



**HAL**  
open science

# Arenicola marina : le nouvel espoir marin pour la santé publique

Joanna Lupo

► **To cite this version:**

Joanna Lupo. Arenicola marina : le nouvel espoir marin pour la santé publique. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02448388

**HAL Id: dumas-02448388**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02448388v1>**

Submitted on 22 Jan 2020

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

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



# THESE

**Pour obtenir le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie**

**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

***Arenicola marina* : le nouvel espoir marin pour la santé  
publique**

**Présentée par**

**Mademoiselle Joanna LUPO**

**Soutenue publiquement le 24.09.2019 devant le jury composé de**

Mr / David GARON	Professeur des Universités / UFR Santé	Président du jury
Mr / Philippe ELDIN de PECOULAS	Maître de conférences des Universités / UFR Santé	Directeur de thèse
Mme / Estelle RICHARD	PAST officine / UFR Santé	Examineur
Mr / Pierre Villedieu	Docteur en Pharmacie / Pharmacie d'Argouges – Bayeux	Examineur

**Thèse dirigée par Monsieur Philippe ELDIN de PECOULAS**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE

**U.F.R. Santé**  
**Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

**LISTE DES ENSEIGNANTS - CHERCHEURS**

**Année Universitaire 2018 / 2019**

**Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

Professeur Michel BOULOUARD

**Assesseurs**

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

**Directrice administrative et Directrice administrative adjointe**

Madame Sarah CHEMTOB

Madame Alexandra HOUARD

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

**BOULOUARD Michel**

Physiologie, Pharmacologie

**BUREAU Ronan**

Biophysique, Chémoinformatique

**COLLOT Valérie**

Pharmacognosie

**DALLEMAGNE Patrick**

Chimie médicinale

**DAUPHIN François**

Physiologie, Pharmacologie

**DELEPEE Raphaël**

Chimie analytique

**FABIS Frédéric**

Chimie organique

**FRERET Thomas**

Physiologie, Pharmacologie

**GARON David**

Botanique, Mycologie, Biotechnologie

**GAUDUCHON Pascal** Eméritat jusqu'au

Biologie cellulaire

31/08/2019

**GIARD Jean-Christophe**

Bactériologie, Virologie

**MALZERT-FREON Aurélie**

Pharmacie galénique

**RAULT Sylvain** Eméritat jusqu'au 31/08/2019

**ROCHAIS Christophe**

**SCHUMANN-BARD Pascale**

**SICHEL François**

**SOPKOVA Jana**

**VOISIN-CHIRET Anne-Sophie**

Chimie thérapeutique

Chimie organique

Physiologie, Pharmacologie

Toxicologie

Biophysique, Drug design

Chimie médicinale

### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES**

**ANDRE Véronique – HDR**

Biochimie, Toxicologie

**BOUET Valentine – HDR**

Physiologie, Pharmacologie

**CAILLY Thomas – HDR**

Chimie bio-inorganique, Chimie

organique

**DENOYELLE Christophe – HDR**

Biologie cellulaire et moléculaire,

Biochimie, Cancérologie

**DHALLUIN Anne**

Bactériologie, Virologie, Immunologie

**ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR**

Parasitologie, Mycologie médicale

**GROO Anne-Claire**

Pharmacie galénique

**KIEFFER Charline**

Chimie médicinale

**KRIEGER Sophie** (Praticien hospitalier)

Biologie clinique

**LAPORTE-WOJCIK Catherine**

Chimie bio-inorganique

**LEBAILLY Pierre – HDR**

Santé publique

**LECHEVREL Mathilde – HDR**

Toxicologie

**LEGER Marianne**

Physiologie, Pharmacologie

**LEPAILLEUR Alban – HDR**

Modélisation moléculaire

**N'DIAYE Monique**

Parasitologie, Mycologie médicale,

Biochimie clinique

**PAIZANIS Eleni**

Physiologie, Pharmacologie

**PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima**

Chimie organique et thérapeutique

**POTTIER Ivannah**

Chimie et toxicologie analytiques

**PREVOST Virginie – HDR**

Chimie analytique, Nutrition,

Education thérapeutique du patient

**QUINTIN Jérôme**

Pharmacognosie

**RIOULT Jean-Philippe**

Biotechnologies

Botanique, Mycologie,

**SINCE Marc**

Chimie analytique

**VILLEDIEU Marie**

cancers

Biologie et thérapies innovantes des

**PROFESSEUR AGREGE (PRAG)**

**PRICOT Sophie**

Anglais

**PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)**

**SAINT-LORANT Guillaume**

Pharmacie clinique

**SEDILLO Patrick**

Pharmacie officinale

**RICHARD Estelle**

Pharmacie officinale

**Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

## Remerciements

---

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Eldin de Pécoulas d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'accompagner dans la rédaction de celle-ci.

Je remercie Monsieur le Professeur David Garon d'avoir accepté d'être mon président de thèse.

Je remercie Madame le Docteur Estelle Richard d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie Monsieur le Docteur Pierre Villedieu, de la Pharmacie d'Argouges à Bayeux, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir été mon maître de stage de sixième année où vous m'avez énormément appris.

Un grand merci à Monsieur le Docteur Franck Zal d'avoir accepté de me transmettre des informations avec une si grande rapidité et pour ses encouragements.

Les personnes, à qui je dois énormément, sont bien sûr mes parents, c'est grâce à eux si je suis là aujourd'hui. Ça n'a pas été simple tous les jours, mais ils ont su me soutenir, m'écouter, toujours être présents quand il le fallait. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre patience et votre amour.

A mon grand frère, à notre complicité, merci de me supporter, merci d'être là pour moi.

A mes grands-parents, qui ne sont plus là aujourd'hui mais qui m'ont toujours soutenue et auraient aimé être présents, en ce jour pour ma soutenance.

A mes amis de fac et du lycée et à toutes les personnes qui m'ont accompagné durant mes études.

## Table des matières

---

I.	Introduction .....	15
II.	A propos du ver.....	18
A.	Classification.....	18
1.	Description et biotope.....	19
2.	Mode de vie.....	22
3.	Physiologie respiratoire du ver .....	23
III.	L'enjeu de l'hémoglobine .....	25
A.	Présentation de l'hémoglobine humaine .....	25
1.	Description .....	25
a)	Processus de fixation de l'oxygène à l'hémoglobine.....	26
2.	Les besoins en sang en médecine humaine.....	29
B.	De l'intérêt à la recherche de substituts sanguins.....	32
C.	L'hémoglobine d' <i>Arenicola marina</i> .....	33
1.	Pourquoi tant d'intérêt pour ce ver marin ?.....	33
2.	Structure et fonction de l'hémoglobine d' <i>Arenicola marina</i> .....	34
3.	Autres propriétés intéressantes de l'hémoglobine d' <i>Arenicola marina</i> .....	39
IV.	De la plage au laboratoire .....	44
A.	Comment utiliser ce ver marin en santé humaine ? .....	44
B.	Les premières études .....	47
1.	Une hémoglobine pour la préservation des organes : <i>HEMO<sub>2</sub>Life</i> ®.....	48
a)	Pourquoi s'intéresser à la transplantation ? .....	48

b) Quels sont les moyens actuels pour préserver les organes ? .....	49
c) L'application HEMO <sub>2</sub> Life® .....	51
(1) Les essais pré-cliniques .....	51
(2) Les essais cliniques .....	56
2. Application dans les plaies chroniques : HEMHealing® .....	65
3. Application : HEMOXYCarrier® .....	69
4. Application : HEMOXCell® .....	86
V. Conclusion .....	98

## Abréviations

---

ABM : Agence de Biomédecine

AmHb : Hémoglobine d'*Arenicola marina*

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

CE : Conformité Européenne

CHO : *Chinese Hamster Ovary*

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

2, 3-Diphosphoglycérate : 2, 3-DPG

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

Eau ppi : eau pour préparation injectable

ECB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine

EFS : Etablissement Français du Sang

GMP : *Good Manufacturing Practice*

Hb : Hémoglobine

HBL-Hb : hémoglobine à structure en bicouche hexagonale

HBOC : transporteur d'oxygène à base d'hémoglobine

HR : *Heart Rate*

IV : Intraveineux

M101 : transporteur d'oxygène thérapeutique de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*

MAP : *Mean Arterial blood Pressure*

ME : Microscopie Electronique

mmHg : millimètre de mercure

MO<sub>2</sub> : consommation en oxygène

n<sub>50</sub> : coefficient de coopérativité de demi-saturation

NaCl : chlorure de sodium

O<sub>2</sub> : dioxygène

P<sub>50</sub> : pression partielle en oxygène saturée à 50%

PEG : polyéthylène glycol

P<sub>w</sub>O<sub>2</sub> : pression partielle en oxygène

RFU : Unité de Fluorescence Relative

SOD : SuperOxyde Dismutase

SRAA : Système Rénine Angiotensine Aldostérone

TBI : *Trauma Brain Injury*

TPN : Traitement par Pression Négative

## Liste des figures, graphiques et tableaux

---

<i>Figure 1 : Trompe dévaginable d'<i>Arenicola marina</i> (5) .....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 2 : Branchies arborescentes d'<i>Arenicola marina</i> (8) .....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 3 : Représentation de la morphologie d'<i>Arenicola marina</i> (11) .....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 4 : Vue en surface de l'habitat d'<i>Arenicola marina</i> (12).....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 5 : Structure de l'Hémoglobine Humaine (13).....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 6 : Modèle de l'HBL-Hb d'<i>Arenicola marina</i> (26). Un hexagone est composé de six dodécamères (▲) reliés entre eux par les linkers (●). Un dodécamère est composé d'un trimère (●) et de neuf monomères (●).....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 7 : Hémoglobine extracellulaire d'<i>Arenicola marina</i> vue en microscopie électronique. D'après Breton-Gorius, INSERM (27).....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 8 : Dosage de la réponse des Anticorps IgE chez des souris après une administration en IV de NaCl, tampon d'Arénicole, d'Ovalbumine et d'AmHb. * = p-value &lt; 0.05 ; NS = Non Significatif (22).....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 9 : Titration des Anticorps IgE et IgG2a chez des souris après deux administrations à 7 jours d'intervalle en IV de tampon d'Arénicole, d'Ovalbumine et d'AmHb. * = p-value &lt; 0.05 ; NS = Non Significatif (22) .....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 10 : Bassin de culture d'<i>Arenicola marina</i> à Noirmoutier (35) .....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 11 : Contrôle de qualité assuré par le personnel de la société HEMARINA (35) .</i>	<i>45</i>
<i>Figure 12 : Extraction de l'hémoglobine d'<i>Arenicola marina</i> purifiée et présentée sous différentes formes galéniques de conservation (33) .....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 13 : Coupe histologique de néphrons de porcs (49) .....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 14 : Flèche chronologique du suivi post-transplantation des patients (40)</i>	<i>58</i>

<i>Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'action du pansement HEMHealing® (42) .....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 16 : Conséquences d'une explosion sur le corps humain (69).....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 17 : Evaluation de la biodistribution de l'AmHb marqué au fluorochrome (43)....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 18 : Schéma résumant la procédure expérimentale (70) .....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 19 : Coloration immunohistochimique d'anticorps anti-Glut-1 sur des coupes de tissus tumoraux HT-29 inclus dans de la paraffine (x 100) (70).....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 20 : Tumeur sous cutanée colorée par immunohistochimie par des anticorps anti-Glut-1 avant et 1h après injection d'HEMOXYCarrier® à la dose de 1 200 mg/kg (43) ..</i>	<i>82</i>
<i>Figure 21 : Schéma résumant la production de protéines recombinantes (71).....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 22 : Schéma fonctionnel d'un bioréacteur (72).....</i>	<i>89</i>
<i>Graphique 1 : Concentration en oxygène (%) en fonction de la pression partielle en oxygène de l'eau de mer (Torr) (16) .....</i>	<i>24</i>
<i>Graphique 2 : Courbe de dissociation de l'hémoglobine Humaine (17) .....</i>	<i>27</i>
<i>Graphique 3 : Effet Bohr (18).....</i>	<i>29</i>
<i>Graphique 4 : Evolution de la créatinémie (µmol/L) chez des porcs transplantés après conservation du greffon dans la solution UW® ou UW® avec AmHb (43) * = différence significative .....</i>	<i>52</i>
<i>Graphique 5 : Taux de fibroses rénales chez les porcs auto-transplantés par la solution UW® ou par la solution UW® + HEMO<sub>2</sub>Life® (49) * = différence significative.....</i>	<i>55</i>
<i>Graphique 6 : Evolution de la créatinémie (µmol/L) de greffons conservés dans HEMO<sub>2</sub>Life® comparé avec les données historiques du Viaspan® Les résultats de M2 et M3 sont identiques à M1 (43) .....</i>	<i>60</i>

