida, E., Niiyama, M., Syuto, B., Saito, M. (1993). Purification and identification of a serum protein increased by antihelminthic drugs for *Dirofilaria immitis* in dogs. J Vet Med Sci **55** (1) : 27-31.
- Travis, JC., Sanders, BG. (1972). Haptoglobin evolution: polymeric forms of Hp in the Bovidae and Cervidae families, J Exp Zool **180** : 141-148.
- Tsamantanis, C., Delinassios, JG., Kottaridis, S., Christodoulou, C. (1980). Haptoglobin types in breast carcinoma. Hum Hered **30** : 44-45.
- Tseng, CF., Huang HY., Yang, YT, Mao, SJT. (2004a). Purification of human haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 using monoclonal antibody affinity chromatography. Protein Expr Purif **33** (2) : 265-273.
- Tseng, CF., Lin, CC., Huang, HY., Liu, HC., Mao, SJT. (2004b). Antioxidant role of human haptoglobin. Proteomics **4** (8) : 2221-2228.
- Tsumoto, K., Ogasahara, K., Ueda, Y., Watanabe, K., Yutani, K., and Kumagai, I.(1996). Role of salt bridge formation in antigen-antibody interaction – Entropic contribution to the complex between hen egg white lysozyme and its monoclonal antibody HyHEL10. J Biol Chem **271** (51) : 32612-32616.
- Ursini, F., Maiorino, M., Sevanian, A. Membrane hydroperoxides. In: Sies H, editor. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press; 1991 : 319-336.
- Urushibara, N., Kumazaki, T., Ishii, SI. (1992). Hemoglobin-binding site on human haptoglobin. J Biol Chem **267** (19) : 13413-13417.
- Valette, I., Waks, M., Weijman, JC., Arcoletto, JP., Greer, J. Haptoglobin heavy and light chains. Structural properties, reassembly, and formation of minicomplex with haemoglobin. J Biol Chem **256** (52) : 672-679.
- Van der Straten, A., Herzog, A., Cabezon, T., Bollen, A. (1984). Characterization of human haptoglobin cDNAs coding for alpha 2FS beta and alpha 1S beta variants. FEBS Lett **168** (1) : 103-107.
- Van Lente, F., Marchand, A., Galen, RS. (1979). Evaluation of a nephelometric assay for haptoglobin and its clinical usefulness. Clin Chem **25** (12) : 2007-2010.
- Van Rijn, H., Van Der wilt, W., stroes, JW., Schrijver, J. (1987). Is the turbidimetric immunoassay of haptoglobin phenotype-dependent ? Clin Biochem **20** (4) : 245-248.
- Van Sande, M., Van Ros, G., Druet, R. (1963). Determination of haptoglobin-groups frequencies by starch-gel and agar-gel electrophoresis : application to belgian and barundi populations. Nature **197** : 603-604.
- Van Ros, G., Van Sande, M. (1964). Méthode de dosage de l'haptoglobine humaine des liquides biologiques par électrophorèse en gel de gélose et valeurs obtenues chez des sujets normaux. Clin Chim Acta **10** : 62-72.
- Vlierberghe, VH., Langlois M., Delanghe, J. (2004). Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. Clin Chim Acta **345** : 35-42.
- Vo, PA., Reid, JJ., Rand, MJ. (1992). Attenuation of vasoconstriction by endogenous nitric oxide in rat caudal artery. Br J Pharmacol **107** (4) : 1121-1128.

- Wada, T., Oara, H., Watanabe, K., Kinohita, H., Nishio, H. (1970). Studies on haptoglobin synthesis in reticuloendothelial tissues. J Reticuloendothel Soc **8** (3) : 195-207.
- Wade, CR., Van Rij, AM. (1988). Plasma thiobarbituric reactivity : reaction conditions and the role of iron, antioxidants and lipid peroxy radicals on the quantification of plasma lipid peroxides. Life Sci **43** : 1085-1093.
- Waks, M., Alfsen, A. (1968a). Structural studies of haptoglobins. II. Reversible dissociation into subunits of Hp 1-1 and Hp 2-2. Arch Biochem Biophys **123** (1) : 133-144.
- Waks M, Alfsen A. (1968b). Crystallization of a protein-protein complex : hemoglobin-haptoglobin. Biochem Biophys Res Commun **32** (2) : 215-219.
- Waks M, Alfsen A, Schwaiger S, Mayer A. (1969). Structural studies of haptoglobins. III. Interactions with hemoglobin. Arch Biochem Biophys **132** (1) : 268-278.
- Waks, M., Kahn, PC., Beychok, S. (1971). Studies on the structures of haptoglobin 1-1 and hemoglobin in the haptoglobin-hemoglobin complex. Biochem Biophys Res Commun **45** (5) : 1232-1239.
- Wang, Z., Ciabattini, G., Creminon, C. (1995). Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  excretion in man. J pharm Exp Therap **275** : 94-100.
- Wardman, P., Candeias, LP. (1996). Fenton chemistry : an introduction. Radiat Res **145** (5) : 523-531.
- Wassel, J. (2000). Haptoglobin : function and polymorphism. Clin Lab **46** : 547-552.
- Wassdal, I., Myrset, AH. Helgeland, L. (1991). A simple and rapid method for purification of rat haptoglobin for production of antiserum. Scand. J. Clin. Lab. Invest **51** : 565-569.
- Wayner, DDM., Burton, GW., Ingold, KO., Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood by controlled peroxidation. FEBS Lett **187** : 33-37.
- Weihrauch, D., Tessmer, J., Warltier, DC., Chilian, WM. (1998). Repetitive coronary artery occlusions induce release of growth factors into the myocardial interstitium. Am J Physiol Heart Circ Physiol **275** : H969-H976.
- Weisbach, V., Riego, E., Strasser, E., Zingsem, J., Ringwald, R., Zimmermann, R. (2004). The *in vitro* quality of washed, prestorage leucocyte-depleted red blood cell concentrates. Vox Sang **87** (1) : 19-26.
- Weijman , JC., Hovespian, D., Wall, JS., Hainfeld, JF., Greer, J. (1984). Structure of haptoglobin and haptoglobin-hemoglobin complex by electron microscopy. J Mol Biol **174** (2) : 319-341.
- Wertz, JE., Bolton JR. Electron spin resonance, Mac Graw-Hill, 1972, New york.
- Whicher, JT., Ritchie, RF., Johnson, AM., Baudner, S., Biennu, J., Blirup-Jensen, S., Carlstrom, A., Dati, F., Ward, AM., Svendsen, PJ. (1994). New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). Clin Chem **40** (6) : 934-938.
- Winterbourne, CC. (1990). Oxidative reactions of haemoglobin. Methods Enzymol **186** : 265-272.
- Wirth, D., Christians, ES., Drion, PV., Dessy-Doize, C., Gustin, P. (2003). Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. Ann. Med. Vet **147** : 127-144.