<i>Graphique 7 : Evolution du DFG (mL/min/1.73m<sup>2</sup>) après la transplantation des greffons conservés dans HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> (43).....</i>	<i>61</i>
<i>Graphique 8 : Profils de fluorescence (en unités de fluorescence relatives RFU) d'HEMOXYCarrier<sup>®</sup> le long du corps des souris à différents temps (70) (a) zone postérieure (b) zone abdominale (c) zone thoracique (d) tête .....</i>	<i>72</i>
<i>Graphique 9 : Quantification d'HEMOXYCarrier<sup>®</sup> au cours du temps dans les organes suivants : muscle tibial antérieur (Ti. An.) ; les ovaires (Ov.) ; les reins (Ki.) ; le foie (Li.) ; la rate (Sp.) ; le cœur (He.) ; les poumons (Lu.) ; les glandes salivaires (Sa. Gl.) ; le cerveau (Br.) (70) .....</i>	<i>73</i>
<i>Graphique 10 : Evolution du diamètre des artéioles et de l'écoulement sanguin en réponse à différentes hémoglobines chez des Hamsters (43).....</i>	<i>77</i>
<i>Graphique 11 : Evolution de la pression artérielle moyenne (A) et du rythme cardiaque (B) chez des Hamsters après injection d'HEMOXYCarrier<sup>®</sup> (73).....</i>	<i>78</i>
<i>Graphique 12 : Comparaison de la pression artérielle moyenne (A) et du rythme cardiaque (B) chez des Hamsters après injection des différentes hémoglobines moléculaires (75) .....</i>	<i>78</i>
<i>Graphique 13 : Quantification de la coloration de Glut-1 sur des coupes de tissus tumoraux du groupe témoin (Ctrl) et du groupe traité avec une dose de 1 200 mg/ kg par HEMOXYCarrier<sup>®</sup> à 1h et 5h après l'injection (70).....</i>	<i>83</i>
<i>Graphique 14 : Comparaison entre HEMOXYCarrier<sup>®</sup> (M-101) et le groupe contrôle (NON) sur la pression partielle en oxygène dans les tissus cérébraux (PbtO<sub>2</sub> en pourcentage par rapport aux valeurs post-traumatique) en fonction du temps (en minutes) (43).....</i>	<i>85</i>
<i>Graphique 15 : Densité cellulaire de culture de CHO classique (cellules/mL) en fonction du temps (jours) (86) .....</i>	<i>90</i>

<i>Graphique 16 : Densité cellulaire (cellules/mL) de CHO cultivé avec HEMOXCell® à différentes concentrations en fonction du temps (jours) (86).....</i>	<i>92</i>
<i>Graphique 17 : Taux de viabilité des cultures de CHO (%) en fonction du temps (jours) (86).....</i>	<i>93</i>
<i>Graphique 18 : Mesure par fluorescence (RFU) de l'activation de caspase 3 en fonction du temps (jour) (86).....</i>	<i>94</i>
<i>Graphique 19 : Quantité d'anticorps produite (µg) au cours du temps (jours) en présence ou non d'HEMOXCell® (88) .....</i>	<i>96</i>
<u>Tableau N°I</u> : Classification systématique d' <i>Arenicola marina</i> (7).....	18
<u>Tableau N°II</u> : Variations du pourcentage de saturation de l'O <sub>2</sub> en fonction du pH, de la pression de CO <sub>2</sub> , de la température et de la concentration en 2, 3-DPG sous pression d'O <sub>2</sub> constante (18).....	28
<u>Tableau N°III</u> : Compatibilité sanguine (21) .....	30
<u>Tableau N°IV</u> : Exemple de durées de vie de différentes fractions du sang (17).....	32
<u>Tableau N°V</u> : Comparaison de différentes mises en situation sur l'affinité de l'hémoglobine en oxygène chez l'hémoglobine Humaine et d' <i>Arenicola marina</i> (22).....	38
<u>Tableau N°VI</u> : Récapitulatif des caractéristiques de l'hémoglobine Humaine et d' <i>Arenicola marina</i> .....	38
<u>Tableau N°VII</u> : Mesure de l'activité antioxydante dans le sang Humain, dans l'hémoglobine d' <i>Arenicola marina</i> et dans les globules rouges Humains (22) .....	41
<u>Tableau N°VIII</u> : Résumé des différents rôles des composants de la solution UW®.....	51
<u>Tableau N°IX</u> : Rappel des différents stades de l'insuffisance rénale en fonction du DFG (54) .....	60



## I. Introduction

Nous vivons dans un monde en constante évolution et à la recherche permanente d'innovations qui pourraient améliorer le quotidien des êtres humains. La quête d'un substitut sanguin n'échappe pas à cette règle. Il est vrai que trouver un produit qui aurait les capacités de remplacer notre sang, lors des transfusions ou transplantations d'organes par exemple, et cela en quantité quasi « infinie » serait une révolution pour la santé publique (1). Malheureusement, nous sommes encore loin de la réalisation de ce rêve puisque la quantité de sang manquant dans le monde par an est estimée à 100 millions de litres et ce chiffre ne va pas en s'améliorant (2). Pour le moment, le seul moyen réellement efficace de récolter du sang reste le don de celui-ci, mais suite à l'affaire du sang contaminé apparue en France dans le courant des années 1980, il y a eu la perte de confiance de la part de certains donneurs ayant entraîné une baisse de près de 50% du nombre de volontaires (1) et on estime aujourd'hui que seul 5% de la population française y participe (2).

Le sang est indispensable à la vie, comme nous le savons, sa fonction première est de transporter l'oxygène aux tissus et organes mais il leur apporte également les nutriments. De plus, le sang permet de récupérer les résultats du catabolisme cellulaire en évacuant les déchets (le gaz carbonique et l'urée entre autres).

Dès le V<sup>ème</sup> Siècle avant Jésus Christ, le sang apparaît déjà comme un liquide vital, nécessaire à l'équilibre de notre organisme selon la théorie des humeurs par Hippocrate (3). Mais à cette époque, le sang a d'abord été considéré comme devant être éliminé lors de saignée. C'est à partir de XVII<sup>ème</sup> Siècle, que les premiers essais de transfusions apparaissent. Nous devons à Jean-Baptiste Denis, l'un des médecins du roi Louis XIV, les transfusions d'un animal (généralement un agneau) à l'Homme. Ces opérations suscitaient des interrogations : « pouvait-on transmettre la tranquillité de l'agneau à une personne colérique et/ou agressive ? ». Malheureusement, suite à un procès en 1668, intenté par une jeune femme qui accuse Denis du meurtre de son mari après une transfusion, cette dernière fut interdite pendant plus d'un siècle et demi avant que cette

pratique soit remise au goût du jour. Ainsi au XIX<sup>ème</sup> Siècle, grâce à un obstétricien Anglais, James Blundell, l'intérêt pour les transfusions sanguines reprend principalement pour les hémorragies du post-partum. Plus tard, un médecin Français, Alexis Carrel, améliore les méthodes de transfusion en suturant directement une artère du donneur à une veine du receveur. En 1912, il reçoit le Prix Nobel de Médecine pour sa technique devenue la référence à l'époque. Ce n'est seulement qu'au début du XX<sup>ème</sup> Siècle qu'un chimiste Viennois, Karl Landsteiner, remarque que certains mélanges de sang provoquaient une agglutination visible à l'œil nu (4). Ce chercheur est à l'origine de la découverte des groupes sanguins en 1922. Avec la première guerre mondiale, les techniques de transfusion se perfectionnent, avec l'utilisation de seringues, par les médecins, pour injecter le sang des donneurs. Puis, la compatibilité du sang entre donneur et receveur est testée avant transfusion et enfin, vient l'utilisation d'un anticoagulant non toxique dans les récipients récoltant le sang des donneurs (4). La seconde guerre mondiale apportera trois avancées majeures :

- ❖ Le fractionnement du plasma.
- ❖ La mise au point d'une solution de conservation du sang : le sang pouvait ainsi se conserver 21 jours grâce à cette solution contre 10 jours avant.
- ❖ L'utilisation de matière plastique : c'est la naissance des poches à sang en plastique en remplacement des flacons en verre.

Les avancées sur le sang sont donc extrêmement récentes.

La recherche d'un substitut sanguin vise à remplacer le sang tout en conservant, si possible, ses propriétés, sinon en les en améliorant, c'est-à-dire en transportant davantage d'oxygène. En mettant en avant sa propriété principale, qui est de transporter de l'oxygène, on comprend l'intérêt qu'il y aurait, notamment pour les transplantations d'organes.

Aujourd'hui, de nombreux patients sont en attente de greffes. Selon le rapport annuel de l'Agence de Biomédecine (ABM) de 2016, on estime leur nombre à 12 459 en France (5). Ce chiffre augmente annuellement (en moyenne, il y a 4 500 nouveaux patients par an inscrits sur une liste d'attente), dû essentiellement à l'allongement de l'espérance de vie, suite à l'amélioration des soins et des traitements des pathologies chroniques souvent

responsables d'insuffisances rénales ou cardiaques par exemple, nécessitant une transplantation d'organes. Parmi la totalité des patients en attente d'une greffe, seulement 3 486 d'entre eux ont pu recevoir un organe en 2015 (5), soit 30% des demandeurs de greffons.

Cette faible proportion peut s'expliquer par le manque de donneurs (décédés ou vivants), par la prise en compte des caractéristiques des donneurs et receveurs (âges, poids, sexes, facteurs de comorbidités, compatibilités immunologiques), par une mauvaise conservation des greffons, ou encore par l'existence de problèmes de compatibilités sanguines (groupe ABO).

Pour donner un ordre d'idée, lors d'un appel de greffe, on entre dans une course contre la montre, un minimum de temps doit s'écouler entre le moment de prélever l'organe, de le transporter, et de prévenir l'équipe médicale afin de préparer le bloc opératoire. Pendant cette attente de transplantation, l'organe va énormément souffrir ce qui entraîne la perte de 20% des greffons. Le facteur majeur en cause est le manque d'oxygène (6), ajouté à cela le fait de sélectionner un donneur pour un receveur en fonction de leur compatibilité sanguine, ce qui diminue d'autant le nombre de possibilité de transplantation.

C'est par ses nombreuses contraintes et cette nécessité de trouver une solution de remplacement que de nouvelles études se sont tournées vers l'exploration d'un ver marin : *Arenicola marina*. Celui-ci présenterait les capacités de palier à la fois aux problèmes de conservation des greffons mais aussi d'être un substitut sanguin universel.

Au travers de cette thèse, nous verrons l'étude de la physiologie sanguine du ver et les recherches qui aboutirent à sa découverte, puis la place tenue par l'hémoglobine en médecine humaine, pour terminer sur les résultats de travaux menés sur l'Arénicole.

## II. A propos du ver

### A. Classification

*Arenicola marina* est un ver marin au corps segmenté, constitué d'anneaux, appartenant à l'embranchement des Annélides (Tableau N°I).

Tableau N°I : Classification systématique d'*Arenicola marina* (7)

<b>Règne</b>	Animal
<b>Embranchement</b>	Annélides ( <i>Annelida</i> )
<b>Classe</b>	Polychètes ( <i>Polychaeta</i> )
<b>Sous classe</b>	Sédentaires ( <i>Sedentaria</i> )
<b>Famille</b>	<i>Arenicolidae</i>
<b>Genre</b>	<i>Arenicola</i>
<b>Espèce</b>	<i>marina</i>

Il appartient à la classe des Polychètes sédentaires, il est donc composé de nombreux :

- ❖ Parapodes : appendices servant à la locomotion.
- ❖ Soies : à fonctions multiples, tels la locomotion, le rôle tactile et celui de chimio-sensibilité. Celles-ci sont situées sur les parapodes (7).

L'Arénicole est une espèce dite psammivore, c'est-à-dire se nourrissant seulement de matières organiques présentes dans le sable, telles que bactéries, algues unicellulaires et autres éléments d'origine organique. Lors de sa progression sous terre, elle ingère le sable par sa trompe dévaginable et rejette par son anus toute la partie

minérale. Ces déjections sont repérables par la présence de tortillons en surface, il s'agit tout simplement de sable pur (7).

## 1. Description et biotope

*Arenicola marina*, plus connu sous le nom de « ver de vase » ou « l'Arénicole des pêcheurs » est un ver cylindrique, mou, mesurant entre 10 à 25 centimètres de long de couleur assez sombre, rouge à noirâtre (photo N°1 en annexe). On peut le localiser sur l'ensemble du littoral Atlantique Européen, où il est très commun et connu de nos régions Normandes jusqu'aux côtes Bretonnes car les pêcheurs l'utilisent fréquemment comme appât de pêche. Pour le récolter il faut aller sur l'estran sableux, zone définie par les limites extrêmes des marées hautes et des marées basses.

Le corps de ce ver est découpé en une trentaine de segments. Chaque segment est divisé en cinq anneaux, dont un seul porte des parapodes (appendices permettant au ver d'avancer) (8).

Le corps des annélides présente trois régions qui sont d'avant en arrière :

### ❖ Partie céphalique

Au niveau de celle-ci, s'ouvre la bouche. Elle est caractérisée par une trompe molle globuleuse garnie de papille et dévaginable (organe creux s'extériorisant) (Figure 1). Comparé à d'autre ver, celle-ci est dépourvue de dents, d'yeux ou de tout autres appendices sensoriels (8). Cette région représente les six premiers segments recouverts de soies.

### ❖ Partie intermédiaire

Elle englobe la région thoracique et abdominale. Celle-ci est composée des treize segments suivants et portent à la fois des soies et des branchies arborescentes rouge vif (8) (Figure 2). Ses branchies sont agglutinées en milieu anoxique (lors de la marée basse) et au contraire déployées lorsqu'elles sont sous l'eau. Cette

arborescence permet d'augmenter la surface d'échange avec l'oxygène dissout dans l'eau. Et c'est tout simplement par diffusion passive que les échanges gazeux entre les milieux externes et internes se font. C'est donc un gradient de pression qui est en jeu (2) (9).



Figure 1 : Trompe dévaginable  
d'*Arenicola marina* (5)



Figure 2 : Branchies arborescentes  
d'*Arenicola marina* (8)

#### ❖ Partie caudale

Elle possède le diamètre le plus fin du reste du corps et correspond à la queue du ver. Sur cette région il n'y a ni soies, ni branchies. C'est à cette extrémité que se trouve l'anus. La queue du ver possède plusieurs caractéristiques :

- Elle est hautement sensible et peut rapidement se raccourcir si elle est stimulée à son extrémité terminale. Ce processus permet de réduire le risque d'être pris par un prédateur.
- Elle n'est pas composée d'organes vitaux (absence de soies, branchies, cœur, gonades ou encore d'appareil digestif). Par conséquent, même si un prédateur venait à couper une partie de la queue, cela n'entraînerait pas de conséquences majeures sur la survie du ver.
- Elle peut s'auto-régénérer. En effet, dans le cas où un des anneaux de l'extrémité distale serait saisi et sectionné, le ver a la capacité de reformer de nouveaux anneaux afin de reconstituer l'extrémité terminale de sa queue. De

plus c'est une zone peu irriguée donc ne saignant pratiquement pas, ce qui a l'avantage d'augmenter ses chances de survie lors d'une amputation. Cette régénération se fait selon un processus spécifique. Dès qu'une partie de la queue est coupée, la régénération des anneaux débute à partir de la zone se trouvant juste en amont de la queue (la limite entre la région intermédiaire et la queue). La particularité de cette régénération est qu'elle ne se réalise pas seulement en cas d'accident mais elle est continue. En absence de tout incident, de nouveaux anneaux s'ajoutent progressivement, ce qui fait tomber au fur et à mesure les anciens anneaux. Le ver a donc une réserve d'anneaux qui se régènèrent continuellement. On considère que le ver produit en moyenne l'équivalent de cinq fois la taille d'un ver adulte au cours d'une vie (10), soit une production de plus d'un mètre d'anneaux. L'intérêt de ce type de production en continu est de faire face aux prédateurs (oiseaux, poissons, crabes) lorsqu'il refait surface pour vider son tube digestif. Plus le ver est enterré profondément dans sa galerie de sable, plus celui-ci est en sécurité. Mais cela sert aussi en tant que prévention d'incidents lors de sa remontée. En effet, lorsqu'il sort en surface sa queue est la première à affronter le climat (sable chaud, vent froid, force des vagues) (10).

Afin de mieux visualiser la morphologie d'un Arénicole, voici-ci-dessous une représentation de ce dernier (Figure 3) (11).

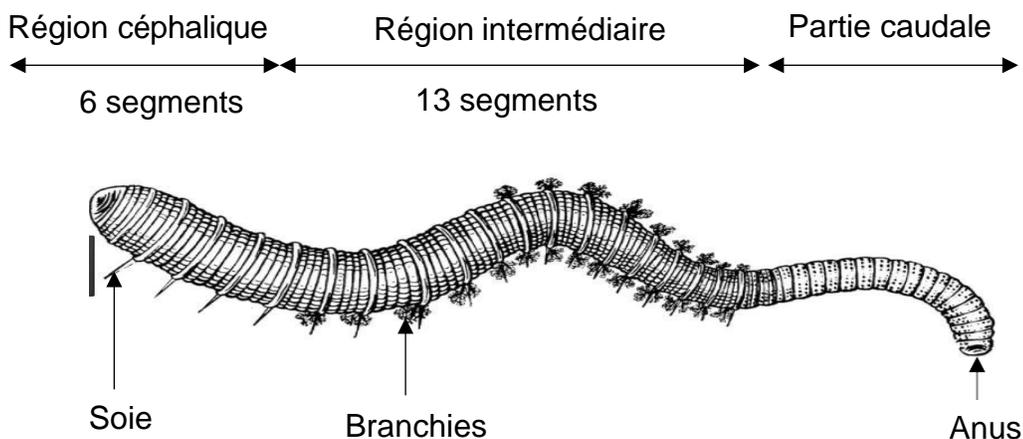


Figure 3 : Représentation de la morphologie d'*Arenicola marina* (11)

## 2. Mode de vie

*Arenicola marina* est un invertébré dit « foreur », dont l'habitation correspond à un « terrier » qu'il creuse dans le sable. Celui-ci se présente sous la forme d'une galerie en « U », dans laquelle il passe les trois quarts de son temps.

Cette configuration particulière permet de facilement localiser le ver. En effet, on peut observer à l'œil nu l'entrée et la sortie de la galerie (Figure 4) :

- ❖ Une zone de dépression, formant un entonnoir, présentant un orifice en son centre où se trouve la tête du ver.
- ❖ Une zone matérialisée par des « tortillons de sable » est le côté de la queue du ver. Ses tortillons de sable correspondent aux déjections qui sont tout simplement composées de sable mêlé à du mucus (10).



Figure 4 : Vue en surface de l'habitat d'*Arenicola marina* (12)

La formation du terrier est réalisée par le monopolisation à la fois des mouvements des parapodes et de ceux des anneaux (13). Sa progression dans le sable se fait de l'arrière vers l'avant par péristaltisme. Ainsi, la trompe ingère par cycle de sept à huit minutes du sable qui sera, après cinq à six cycles, rejeté de l'intestin après absorption par le ver de la matière organique et des animalcules qu'il renfermait (14).

Le mucus, qui est mêlé au sable puis rejeté par l'animal, est produit par celui-ci au fur et à mesure de la formation de la galerie dont il en tapisse aussi les parois. Sans celui-ci, la galerie s'effondrerait. Il a donc un rôle de ciment protecteur afin d'éviter que le trou ne se rebouche ou que l'eau et les vibrations n'en affaiblissent les parois (15).

### 3. Physiologie respiratoire du ver

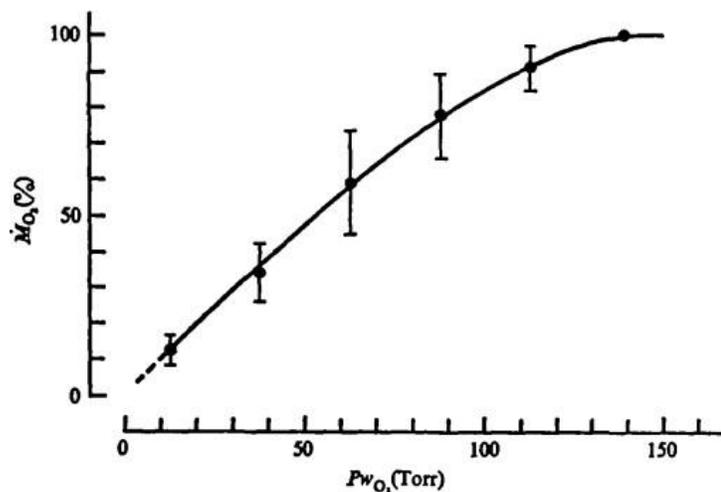
Ce ver marin, à respiration branchiale et cutanée vit dans les zones littorales soumises aux marées. Son environnement très changeant implique, de la part de celui-ci la capacité de pouvoir s'adapter à la présence et à l'absence d'eau donc à des variations drastiques de la quantité d'oxygène disponible.

Ainsi, au cours des marées hautes, lorsque l'eau remplit son terrier, l'oxygénation du ver est maximale et, est minimale à marée basse lorsque celle-ci s'en retire (6). Pour éviter une hypoxie d'environ six heures, le ver vit grâce à un stock d'oxygène qu'il emmagasine lors de la marée haute (6) (13). L'on doit au Docteur Franck Zal, directeur de la société HEMARINA située dans le Finistère, qui fut le premier à s'être intéressé à la physiologie respiratoire de ce lombric, cette découverte majeure et notamment la compréhension du mécanisme de survie du ver (2).

Après avoir recréé au laboratoire, alternativement les périodes de stress avec peu d'oxygène (à marée basse) et les périodes sous oxygène (à marée haute), le Docteur Zal et son équipe ont observé que l'Arénicole présentait un cycle dit « ralenti » au cours des marées basses. En effet, son métabolisme et son comportement changent, il arrête de se nourrir, rétracte ses branchies et interrompt pratiquement totalement son système circulatoire, ce qui lui permet d'éviter de consommer trop d'oxygène. C'est à peu près, l'équivalent de l'hibernation pour certains ours (15).

Le graphique ci-dessous (Graphique 1) illustre bien ces constatations. Il représente la consommation d'oxygène ( $Mo_2$ ) en pourcentage en fonction de la pression partielle en

oxygène de l'eau de mer ( $PwO_2$ ). L'étude a été réalisée sur des Arénicoles maintenues à une température de 15°C (16). Lorsque la  $PwO_2$  diminue, soit lors des marées basses, la consommation en oxygène par les vers chute également ( $PwO_2 \approx 10$  Torr = 1.33 KPa  $\rightarrow$   $MO_2 \approx 10\%$ ). *A contrario*, si les vers se trouvent dans des conditions avec de fortes pressions partielles en oxygène leur consommation va augmenter ( $PwO_2 \approx 110$  Torr = 14.7 KPa  $\rightarrow$   $MO_2 \approx 90\%$ ). Il y a donc une adaptation des besoins en oxygène en fonction des possibilités d'accès à l'oxygène environnant (16).



Graphique 1 : Concentration en oxygène (%) en fonction de la pression partielle en oxygène de l'eau de mer (Torr) (16)

Ce mécanisme d'adaptation métabolique, très certainement par rétention d'oxygène permet donc au ver de vivre même en l'absence de celui-ci.

A la suite de cette découverte et en poursuivant leur étude de cet organisme marin, les chercheurs ont constaté que l'hémoglobine de celui-ci ne se comportait pas comme celle que l'on rencontre habituellement chez la plupart des êtres vivants qui en possèdent. En effet, cette hémoglobine particulière permet aux Arénicoles de pouvoir se maintenir dans un environnement faiblement voire non oxygéné. De plus, cette hémoglobine, par ses propriétés étonnantes pourrait également se révéler intéressante en médecine humaine.

### III. L'enjeu de l'hémoglobine

#### A. Présentation de l'hémoglobine humaine

##### 1. Description

L'hémoglobine humaine est une protéine de 64 kilo-Daltons (kDa), soit d'assez grande taille, présente dans nos globules rouges, dont la durée de vie est de 120 jours. Cette protéine est composée de l'association de quatre monomères formant ainsi un tétramère. Chaque monomère est lui-même constitué de deux éléments étroitement reliés entre eux :

- ❖ L'hème : sous-unité contenant un atome de Fer présent sous la forme ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). La forme hémique est la partie la plus importante de l'hémoglobine puisqu'elle représente le site de fixation du dioxygène ( $\text{O}_2$ ). Lorsque celui-ci est fixé au Fer, il y a alors une oxygénation de l'hémoglobine et l'on parlera d'oxyhémoglobine.
  
- ❖ La globine : fraction protéique présente sous quatre formes (une forme par monomère), une chaîne Alpha 1, Alpha 2, Bêta 1 et Bêta 2. La globine a pour rôle d'optimiser la position du Fer et donc la fixation de l'oxygène.

Pour résumer, une hémoglobine Humaine est composée de quatre atomes de Fer pouvant fixer quatre molécules de dioxygène et de quatre globines (Figure 5) (17).