- Wiseman, T., Williston, T., Brandts, JF., Lin, LN. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. Anal Biochem **15** **179** (1) : 131-137
- Wuyts, B., Delanghe, JR., Kasvosve, I., Langlois, MR., De Buyzere, ML., Janssens, J. (2000). A new method for fast haptoglobin phenotyping and hemoglobin binding capacity calculation based on capillary zone electrophoresis. Clin Chem Lab Med **38** (8) : 715-720.
- Xi, G., Wagner, RK., Keep, RF., Hua, Y., De Courten-Meyers, GM., Broderick, JP., Muizelaar, JP. (1998). Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage. Stroke **29** (12) : 2580-2586.
- Xie, Y., Li, Y., Zhang, Q., Stiller, MJ., Wang, CL., Streilein, JW. (2000). Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin. J Dermatol Sci. **1** : 25-37
- Yang, F., Brune, JL., Baldwin, WD., Barnett, DR., Bowman, BH. (1983). Identification and characterization of human haptoglobin cDNA Proc Natl Acad Sci **80** (19) : 5875-5879.
- Yang, F., Linehan, LA., Friedrichs, WE., Lalley, PA., Sakaguchi, AY., Bowman, BH.(1993). Characterisation of the mouse haptoglobin gene. Genomics **18** (2) : 374-380.
- Yang, F., Friedrichs, WE., Navarijo-Ashbaugh, AL. (1995). Cell type-specific and inflammatory-induced expression of haptoglobin gene in lung. Lab Invest **73** : 433-440.
- Yang, HJ., Przybylska, M. (1973). The microheterogeneity of human haptoglobin and its complex with hemoglobin. Can J Biochem **51** (5) : 597-605.
- Yokoi, T., Sagisaka, K. (1990). Haptoglobin typing of human blood stains using a specific DNA probe. Forensic Sci Int **45** (1-2) : 39-46.
- Yoshikawa, T., Yamamoto, Y., Naito, Y. Free radicals in chemistry, biology and medicine, ed, Oica International, Londres 2000.
- Yu, BP., Suescun, EA., Yang, SY. (1992). Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A<sub>2</sub>: Modulation by dietary restriction. Mech Age Dev **65** (1) : 17-33.
- Yueh, SC., Lai, YA., Chen, WL., Hsu, HH., Mao, SJ. (2006), An improved method for haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 purification using monoclonal antibody affinity chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate. Journal of Chromatography B doi:10.1016/j.jchromb.2006.08.012.
- Zelko, IN., Marian, TJ., Folz, RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Rad Biol Med **33** (3) : 337-349.
- Zerbani, A., Giraudeau, V. (1999). Dosage de l'haptoglobine par immunonéphélémétrie sur Immage (Beckman): attention à l'interférence de l'hémoglobine. Ann Biol Clin **57** : 490 (Lett).
- Zhao, H., Zhang, G., Duan, Y., Yu, S. (1993). Haptoglobin types in Chinese ethnic groups. Hum Hered **43** : 131-133.
- Ziouzenkova, O., Asatryan, L., Sevanian, A. (1999). Oxidative stress resulting from hemolysis and formation of catalytically active hemoglobin: protective strategies. Int J Clin Pharmacol Ther **37** (3) : 125-132.

Zuber, E. (1997). Approche biométrique de la dynamique des réactions antigènes-anticorps. Cas de deux systèmes automatisés de suivi en temps réel des cinétiques. Thèse Université Claude Bernard, Lyon, France.

Zuwała-Jagiello, J. (2006). Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. Acta Biochim Pol **53** (2) : 257-268.

## Annexe 1

### Etude de la variation d'absorbance/min du complexe Hp/Hb en fonction de concentrations croissantes d'hémoglobine

Chaque concentration d'hémoglobine utilisée a été incubée avec une concentration constante d'haptoglobine (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ). Les valeurs de  $\Delta A/\text{min}$  correspondent chacune à une moyenne de 4 expériences réalisées indépendamment. Ces données expérimentales ont été analysées par régression non linéaire en vue de la détermination de la meilleure estimation des constantes d'équilibre de dissociation en utilisant l'équation (6).