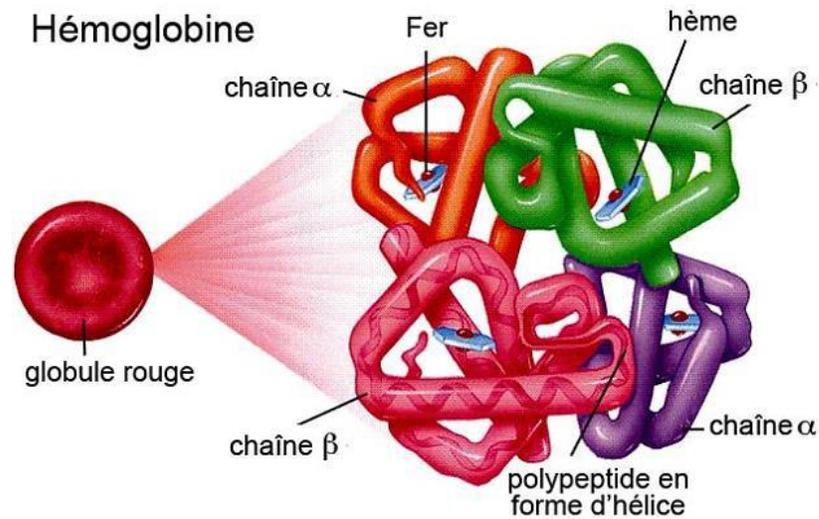


Figure 5 : Structure de l'Hémoglobine Humaine (13)

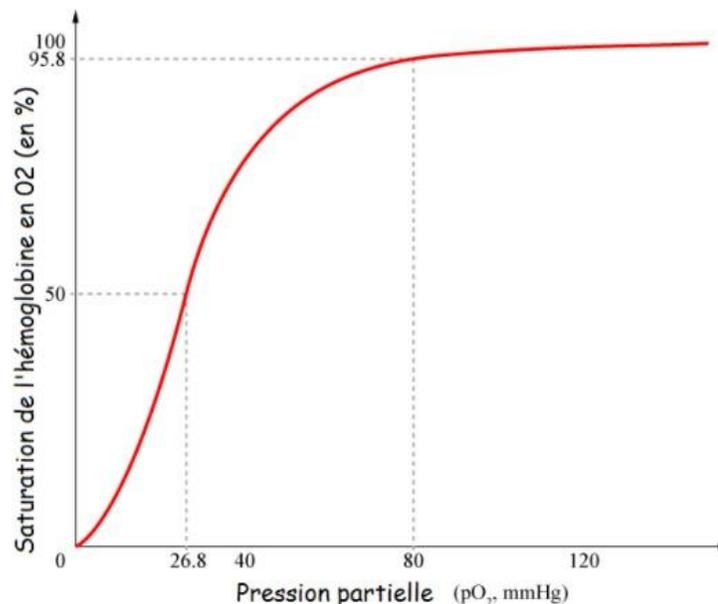
#### a) *Processus de fixation de l'oxygène à l'hémoglobine*

Le dioxygène ne peut se fixer que sur l'atome de Fer existant sous sa forme de Fer ferreux. Inversement, lorsque celui-ci existe sous la forme de Fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) la fixation du dioxygène est impossible, on parle alors de méthémoglobine. A noter que cette forme ferrique apparaît généralement à la présence de produits oxydants tels que certains médicaments (comme la quinine) ou de nitrites, de nitrates et à la suite d'une intoxication au monoxyde de carbone (CO).

Le processus de fixation de l'oxygène à l'hémoglobine repose sur un mode dit allostérique, c'est-à-dire que la fixation d'une molécule de dioxygène sur un atome de Fer va conditionner les prochains sites de fixations des molécules de dioxygène sur les trois autres atomes de Fer ferreux. En d'autres termes, la première fixation de dioxygène favorise la deuxième fixation et ainsi de suite. Cette facilitation est due à un changement de conformation qui apparaît lors de chaque fixation sur un atome de Fer dont le noyau hémique suivant devient de plus en plus relâché, donc accessible aux molécules de dioxygène suivantes. Finalement, l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène augmente pour chaque nouvelle molécule de dioxygène se fixant sur un noyau hémique.

Ce processus de fixation, qui a lieu au niveau des poumons, est rapide et réversible puisque 98,5% de l'oxygène se lie à l'hémoglobine pour être transportés puis libérés au niveaux des tissus. L'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène déterminera sa capacité de transport, donc la qualité de l'oxygénation tissulaire.

Cet effet allostérique est démontré par la courbe de dissociation de l'oxygène à l'hémoglobine (Graphique 2). Ce graphique représente une courbe sigmoïde de la saturation de l'hémoglobine en oxygène (en pourcentage) en fonction de la pression partielle en oxygène en millimètres de mercure (mmHg) du milieu. On voit que plus la pression partielle en oxygène est élevée, plus l'affinité de l'oxygène à l'hémoglobine est importante jusqu'à atteindre un plateau (17). Cette courbe est donc bien reliée à la propriété particulière de l'hémoglobine qui est de changer d'affinité pour l'oxygène en fonction de son degré de saturation. *A contrario*, plus la pression partielle en oxygène diminue, plus le pourcentage de saturation de l'hémoglobine en oxygène diminue, on parlera alors dans ce cas de désaturation ; désaturation qui correspond à une libération de l'oxygène au niveau tissulaire.



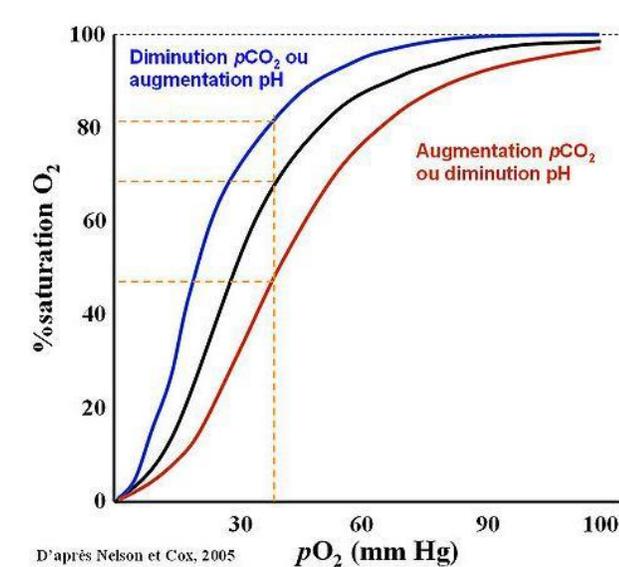
Graphique 2 : Courbe de dissociation de l'hémoglobine Humaine (17)

Dans les conditions physiologiques ( $\text{pH} = 7,6$  ;  $\text{P}_{\text{O}_2} = 100 \text{ mmHg}$  ;  $\text{P}_{\text{CO}_2} = 40 \text{ mmHg}$ ), la saturation de l'hémoglobine en oxygène est d'environ 98% au niveau du sang artériel. Cependant, sous certaines conditions, la fixation de l'oxygène peut être perturbée, favorisant ainsi la dissociation de l'hémoglobine. On parlera alors de l'effet Bohr pour qualifier de telles perturbations (Graphique 3). Ainsi, lorsque la pression partielle en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) croît, ou lors d'une acidification du milieu, on observe un déplacement de la courbe physiologique de la dissociation de l'oxygène (courbe noire) vers la droite. Cela se traduit par une dissociation de l'hémoglobine entraînant une diminution du pourcentage de saturation de l'hémoglobine en oxygène malgré une valeur stable de pression partielle en  $\text{O}_2$  (Tableau N°II). Ce phénomène se produit également lors d'une augmentation de la température et/ou de la concentration en 2, 3 DiPhosphoGlycérate (2, 3-DPG) (17).

Tableau N°II : Variations du pourcentage de saturation de l' $\text{O}_2$  en fonction du pH, de la pression de  $\text{CO}_2$ , de la température et de la concentration en 2, 3-DPG sous pression d' $\text{O}_2$  constante (18)

	<b><math>\text{P}_{\text{O}_2}</math> (mmHg)</b>	<b>% saturation <math>\text{O}_2</math></b>
<b>Condition physiologique</b>	40	70
<b>pH <math>\searrow</math> ; <math>\text{P}_{\text{CO}_2}</math> <math>\nearrow</math> ; <math>\text{T}^\circ\text{C}</math> <math>\nearrow</math> ; 2, 3-DPG <math>\nearrow</math></b>	40	48

Dans le cas, par exemple d'une acidose, entraînant une diminution du pH due à une augmentation des ions  $\text{H}^+$  circulants, marqueurs d'une augmentation de l'activité cellulaire, il en résultera donc une augmentation des besoins en oxygène. Il y aura alors une baisse de l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine afin que celui-ci soit libéré rapidement au niveau des tissus demandeurs (17) (18).



Graphique 3 : Effet Bohr (18)

## 2. Les besoins en sang en médecine humaine

Actuellement, les demandes en sang humain vont en s'accroissant et les pénuries sont fréquentes. En effet, pour répondre aux besoins des malades, il faudrait 10 000 unités par jour. Malgré les incitations répétées à la population française pour le don du sang de la part de l'Établissement Français du Sang (EFS), le manque de sang reste chronique (19).

En plus des difficultés quantitatives, il faut également prendre en compte d'autres problèmes tels que les incompatibilités sanguines, l'existence d'antigènes rares comme ceux du système Kell par exemple auxquels se rajoutent les évictions de donneurs présentant un certain nombre de pathologies infectieuses à haut risque. Comme nous le savons, avant toute transfusion ou lors d'une grossesse, il faut rechercher le groupe sanguin de l'individu. Notre groupe sanguin est déterminé par deux systèmes complémentaires : le système ABO et Rhésus.

Le système ABO va définir le groupe sanguin selon la présence d'antigènes A, B ou AB à la surface des globules rouges ou non pour le groupe O. Ainsi, par exemple pour un individu du groupe A cela signifie que ces globules rouges présentent l'antigène A et son système immunitaire produira des anticorps Anti-B. On comprend donc l'importance de connaître les groupes sanguins des donneurs et receveurs, afin d'éviter les accidents transfusionnels (20).

Enfin le système Rhésus permet de déterminer si l'individu sera dit « Rhésus positif » ou « négatif ». C'est-à-dire, s'il présentera ou non l'antigène D sur ses globules rouges. On obtient alors la possibilité de huit groupes sanguins : A<sup>+</sup>, A<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, B<sup>-</sup>, AB<sup>+</sup>, AB<sup>-</sup>, O<sup>+</sup> et O<sup>-</sup> (20). Du point de vue de la compatibilité, il s'agit du même principe que pour le système ABO, une personne Rhésus négatif synthétisera des anticorps Anti-D et ne pourra donc pas recevoir du sang d'un donneur ayant l'antigène D.

On peut résumer dans le tableau ci-dessous (Tableau N°III) les compatibilités sanguines en fonction des groupes sanguins des donneurs et receveurs (21) :

Tableau N°III : Compatibilité sanguine (21)

Compatibilité des <b>GROUPES SANGUINS</b>		<b>Donneur</b>							
		O-	O+	B-	B+	A-	A+	AB-	AB+
<b>Receveur</b>	AB+	●	●	●	●	●	●	●	●
	AB-	●		●		●		●	
	A+	●	●			●	●		
	A-	●				●			
	B+	●	●	●	●				
	B-	●		●					
	O+	●	●						
	O-	●							

Même si nous arrivons à déterminer les compatibilités sanguines, il faut toujours garder à l'esprit que le risque zéro n'existe pas. Bien que de nouvelles mesures de sécurité aient été mises en place suite à l'affaire du sang contaminé, il existe toujours un risque de transmissions d'éléments infectieux responsables de pathologies graves tels que l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), le Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV), l'hépatite B et/ou C qui pourraient être présents dans le sang d'un donneur à des titres indétectables par les tests employés ou encore avec les virus émergents pour lesquels il n'existe pas encore de moyens paracliniques de détection tels que pour le virus Zika (22).

Bien que des nouvelles méthodes de sécurité, reposant sur des tests sérologiques plus sensibles et plus fiables, aient été mises au point pour détecter des pathogènes ou des anticorps au tout début de la séroconversion, le sang humain en provenance d'un don reste problématique. On peut également réaliser des tests d'amplification des acides nucléiques, appelé test TAAN. Ils permettent de détecter le génome d'un élément infectieux et ainsi détecter une infection de façon plus précise et surtout plus précoce. En effet, le plus souvent, la période de détection d'une infection ne peut se faire seulement après une période d'incubation de 7 à 21 jours qui est toujours cliniquement muette. Ce délai se nomme « fenêtre sérologique », et présente un risque majeur d'infection du receveur puisque les tests de dépistages seront négatifs (1).

D'où l'intérêt de trouver rapidement un substitut sanguin qui éviterait tous ces problèmes.

En conclusion, le coût de production de sang utilisable revient très cher, tant pour le prélèvement, que pour son analyse, les préparations éventuels des différentes fractions de celui-ci (culots globulaires, globules blancs, etc...) ou pour sa conservation. D'autant plus, qu'à la suite d'un prélèvement, le sang ne peut être transfusé immédiatement. Cette préparation de sang contrôlé se divise en quatre étapes (23) :

- ❖ Le prélèvement réalisé par un Infirmier Diplômé d'Etat (IDE).

- ❖ La préparation avec en premier temps une filtration pour retirer les globules blancs puis suivie d'une centrifugation afin de séparer les différents composants du sang (globules rouges, plasma et plaquettes). Il faut savoir que l'on ne transfuse jamais à un malade du sang total mais seulement le composant dont il a besoin.
- ❖ Une qualification biologique qui consiste en une vérification sérologique, virologique et bactériologique des globules rouges. En cas d'une éventuelle détection d'un élément indésirable, les échantillons sont détruits et le donneur prévenu est retiré du « pool » des donateurs volontaires.
- ❖ Distribution faite par l'EFS qui approvisionne les 1 500 cliniques et hôpitaux selon leurs demandes.

Cette production revient chère surtout qu'il s'agit de produits à durée de vie, le plus souvent courte (Tableau N°IV) ce qui nécessite une mobilisation continue et régulière de la population pour répondre aux besoins.

Tableau N°IV : Exemple de durées de vie de différentes fractions du sang (17)

<b>Composants du sang</b>	<b>Plaquettes</b>	<b>Globules rouges</b>	<b>Plasma</b>
<b>Durée de vie (jours)</b>	<b>5</b>	<b>42</b>	<b>365</b>

## B. De l'intérêt à la recherche de substituts sanguins

Avec toutes ces contraintes, on comprend aisément que l'Homme ait voulu absolument chercher un substitut afin de les contourner. Mais une fois encore, d'autres problèmes ont ralenti les recherches sur la synthèse d'un substitut sanguin ou d'hémoglobines synthétiques ou recombinantes. En effet, une des difficultés que l'on rencontre est le coût très élevé de la production d'une telle hémoglobine extracellulaire

synthétique et le risque d'apparition d'effets secondaires parfois sévères chez les patients transfusés.

Ainsi, les quelques prototypes d'hémoglobine synthétiques testées au cours d'essais cliniques ont mis en évidence de nombreux effets indésirables sérieux au rapport bénéfice-risque défavorable. Ces effets favorisaient, notamment, la formation de radicaux libres (22), provoquaient dans certains cas des réactions de chocs anaphylactiques (22) et majoritairement des vasoconstrictions responsables au long terme d'hypertension artérielle (22).

### C. L'hémoglobine d'*Arenicola marina*

#### 1. Pourquoi tant d'intérêt pour ce ver marin ?

Le fait d'avoir trouvé un organisme vivant, tel que ce ver marin présentant une physiologie respiratoire originale, a redonné de l'espoir pour la découverte d'un potentiel substitut sanguin, cette fois-ci naturel, en permettant l'approfondissement de l'étude de celle-ci et des substances impliquées dans ce processus.

Ces études ont permis de mettre en évidence les nombreux avantages représentés par cet organisme et des possibilités qu'il recèle pour la médecine humaine.

Par sa biomasse importante dans la nature, sa facilité de capture au niveau du littoral et son élevage facile, *Arenicola marina*, présente comparativement au don de sang, une source quasi inépuisable d'hémoglobine. De plus, afin d'éviter sa disparition dans son milieu naturel, on réalise maintenant des élevages à grande échelle principalement localisés dans le Finistère. Ajouté à cela, l'élevage industriel de cet animal est simple, facilement reproductible, demandant un entretien minimal et l'obtention d'hémoglobine, suite à une purification faite selon un procédé simple. Tout cela rend les coûts de production relativement faibles et rentables par rapport à ceux que nécessitent l'obtention de sang humain et/ou synthétique (24).

Un autre intérêt majeur de ce ver est l'absence totale de réponse immunogène car son hémoglobine est libre dans l'hémolymphe et, n'est pas glycosylée (absence de sucre fixé à l'hémoglobine) (25).

## 2. Structure et fonction de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*

Chez les annélides, l'hémoglobine se rencontre sous forme libre, extracellulaire au niveau du liquide coelomique qui baigne l'ensemble de leurs tissus et organes (26).

Le modèle proposé par Franck Zal et ses collaborateurs, depuis 2014, permet de comprendre la structure de celle-ci, qui se présente sous une forme quaternaire (26).

Elle est constituée de deux grandes parties (26) :

- ❖ La chaîne dite fonctionnelle qui correspond à une globine. Il s'agit du site actif sur lequel vient se lier de façon réversible l'oxygène. Il y aurait en tout, 156 chaînes de globines, donc 156 sites possibles de liaisons à l'oxygène. De plus, comme chez l'Homme, cette globine existe sous quatre types de globines différentes. Ces globines s'assemblent entre elles pour former des hétéro-trimères ou des monomères, qui eux-mêmes se lient pour aboutir à des dodécamères (un trimère avec neuf monomères) (Figure 6) (27).
  
- ❖ La partie appelée linkers correspond à des chaînes peptidiques de liaisons essentielles maintenant l'intégrité de la structure. Il y aurait 42 chaînes de liaisons, formant entre elles des homos et hétérodimères (27).

D'un point de vue plus générale, la structure est symétrique, représentant deux hexagones superposées reliés entre eux de façon plus ou moins covalente, formant une structure quaternaire en bicouche hexagonale (Hexagonal Bilayer Hemoglobin, HBL-Hb) (Figure 7) (28).

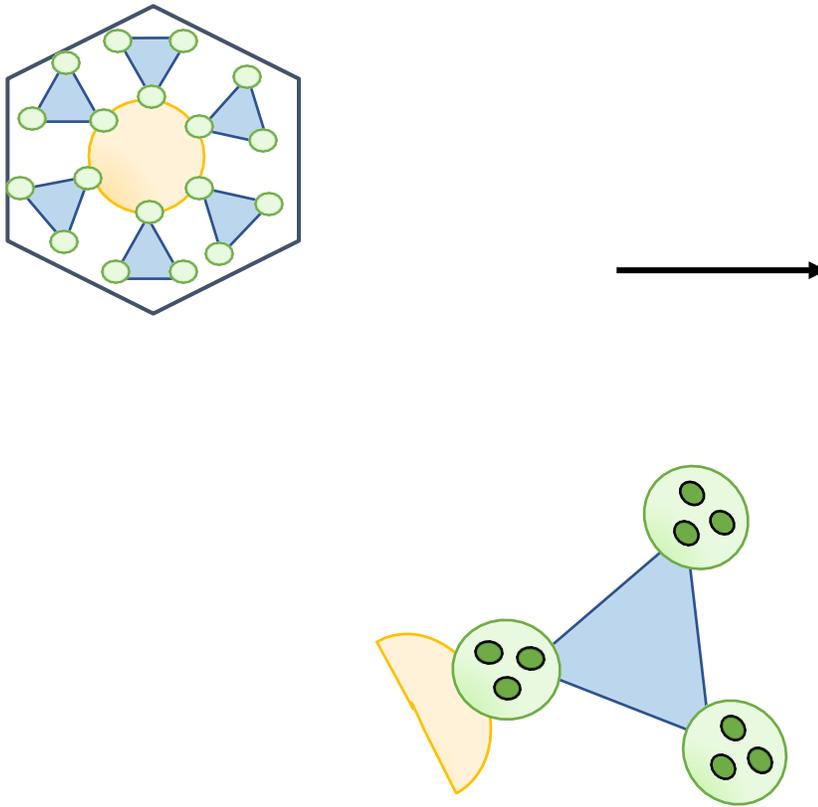


Figure 6 : Modèle de l'HBL-Hb d'*Arenicola marina* (26).

Un hexagone est composé de six dodécamères (  ) reliés entre eux par les linkers (  ).

Un dodécamère est composé d'un trimère (  ) et de neuf monomères (  ).



Figure 7 : Hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* vue en microscopie électronique.

D'après Breton-Gorius, INSERM (27)

Cette hémoglobine libre existe donc sous forme polymérisée de grande taille et de haut poids moléculaire de l'ordre de 3 600 kDa (27), soit environ 56 fois le poids de l'hémoglobine humaine. Ainsi, peut-elle être visualisée en microscopie électronique (ME) (Figure 7). Cette taille importante présente quelques avantages pour le patient la recevant, notamment en évitant les extravasations au travers de l'endothélium vasculaire ou des capillaires glomérulaires en cas de microlésions tout en évitant une augmentation, même légère, de la pression osmotique *in situ* (22).

Enfin, lorsqu'elle est présente sous forme dissoute dans la circulation sanguine humaine, elle est par conséquent beaucoup plus petite (environ 250 fois) qu'un globule rouge (7.5µm chez l'Homme) qui transporte l'hémoglobine humaine et peut donc ainsi circuler bien plus facilement dans tout notre organisme, même dans les zones difficiles d'accès telles celles qui sont œdématiées (29).

Enfin, se rajoutant aux propriétés intéressantes décrites plus haut, cette hémoglobine présente une très haute affinité vis-à-vis de l'oxygène, bien supérieure (cinquante fois plus élevée) à celle décrite chez l'Homme.

Cette dernière a été démontrée suite aux travaux de Franck Zal (30).

En présence de phosphates organiques (2, 3-DPG), d'une augmentation de la température, de la concentration en CO<sub>2</sub> et lors d'une diminution du pH, l'affinité de l'hémoglobine humaine vis-à-vis de l'oxygène va décroître (Graphique 3 vu plus haut).

Les chercheurs ont fait des essais sur le sang Humain ainsi que sur l'hémoglobine d'Arénicole en les soumettant à différentes conditions d'environnement (Tableau N°V) (22) afin d'obtenir les paramètres caractéristiques de l'affinité de l'oxygène de l'hémoglobine d'*Arenicola marina* (AmHb). Celle-ci, a été évaluée en suivant les conditions physiologiques habituelles de cette animal marin, c'est-à-dire avec un pH à 7.4 et une température à 15°C (première colonne du tableau) et également, aux conditions physiologiques rencontrée chez l'Homme c'est-à-dire avec un pH à 7.35 à une température de 37°C (troisième colonne du tableau). Les valeurs témoins correspondent à celles observées dans les conditions physiologiques du sang humain (deuxième colonne du tableau).

La pression partielle nécessaire pour saturer la moitié des sites de liaisons de l'oxygène de l'hémoglobine ( $P_{50}$ ), le coefficient de coopérativité de demi-saturation ( $n_{50}$ ) (c'est-à-dire lorsqu'une protéine possède plusieurs site de fixations de ligands ou de substrats, la fixation sur l'un des sites augmente l'affinité pour l'autre site vis-à-vis du

même ligand (31)), l'effet de la température et l'effet Bohr ont été recherchés (Tableau N°V).

Dans les conditions physiologiques de l'Arénicole, la  $P_{50}$  est seulement de 2.6 mmHg contrairement à celle de l'Homme qui, pour obtenir les mêmes résultats demande des pressions dix fois supérieures, soit 26 mmHg. En revanche, si les mesures sont faites suivant les conditions physiologiques Humaine, l'affinité d'*AmHb* en oxygène diminue car la  $P_{50}$  est de 7 mmHg. Malgré tout, celle-ci reste bien supérieure à celle obtenue avec l'hémoglobine (Hb) humaine.

L'augmentation de la température (15°C vs 37°C) pourrait expliquer cette diminution d'affinité mais l'absence de donnée sur l'effet de la variation de la température sur le sang Humain nous ne permet pas de le confirmer.

Ces premiers résultats révèlent que, quel que soit l'environnement physiologique sous lequel on la soumet, l'*AmHb* présente une affinité pour l'oxygène bien plus élevée que l'Hb humaine. De plus, on n'observe pas de différences significatives pour le  $n_{50}$  de l'*AmHb* et ce quel que soit les conditions physiologiques étudiées. Ces résultats confirment que la nature des liaisons permettant la fixation et la libération de l'oxygène à l'*AmHb* est similaire à celle de l'hémoglobine humaine.

Ainsi, au vu de ces résultats préliminaires, l'on peut déjà conclure que la forte affinité pour l'oxygène de cette hémoglobine, bien que celle-ci diminue légèrement lorsqu'introduite dans les conditions physiologiques Humaines, en fait un excellent succédané au sang humain (Tableau N°VI).

**Tableau N°V** : Comparaison de différentes mises en situation sur l'affinité de l'hémoglobine en oxygène chez l'hémoglobine Humaine et d'*Arenicola marina* (22)

	<i>Arenicola marina</i> blood [51] <sup>b)</sup>	Human blood <sup>c)</sup>	AmHb
P <sub>50</sub> (mmHg)	2.6 ± 0.46	26–30 [52] <b>23<sup>d)</sup> (n=1)</b>	<b>7.05 ± 0.93<sup>d)</sup> (n=9)</b>
n <sub>50</sub>	2.5	2.7 [52] <b>2.75<sup>d)</sup> (n=1)</b>	<b>2.54 ± 0.23<sup>d)</sup> (n=9)</b>
Bohr coefficient <sup>e)</sup>	–0.96 at 15°C	n.d	–0.5 <sup>d)</sup>
ΔH (KJ mol <sup>-1</sup> ) <sup>e)</sup>	–35 (10° < T < 15°C) –18 (15° < T < 25°C)	n.d	–19 <sup>d)</sup>

a) The results obtained for this article are in bold and they are expressed as the results ± SEM; n.d.: not determined.

b) The experiments were performed under *A. marina* physiological conditions: 15°C, pH 7.4.

c) Only one measurement was performed to have a comparable result on the same instrument.

d) The oxygen equilibrium binding data were collected in dissolved lyophilized plasma (Sigma) in 10 mM HEPES, pH 7.35 at 37°C for a final heme concentration of 40 mg/mL. The Bohr coefficient was measured over the pH range 7.2–7.6, and the temperature effect from 33° to 41°C, which corresponds to the range of values encountered in human, including pathological cases.

e) The Bohr coefficient and temperature sensitivity of hemoglobin are calculated as described [54].

f) The SOD activity was determined using the Flohé and Ötting method [55] adapted for 96-well microplate measurements, for AmHb diluted into *Arenicola* buffer.

g) AmHb were incubated for 10 min with 50 mM KCN prior to the addition of xantine oxidase.

h) The Cu and Zn contents were determined by inductively coupled plasma-MS as described [56].