C Hb ( $\mu\text{mol/L}$ )	Activité peroxydasique des complexes Hp-Hb ( $\Delta A/\text{min}$ )		
	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
0,7	0.0010	0.0005	Non mesuré
1,5	0.0025	0.0018	0.0009
3,1	0.0047	0.0040	0.0017
3,8	0.0064	0.0046	0.0022
6,2	0.0072	0.0052	0.0031
9,3	0.0091	0.0066	0.0039
12,0	0.0096	0.0075	0.0046
15,5	0.0094	0.0077	0.0051
23,2	0.0095	0.0073	0.0059
31,0	0.0096	0.0076	$15 \cdot 10^{-7}$
46,5	0.0092	0.0077	0.0057
62,0	0.0095	0.0077	0.0059

## **Publications**



*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Papa Madièye Guèye, Nicole Glasser, Georges Férard and Jean-Marc Lessinger**

**Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells.**

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 44, 542-547 (2006)

Pages 542-547 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial et ne peut pas être reproduite dans la version en ligne de la thèse.

Il est possible de consulter cette article dans la thèse sous sa forme papier (notamment via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Inter-établissement de Coopération Documentaire de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)).

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**P. M. Guéye, I. Sall, J.-M. Lessinger, G. Féraud**

**Interférence de l'hémolyse sur la détermination de l'haptoglobine en immunonéphélemétrie cinétique et comparaison selon les phénotypes.**

Ann. Biol. Clin. 62, 701-705 (2004)

Pages 701-705 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial et ne peut pas être reproduite dans la version en ligne de la thèse.

Pour les utilisateurs autorisés, ce qui est le cas dans les locaux de l'ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

[http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio\\_rech/abc/e-docs/00/04/06/FC/article.md?type=text.html](http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio_rech/abc/e-docs/00/04/06/FC/article.md?type=text.html)

Il est possible de consulter cette article dans la thèse sous sa forme papier (notamment via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Inter-établissement de Coopération Documentaire de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)).

## Résumé

Les travaux menés au cours de cette thèse se sont articulés autour de l'étude des phénotypes de l'haptoglobine (Hp) humaine, de leur purification, de leurs interactions avec l'hémoglobine (Hb) et des implications *in vitro* dans le stress oxydant induit par l'Hb extra-érythrocytaire. Les résultats ont été appliqués à l'autotransfusion utilisant la récupération sanguine péri-opératoire.

Nous avons mis au point un protocole de phénotypage de l'Hp humaine par électrophorèse en gel de polyacrylamide, que nous avons appliqué à l'étude de la répartition des trois phénotypes dans une population de patients hospitalisés. Par la suite, nous avons purifié par FPLC l'Hp à partir de plasmas humains phénotypés (échange d'ions et exclusion-diffusion).

L'interaction de chacun des trois phénotypes purifiés d'Hp avec l'Hb humaine a été étudiée en spectrophotométrie, à travers le pouvoir peroxydasique du complexe Hp-Hb. Les résultats obtenus ont montré que l'affinité de Hp 1-1 pour l'Hb était supérieure à celle de Hp 1-2, qui était elle-même supérieure à celle de Hp 2-2. La constatation du fait que l'interaction de l'Hp avec l'Hb était exothermique nous a conduit à réaliser des études complémentaires en microcalorimétrie. Dans une étude clinique, nous avons démontré que l'affinité de l'Hp pour l'Hb pouvait avoir pour conséquence une sous-estimation de la concentration réelle d'Hp présente dans des spécimens de patients. Cette interférence, non dépendante du phénotype, a été observée lorsque l'Hp était déterminée en immuno-néphélométrie.

Par la suite, nous avons étudié les effets délétères de l'Hb extra-érythrocytaire sur le globule rouge *in vitro* sur deux modèles. Le premier a utilisé des préparations de membranes de globules rouges, avec suivi de la peroxydation lipidique par la formation de diènes conjugués et des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). Le deuxième modèle a utilisé des globules rouges intacts, maintenus dans un milieu de conservation (SAGM), avec suivi du potassium et de l'activité lactate déshydrogénase libérés, comme marqueurs d'atteinte de l'intégrité membranaire. L'effet protecteur de chacun des trois phénotypes de l'Hp vis-à-vis du stress oxydant induit par l'Hb extra-érythrocytaire a été étudié sur ces deux modèles. Les résultats ont mis en évidence le rôle anti-oxydant de l'Hp et ont démontré qu'il existait des différences significatives selon le phénotype, l'effet protecteur de Hp 1-1 étant supérieur à celui de Hp 1-2, qui était lui-même supérieur à celui de Hp 2-2.