**Tableau N°VI** : Récapitulatif des caractéristiques de l'hémoglobine Humaine et d'*Arenicola marina*

	Hémoglobine Humaine	Hémoglobine d' <i>Arenicola marina</i>
<b>Nature</b>	Naturelle	<b>Naturelle</b>
<b>Poids</b>	64 kDa	<b>3 600 kDa</b>
<b>Structure</b>	4 sites d'oxygènes	<b>156 sites d'oxygènes</b>
<b>Réponse immunogène</b>	+++	<b>∅</b>
<b>Durée de vie</b>	42 jours	<b>Lyophilisat : 5 ans</b>
<b>Affinité oxygène</b>	+	<b>+++++ (50 fois &gt;)</b>
<b>Risque</b>	Transmissions pathologies, vasoconstriction	<b>∅</b>
<b>Production</b>	Chère, limitée (don du sang)	<b>Faible coût (élevage)</b>

### 3. Autres propriétés intéressantes de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*

Un problème rencontré fréquemment avec les substituts de globules rouges sont leurs très courtes durée de vie, qui est d'environ douze heures pour les transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine (HBOC) (22). En effet, ces transporteurs acellulaires sont sensibles à l'oxydation et leur dénaturation favorise la formation d'hémichrome ; hémoglobine instable par rupture partielle de la liaison entre l'hème et la globine entraînant ainsi une perte de la fonction de transport d'oxygène (22).

Cette oxydation, est un processus naturel que l'on rencontre chez tous les organismes vivants. Chez l'Homme, quotidiennement il y a une production en continu de radicaux libres. Ces derniers sont responsables d'un stress oxydant pour l'organisme entraînant au cours du temps un vieillissement tissulaire et aussi des lésions cellulaires, pouvant aboutir à l'apparition de cancers. La formation de ces radicaux libres est physiologique et a lieu lors de la respiration cellulaire. Se surajoutant à ce phénomène intrinsèque, il existe aussi, de nombreux facteurs extrinsèques qui participent à la production d'espèces réactives à l'oxygène comme la pollution, le tabagisme, les expositions prolongées au soleil ou encore une mauvaise alimentation.

Pour protéger l'organisme de ces radicaux libres, notre corps possède un système de défense dont la Super Oxyde Dismutase (SOD) qui est une métalloprotéine, l'un des acteurs clefs de protection vis-à-vis du stress oxydatif (32). Elle a un rôle anti-radicalaire et un effet antioxydant (32). La SOD se rencontre dans toutes nos cellules mais son activité est la plus importante au niveau du foie, du cerveau, des neurones et des érythrocytes (33). Chez l'Homme, sa structure comprend deux atomes de Cuivre et de Zinc (33).

Un certain nombre d'études supplémentaires a été entrepris afin de vérifier l'éventuelle stabilité de l'*AmHb* face au stress oxydatif.

Ainsi, Franck Zal et son équipe ont tenté de rechercher et de quantifier la résistance de l'*AmHb* à l'oxydation et sa stabilité au choc oxydatif (Tableau N°VII) (22) par la mesure de l'activité de la SOD à la fois dans le sang Humain, au niveau des globules rouges ainsi que pour l'hémoglobine d'*Arenicola marina*.

Les résultats obtenus ont montré que l'activité de la SOD est plus élevée pour l'*AmHb* que dans les globules rouges de l'Homme (1 à 2 U/mg Hb pour les globules rouges Humain vs 3.53 U/mg Hb pour l'*AmHb*) (Tableau N°VII). Si nous nous intéressons à l'activité de la SOD dans le sang Humain, celle-ci a une meilleure activité que les précédentes mesures (12.1 U/mg Hb). Il est normal de trouver une mesure plus élevée car ce relevé est fait dans le sang Humain, c'est-à-dire prenant en compte tous les éléments du sang (plasma et cellules), l'activité sera donc plus efficace. Cette première observation montre un effet antioxydant intrinsèque à l'*AmHb*. Cette étude permet également d'émettre l'hypothèse suivante : l'activité SOD est plus importante chez les Arénicoles du fait d'une teneur en métal plus importante que chez l'Homme. Pour l'hémoglobine de l'Arénicole, on recense 156 atomes de Fer, 3.58 atomes de Cuivre et 5.13 atomes de Zinc, contrairement à l'hémoglobine de l'Homme qui n'a que 4 atomes de Fer. Cette différence pourrait être due à l'existence d'une activité SOD intrinsèque à l'*AmHb*.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence que l'*AmHb* possédait une action antioxydante intrinsèque plus importante que celle de l'Homme, cette enzyme a été nommée SOD-like chez *Arenicola marina*. Celle-ci neutralise de façon importante les radicaux superoxydes nocifs.

Tableau N°VII : Mesure de l'activité antioxydante dans le sang Humain, dans l'hémoglobine d'*Arenicola marina* et dans les globules rouges Humains (22)

	Human blood <sup>c)</sup>	AmHb	RBCs
SOD activity (U/mg Hb)	12.1 ± 1.7 [40]	<b>3.53 ± 0.02 (n=3)<sup>f)</sup></b>	1–2 [53]
CN inhibition		<b>100%<sup>g)</sup></b>	–
Fe (atom/molecule)		156 [11]	–
Cu (atom/molecule)		<b>3.58 ± 1.17 (n=5)<sup>h)</sup></b>	–
Zn (atom/molecule)		<b>5.13 ± 0.75 (n=5)<sup>h)</sup></b>	–

a) The results obtained for this article are in bold and they are expressed as the results ± SEM; n.d.: not determined.

b) The experiments were performed under *A. marina* physiological conditions: 15°C, pH 7.4.

c) Only one measurement was performed to have a comparable result on the same instrument.

d) The oxygen equilibrium binding data were collected in dissolved lyophilized plasma (Sigma) in 10 mM HEPES, pH 7.35 at 37°C for a final heme concentration of 40 mg/mL. The Bohr coefficient was measured over the pH range 7.2–7.6, and the temperature effect from 33° to 41°C, which corresponds to the range of values encountered in human, including pathological cases.

e) The Bohr coefficient and temperature sensitivity of hemoglobin are calculated as described [54].

f) The SOD activity was determined using the Flohé and Otting method [55] adapted for 96-well microplate measurements, for AmHb diluted into *Arenicola* buffer.

g) AmHb were incubated for 10 min with 50 mM KCN prior to the addition of xantine oxidase.

h) The Cu and Zn contents were determined by inductively coupled plasma-MS as described [56].

Les propriétés antioxydantes inhérentes à l'AmHb présentent donc un double rôle, à la fois d'empêcher, ou du moins, de diminuer la formation de radicaux libres et de permettre, par voie de conséquence, de conserver l'intégrité fonctionnelle de cette hémoglobine.

Un autre problème directement lié à l'emploi chez l'Homme d'une substance animale de nature protéique est le risque possible que celle-ci soit immunogène, ce qui limiterait, bien évidemment, son emploi chez le patient et diminuerait d'autant l'importance de l'AmHb en pratique humaine.

Pour étudier l'éventualité de cette réponse immunogène, celle-ci a été évaluée chez des souris, chez lesquelles une ou deux administrations en intraveineuse (IV) d'hémoglobine d'Arénicole à des doses suffisamment élevées pour induire une réponse immune ont été réalisées. Ils se sont intéressés aux anticorps Ig E et Ig G2a (sous classe des Ig G).

Pour rappel les Ig E sont des anticorps produits lors de réactions allergiques, et les Ig G vont refléter l'état du système immunitaire à la suite d'une séroconversion. Pour

information, dans cette étude, les scientifiques ne se sont pas attardés sur la réponse des Ig M pour deux raisons : les Ig G représentent 80% des anticorps circulants contre 10% pour les Ig M et une non-réponse des Ig G impliquerait la non-réponse des Ig M.

Si on s'intéresse à la figure 8 où seules les Ig E ont été titrées chez des souris ayant reçu séparément une injection de solution isotonique de Chlorure de Sodium (NaCl), de tampon d'arénicole (composé de 4 mmol de chlorure de potassium ; 145 mmol de NaCl ; 0.2 mmol de chlorure de magnésium et 10 mmol d'HEPES<sup>1</sup> pour 0.1 mol d'hydroxyde de sodium à un pH de 6.8), de solution d'Ovalbumine et de solution d'hémoglobine d'Arénicole (*AmHb*). On remarque que seule la solution d'Ovalbumine, qui est la protéine principale du blanc d'œuf, déclenche une réponse immunitaire de façon significative (375 ng/mL d'Ig E vs 185 ng/mL d'Ig E pour l'hémoglobine d'Arénicole).

On observe exactement une réponse similaire, si on compare les titres des Ig E et Ig G2a obtenus chez des souris ayant reçu deux injections de solution tampon d'Arénicole, de solution d'Ovalbumine ou de solution d'hémoglobine d'Arénicole à sept jours d'intervalle (Figure 9). La réponse immunitaire d'Ig E est significative pour les souris ayant reçu la solution d'Ovalbumine (1190 ng/mL vs 800 ng/mL pour l'*AmHb*, il faut prendre en compte que l'étude a été faite sur des souris hypertendues ce qui favorise la production d'anticorps). De plus, il y a eu 33% de décès de souris enregistrés uniquement dans le groupe d'Ovalbumine. Enfin, les réponses d'Ig G2a obtenues se sont pas significativement différentes dans les trois groupes.

Pour conclure, ces expériences ont montré l'absence de réponse immunitaire et allergique après administration d'hémoglobine d'Arénicole chez des souris. Cette observation est très certainement due à la taille de l'hémoglobine d'Arénicole. En effet, plus une protéine est de grande taille plus les mécanismes de formation d'anticorps sont bloqués (22).

---

<sup>1</sup> HEPES : tampon zwitterionique permettant de maintenir un pH physiologique (34) .

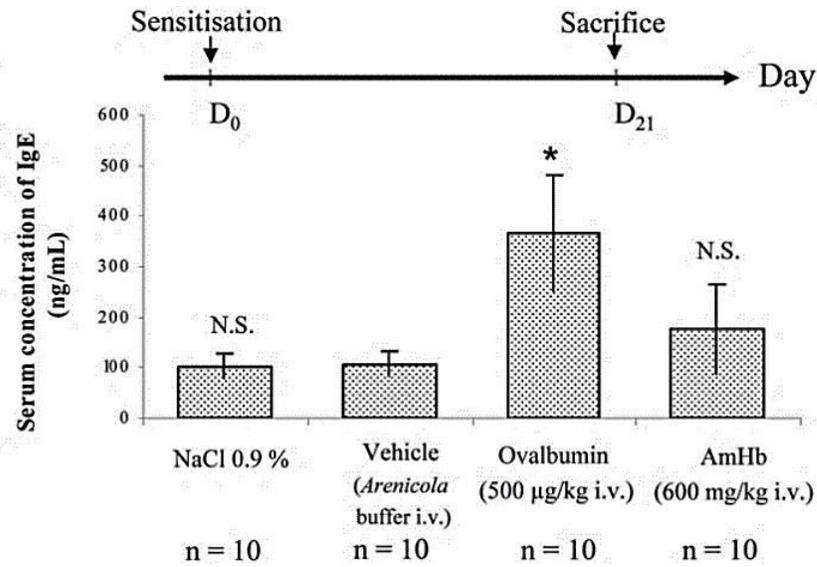


Figure 8 : Dosage de la réponse des Anticorps IgE chez des souris après une administration en IV de NaCl, tampon d'Arénicole, d'Ovalbumine et d'AmHb.

\* = p-value < 0.05 ; NS = Non Significatif (22)

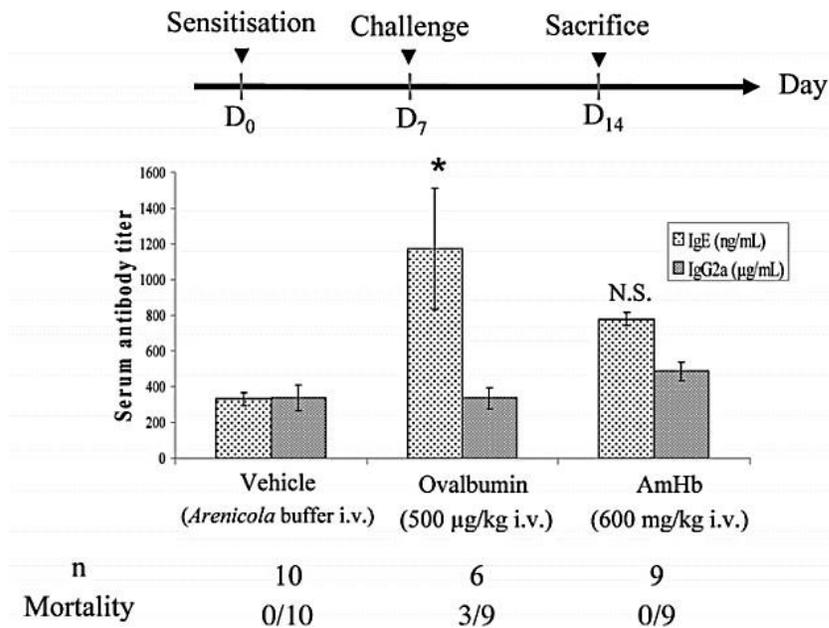


Figure 9 : Titration des Anticorps IgE et IgG2a chez des souris après deux administrations à 7 jours d'intervalle en IV de tampon d'Arénicole, d'Ovalbumine et d'AmHb.

\* = p-value < 0.05 ; NS = Non Significatif (22)

## IV. De la plage au laboratoire

### A. Comment utiliser ce ver marin en santé humaine ?

L'Homme possède de l'hémoglobine intracellulaire (contenue dans les cellules nucléées et les érythrocytes) mais aussi extracellulaire (dissoute dans le sang et contenue dans les vaisseaux sanguins). Tandis que pour les représentants appartenant à la famille des *Arenicolidae*, leur hémoglobine est exclusivement extracellulaire contenue dans le liquide coelomique. C'est donc ce liquide qu'il faudra extraire des vers pour le récupérer.

Avant de commencer à développer à grande échelle les essais sur l'arénicole, il a fallu créer des parcs d'élevage afin de ne pas « défauner » les plages, d'autant plus que les vers ne se reproduisent qu'une seule fois par an entre Octobre et Novembre (au moment de la Toussaint). Les vers utilisés pour la recherche médicale sont donc élevés en aquaculture. Ceci implique que l'élevage réponde à un certain nombre de critères de qualité et de traçabilité par l'évaluation constante de celles-ci selon les normes GMP (*Good Manufacturing Practice* soit les Bonnes Pratiques de Fabrication). Répondre aux normes GMP est indispensable pour la fabrication de médicaments à usage Humain ou vétérinaire.

La société HEMARINA possède une ferme d'élevage d'*Arenicola marina*, qui se trouve à Noirmoutier (Figure 10) (photo N°5 en annexe). Elle s'étale sur 17 000 hectares avec des bassins d'élevage de 2 000 m<sup>2</sup>. En 2017, elle a produit près de deux tonnes de vers, produisant environ 4 000 à 6 000 doses de solution de conservation de greffons qui fut sa première indication en France.

Aux Pays Bas, des fermes cultivent déjà cet animal mais pour la pêche et l'aquaculture de poissons et de crevettes.



*Figure 10 : Bassin de culture d'Arenicola marina à Noirmoutier (35)*

Dans un deuxième temps, HEMARINA va s'orienter dans l'isolation (Figure 11) de l'hémoglobine à partir de l'extrait total suivant des conditions pharmaceutiques (2) (36).



*Figure 11 : Contrôle de qualité assuré par le personnel de la société HEMARINA (35)*

Après plusieurs tentatives infructueuses de récupération du liquide cœlomique contenant l'*AmHb*, Franck Zal va modifier les techniques d'extraction vers une extraction de type congélation-décongélation. Au départ, le précieux liquide était prélevé directement à la seringue, ver par ver, ou par broyage de ces derniers mais cela amenait à des rendements peu concluants.

En effet, lorsque le ver est congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis décongeler à  $4^{\circ}\text{C}$ , celui-ci subit un choc hémorragique. Le ver se vide alors littéralement de son « sang », qu'il suffit de récupérer, puis ensuite de filtrer et de purifier. Tout ce processus d'extraction permet d'obtenir une hémoglobine parfaitement pure en une semaine (37) (38).

A partir de cette hémoglobine purifiée, deux voies de conservation sont possibles :

- ❖ Le sang peut être lyophilisé (Figure 12) : on déshydrate l'hémoglobine purifiée, on obtient tout simplement du sang sous forme de poudre. Cette forme de conservation serait un avantage considérable puisque cela permettrait de conserver le sang à la fois à température ambiante et au moins pendant cinq années contrairement aux poches de sang qui ont une durée de vie de 42 jours à  $4^{\circ}\text{C}$ . Cette lyophilisation permet de se soustraire de la problématique imposée par le maintien de la chaîne du froid. Au-delà de cette limite, les poches sont détruites. Pour reconstituer une poche de sang à partir du lyophilisat, il suffit de remettre en solution l'hémoglobine à partir d'eau pour préparation injectable (eau ppi) et on obtient l'équivalent d'une poche de sang de 400mL (2) (6).
  
- ❖ Le sang reste liquide (Figure 12) : ici le sang peut être directement conditionné dans une poche ou plus fréquemment conservé dans des flacons à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Généralement, la température de stockage au centre de production est de  $-80^{\circ}\text{C}$  puis une fois livré se garde pendant 5 ans à  $-20^{\circ}\text{C}$  (25) (39).

Pour ces deux formes de conservation, le sang est conditionné dans des flacons de 30 mL.

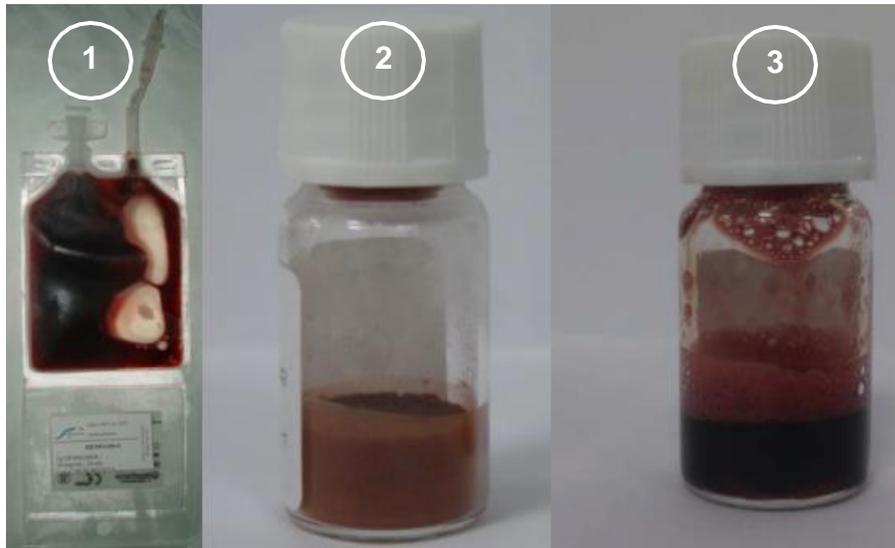


Figure 12 : Extraction de l'hémoglobine d'*Arenicola marina* purifiée et présentée sous différentes formes galéniques de conservation (33)

1 : Sous forme liquide dans une poche prête à l'emploi

2 : Sous forme lyophilisée

3 : Sous forme de solution après ajout d'eau ppi dans un lyophilisat

## B. Les premières études

Bien évidemment, avant de passer directement à l'Homme chez lequel Franck Zal est persuadé que des applications concrètes de ces découvertes en matière de santé sont possibles, il a fallu d'abord tester cette hémoglobine sur les animaux. Malheureusement, l'idée première d'utilisation de cette hémoglobine, en remplacement des poches de transfusion sanguine pour pallier aux pénuries chroniques, bien qu'ambitieuse, se heurte aux coûts de la recherche, du développement nécessaire et de la complexité de la réglementation sur les produits sanguins. Le docteur Franck Zal va orienter alors ses recherches vers des études sur des applications intermédiaires et principalement sur la préservation des greffons (30) (37).

Avant de passer à l'utilisation chez l'Homme, il faut prouver l'innocuité de l'*AmHb* chez celui-ci. Dans un premier temps, le Dr. Franck Zal a vidé jusqu'à 90% du volume sanguin de souris et de rats puis les a transfusés avec l'hémoglobine d'Arénicole. Cette exsanguino-transfusion, n'a été responsable d'aucune anomalie visible chez les rongeurs qui restaient en parfaite santé, et qui de plus, avec du sang du ver marin, ne présentaient aucune réaction allergique, ni immunitaire ou cytotoxique. De plus, des tests d'AMES ont été faits et ont conclu à l'absence de propriétés mutagéniques de cette hémoglobine marine. Suite à ces études, un premier brevet a été déposé dans les années 2000, permettant d'étendre le champ de recherche, d'abord à d'autres animaux puis à l'Homme (2) (24) (40).

## 1. Une hémoglobine pour la préservation des organes : *HEMO<sub>2</sub>Life*<sup>®</sup>

### a) *Pourquoi s'intéresser à la transplantation ?*

Toute transplantation d'organe est une course contre la montre. En effet, dès lors que celui-ci est prélevé, cela implique directement une déconnection de l'organe de la circulation sanguine, responsable d'une ischémie tissulaire aiguë. Ceci va alors entraîner, par voie de conséquence, une souffrance puis une dégradation tissulaire à la suite de l'accumulation de déchets toxiques qui ne peuvent plus être éliminés, aboutissant également à une acidose intracellulaire. Ce stress pour l'organe provoque la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui majorent les lésions cellulaires, les rendant potentiellement irréversibles. D'où la perte du greffon et l'impossibilité de le transplanter.

Même avec un greffon obtenu et transplanté rapidement, les lésions préexistantes peuvent s'aggraver à cause d'une ré-oxygénation brutale. Ces dommages sont responsables d'une baisse de la nature fonctionnelle du greffon et d'un taux de survie diminué à long terme (24) (25) (41).

Aux problèmes liés à sa conservation, s'ajoutent ceux liés au délai et à la température. En effet, pour une conservation à 4°C, on considère que l'on peut maintenir

un rein, hors de son milieu naturel, environ douze heures, et six heures pour un cœur ou un poumon. Si la conservation se faisait à température ambiante, le rein ne pourrait guère survivre plus de 45 minutes. Il faut donc maîtriser la chaîne du froid entre le prélèvement et la transplantation, car malheureusement, aujourd'hui 50% des greffons qui sont prélevés ne peuvent être transplantés à temps (30) (42).

Le rôle de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*, transporteur d'oxygène, fonctionnant aussi bien à des températures négatives qu'à température ambiante, est utilisé comme additif dans toutes les solutions de préservation des greffons, et notamment en ce qui concerne les reins. En plus de préserver les greffons, cette hémoglobine permet d'augmenter le nombre de greffons disponibles, tout en diminuant le nombre de greffons inutilisables, apportant ainsi, une réponse au moins partielle à la pénurie d'organes (41). Ces mêmes constatations ont été faites sur des études portant sur des greffons de cœurs et de poumons (43).

#### *b) Quels sont les moyens actuels pour préserver les organes ?*

Actuellement, il existe deux méthodes de préservation des organes :

- ❖ Méthode *Static* : on plonge l'organe dans une solution d'eau, de sel et de colloïde. Puis on abaisse la température autour de 4°C, ce qui permet de diminuer le métabolisme de l'organe, diminuant de ce fait la consommation d'oxygène et d'énergie.

L'avantage de ce procédé vient de la présence des colloïdes. Ils exercent une pression oncotique sur la membrane prévenant, ainsi, la formation d'œdème interstitiel.

Malheureusement, cette méthode expose à un certain nombre d'inconvénients au nombre desquels, le froid, tient une place importante. En effet, il va engendrer une vasoconstriction favorisant, et l'œdème et

l'hypoxie. De plus, même si cette dernière est ralentie, elle n'est pas totalement stoppée, le greffon continuera malgré tout de se détériorer.

La méthode *Static* a donc pour but de limiter le nombre de lésions causées par l'ischémie et les effets néfastes de la réfrigération.

Malgré tout, aujourd'hui encore, elle demeure la méthode la plus utilisée, qui est, de plus, peu coûteuse, facile à mettre en place et permettant un transport facile du greffon.