Enfin, nous avons évalué la qualité des poches de sang destinées à être re-transfusées lors de la récupération sanguine péri-opératoire et les conséquences de l'hémolyse en terme de stress oxydant sur le globule rouge. Nos résultats ont montré que les poches destinées à être re-transfusées contenaient des concentrations élevées d'Hb libre. Un stress oxydant a été mis en évidence au niveau des globules rouges des poches, mais également dans la circulation générale des patients après transfusion. Ce stress oxydant s'accompagnait d'une baisse des concentrations plasmatiques en thiols non protéiques et en Hp, ainsi que d'une altération des propriétés mécaniques des membranes de globules rouges. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de maîtriser l'hémolyse lors de la récupération sanguine péri-opératoire, pour limiter ses effets délétères.

**Mots-Clés :** Phénotypes d'haptoglobine ; hémoglobine extra-érythrocytaire ; complexes haptoglobine – hémoglobine ; stress oxydant ; globule rouge ; auto-transfusion.

## Abstract

This thesis focuses on the study of human haptoglobin phenotypes (Hp), their purification, their interactions with hemoglobin (Hb), and on *in vitro* implications in oxidative stress induced by free Hb. The results were applied to the autologous transfusion using perioperative blood salvage.

We developed a protocol of human Hp phenotyping using polyacrylamide gel electrophoresis, which was applied to the study of the distribution of the three phenotypes in patients in hospital. Then, we purified the phenotyped human plasmas by FPLC (ion exchange chromatography and gel filtration). The interaction of the three purified Hp phenotypes with human Hb was studied in spectrophotometry, through the peroxidase activity of Hp-Hb complex. The results obtained showed that the affinity of Hp 1-1 for Hb was higher than that of Hp 1-2, which was itself higher than that of Hp 2-2. The interaction of Hp with Hb was proved to be exothermic, which allowed us to conduct complementary studies in microcalorimetry. In a clinical study, we found that the affinity of Hp for Hb could lead to underevaluating the real Hp concentrations in specimens of patients. This interference, which was independent of the phenotype, was observed when Hp was determined by immunonephelometry.

Then, we studied the deleterious effects of extracellular Hb on red blood cells *in vitro* on two models. The first one used preparations of red blood cells membranes, in which we followed the lipid peroxidation by combined dienes formation and substances reacting with thiobarbituric acid (TBARS). The second model used intact red blood cells, maintained in a conservation medium (SAGM), with follow-up of released potassium and lactate dehydrogenase activity, as markers of attack on membrane integrity. The protective effect of each of the three phenotypes of Hp with respect to oxidative stress induced by extracellular Hb was studied on these two models. The results confirmed the antioxidant role of Hp and showed that there were significant differences according to the phenotype, the protective effect of Hp 1-1 being higher than that of Hp 1-2, which was itself higher than that of Hp 2-2. Finally, we evaluated the quality of the blood-pack units during perioperative autologous transfusion and the consequences of hemolysis in terms of oxidative stress on red blood cells. Our results indicated that the blood units intended to be transfused contained high concentrations of free Hb. An oxidative stress was found on the red blood cells contained in the blood bags and in the general circulation of patients after transfusion. This oxidative stress was accompanied by a decrease in plasmatic non-protein thiols and Hp concentrations, as well as a deterioration of the mechanical properties of red blood cells membranes. All the results showed the importance of hemolysis control during perioperative blood salvage, in order to limit its deleterious effects.

**Key word :** haptoglobin phenotypes ; extracellular hemoglobin ; haptoglobin – hemoglobin complex ; oxidative stress; red blood cells ; autologous transfusion.