- ❖ Méthode *Pulsatile* : elle repose sur l'utilisation de machines à perfusion d'organes. En effet, en 2006, l'Agence de Biomédecine, a autorisé le prélèvement d'organes sur des personnes en arrêt cardiaque. Ces organes doivent obligatoirement passer sur cette machine pour être « reconditionner » afin de voir s'ils pourraient être transplantés. On recrée donc ici, une circulation extracorporelle qui fournit à ceux-ci des nutriments, plus ou moins de l'oxygène tandis que les déchets toxiques et les radicaux libres, sont éliminés en même temps. Cette méthode est, bien évidemment, plus onéreuse que la précédente, plus difficile à mettre en place et oblige que le receveur soit présent à l'hôpital (25) (44).

Un autre problème commun aux solutions de préservation d'organe est l'absence de transporteur d'oxygène. L'hémoglobine d'Arénicole pourrait augmenter la durée de conservation et diminuer davantage les effets délétères des radicaux libres, de la vasoconstriction et donc de l'hypoxie.

Avant l'utilisation de l'*AmHb* pour prolonger la durée de vie des greffons, la solution de préservation de référence, très utilisée en France, était et reste la solution *UW*<sup>®</sup> (Université du Wisconsin où elle a été conçue), également connue, en France, sous le nom générique de *Viaspan*<sup>®</sup>. Cette solution a été mise au point en 1988. Elle est composée de potassium, phosphate, lactobionate, d'un colloïde l'hydroxyéthylamidon (HEA), d'un antioxydant, le glutathion, et d'un précurseur de l'ATP, l'adénosine (44) (Tableau N°VIII).

Tableau N°VIII : Résumé des différents rôles des composants de la solution *UW*<sup>®</sup>

<b>Composition</b>	<b>Nature</b>	<b>Rôle</b>
<b>Potassium</b>	Electrolyte	Stabilise les concentrations intra et extracellulaire en potassium.
<b>Phosphate</b>	Agent tampon	Maintient un pH intracellulaire physiologique
<b>Lactobionate</b>	Sucre	Agent de pression oncotique : prévient la formation d'œdèmes interstitiels
<b>HEA</b>	Colloïde	Agent de pression oncotique : prévient la formation des œdèmes interstitiels
<b>Glutathion</b>	Antioxydant	S'oppose aux espèces réactives de l'oxygène
<b>Adénosine</b>	Nucléoside	Précurseur de l'ATP (source d'énergie). Permet de maintenir une activité enzymatique ATP-dépendant minimale.

*c) L'application HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup>*

*(1) Les essais pré-cliniques*

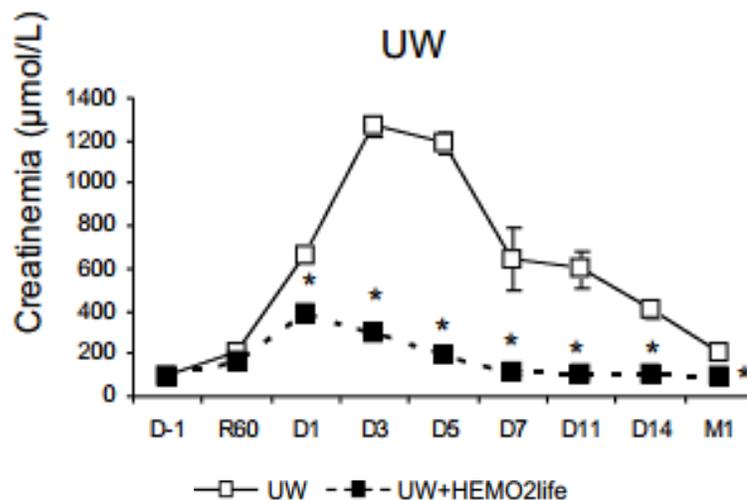
Le transporteur d'oxygène thérapeutique issu de l'*AmHb* a été appelé par la société HEMARINA : le M101. Le nom commercial sous lequel celui-ci a été lancé afin d'être ajouté aux solutions de préservation des greffons est le HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> (41).

L'étude pré-clinique du HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> a été réalisée sur des modèles porcins car le porc est l'animal dont le métabolisme se rapproche le plus de l'Homme. Pour cela, les chercheurs ont prélevé un des reins des porcs témoins. Les reins sont alors conservés 24 heures à 4°C dans la solution *UW*<sup>®</sup> de référence. Ensuite, une auto-transplantation de ce groupe témoin est faite. De la même manière, le même schéma est réalisé pour le groupe test mais cette fois-ci, les reins sont conservés dans un mélange constitué de la solution *UW*<sup>®</sup> et de HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> à la dose de 1 gramme par litre de solution de préservation. Un dispositif de transfert a permis de transférer ce dernier dans la poche de

solution de préservation de façon à, assurer un écoulement aseptique et sécurisé (photo N°2 en annexe).

Les résultats obtenus (Graphique 4) montrent que les greffons mis dans la solution UW<sup>®</sup> de référence mettent un mois avant de retrouver une fonction rénale normale, avec un pic du taux de créatinémie trois jours après la transplantation.

En revanche, les résultats obtenus pour les reins conservés dans le mélange UW<sup>®</sup> et l'hémoglobine d'Arénicole (HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup>), montre que la fonction rénale des greffons est reprise de façon quasi immédiate. En effet, dès la première heure suivant la transplantation, il y a émission d'urine par le greffon traduisant la reprise de la diurèse (25) (43).



Graphique 4 : Evolution de la créatinémie ( $\mu\text{mol/L}$ ) chez des porcs transplantés après conservation du greffon dans la solution UW<sup>®</sup> ou UW<sup>®</sup> avec AmHb (43)

\* = différence significative

Le suivi de la créatinine sanguine qui correspond à un déchet métabolique issu de la destruction normale des cellules musculaires est dépendante de la qualité de la fonction rénale, puisqu'elle est normalement éliminée par les reins. Si cette fonction est altérée, la créatinémie augmente. Le suivi régulier de celle-ci est un bon marqueur de la fonction rénale.

Les reins conservés seulement dans la solution *UW*<sup>®</sup> retrouvent difficilement leur fonction. Au troisième jour (D3) suivant la transplantation le taux de créatinémie atteint un pic de 1300  $\mu\text{mol/L}$  puis décroît lentement, jusqu'à atteindre des valeurs presque normales (les valeurs de la créatinémie restent au-dessus des normes : 200  $\mu\text{mol/L}$  alors que la normale se situe en dessous de 150  $\mu\text{mol/L}$  aussi bien chez l'Homme que chez le porc) (45). Tandis que pour les reins placés dans le mélange *UW*<sup>®</sup> / *AmHb*, les valeurs de créatinémie sont moins élevées. Ainsi, le taux maximum est atteint le lendemain de la transplantation (400  $\mu\text{mol/L}$ ) puis décroît rapidement pour se stabiliser autour de 150  $\mu\text{mol/L}$  dès le septième jour (D7) (Graphique 4), témoignant ainsi d'une reprise rapide de la fonction rénale, en à peine une semaine, contrairement aux groupes témoins.

Cette récupération rapide de cette fonction permet d'éviter les différentes conséquences résultants d'une reprise tardive chez un patient transplanté qui sont (46) :

- ❖ A court terme :
  - La mise sous hémodialyse du patient jusqu'à récupération de la fonction rénale.
  - L'augmentation du risque de complications infectieuses dans les trois mois suivant la transplantation.
- ❖ Au long terme : le risque de redévelopper une insuffisance rénale précoce obligeant l'éventuel recours à une nouvelle greffe.

Sur ces mêmes porcs, après trois mois de suivi, une biopsie est réalisée afin d'évaluer l'aspect histologique, donc fonctionnel des greffons. En effet, nous avons vu précédemment (page 49 – 52) que l'hypoxie des greffons avec les réactions cellulaires qui en résultent, étaient le problème majeur rencontré à l'origine de 50% de greffons inutilisables.

En ce qui concerne la fonction rénale, si les détériorations cellulaires et tissulaires du greffon sont trop importantes, la greffe peut ne pas aboutir, et la reprise des fonctions physiologiques peut être retardée et plus difficile.

Lorsque celle-ci est perturbée, nous observons un taux sanguin de créatinémie élevé. Une créatinémie élevée se traduit, au niveau rénal par un faible débit de filtration

glomérulaire (le DFG représente le volume de liquide filtré par le rein par unité de temps), témoignant d'une insuffisance rénale aiguë majeure.

La chute du DFG entraîne alors la production de rénine par le rein qui stimule le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) dont les conséquences pour le patient, peuvent engager le pronostic vital (schéma N°1 en annexe).

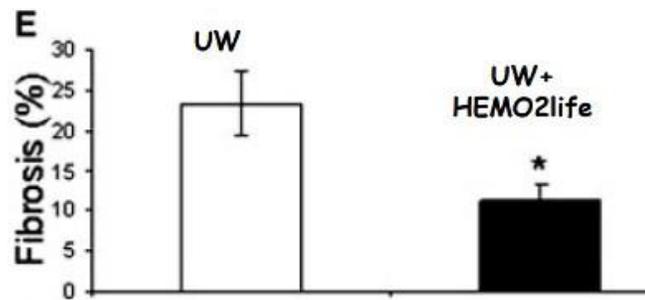
En effet, on observe :

- ❖ Une vasoconstriction de l'artère efférente du rein.
- ❖ Une stimulation de la synthèse des cellules musculaires lisses et de collagène.
- ❖ Une stimulation du système sympathique.
- ❖ Et une augmentation de la production d'aldostérone.

Cet ensemble de phénomènes aboutit à une hypertension artérielle, une insuffisance cardiaque et enfin à une insuffisance rénale (47).

D'un point de vue cellulaire, on assiste à un remodelage tissulaire qui se caractérise par l'augmentation du nombre de cellules musculaires lisses et la synthèse de collagène, responsable d'une fibrose rénale. Celle-ci favorise l'apparition d'une hyperpression glomérulaire contribuant à la destruction des capillaires rénaux par oblitération. Le rein se détériore petit à petit, avec un DFG qui va progressivement diminuer, ce qui entretient donc le système SRAA (47) (48).

Dans la présente étude, le taux de fibrose rénale a été évalué chez les porcs auto-transplantés appartenant aux deux groupes (Graphique 5).



Graphique 5 : Taux de fibroses rénales chez les porcs auto-transplantés par la solution UW<sup>®</sup> ou par la solution UW<sup>®</sup> + HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> (49)

\* = différence significative

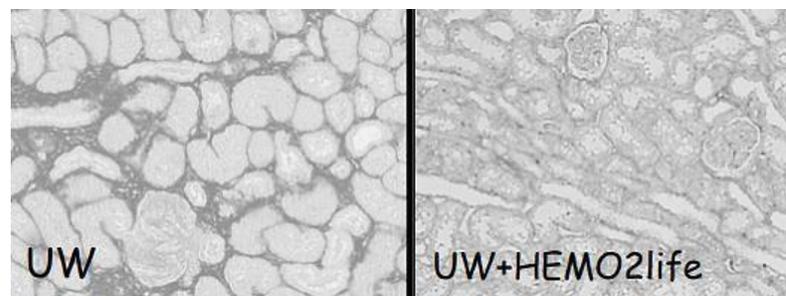


Figure 13 : Coupe histologique de néphrons de porcs (49)

Ainsi, les reins conservés dans la solution UW<sup>®</sup> sont à 25% fibrosés alors qu'ils ne le sont qu'à 10% pour ceux placés dans le mélange UW<sup>®</sup> / HEMO<sub>2</sub>Life. D'un point de vue histologique (Figure 13), l'architecture normale de l'épithélium du néphron provenant de reins conservés dans le milieu UW<sup>®</sup>, a été fortement transformée par la présence d'un tissu conjonctif fibreux néoformée, avec disparition quasi-totale des noyaux des cellules tubulaires. En revanche, l'architecture tissulaire des néphrons conservés dans la solution UW<sup>®</sup> / HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> est largement conservée (Figure 13) (25) (50).

Ainsi, l'ajout de l'hémoglobine d'Arénicole dans les solutions de préservation d'organes classiques permet de diminuer les phénomènes de fibroses et de nécroses liés à l'hypoxie des greffons. HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> permet donc d'apporter de l'oxygène de manière continue et contrôlée, évitant ainsi, le stress oxydatif, la vasoconstriction et l'hypoxie qui sont dommageables pour les greffons.

Une autre étude, suivant le même protocole a été réalisée en utilisant, cette fois-ci une solution de préservation de troisième génération pauvre en potassium (solution *HTK*<sup>®</sup>). Les résultats obtenus (Graphique N°1, 2 et 3 en annexe) sont tout à fait superposables à ceux vus plus haut (40) (43).

## (2) Les essais cliniques

À la suite de ces essais pré-cliniques, le dossier HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> a été déposé à l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des produits de santé) en 2015 afin de pouvoir commencer les essais cliniques sur l'Homme. A noter, qu'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> n'est pas en cours de développement pour obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) mais pour un marquage CE (Conformité Européenne). En effet, le produit est développé en tant que dispositif médical est non médicament car selon l'article R.665-3 du Code de la Santé Publique « *on entend par dispositif médical tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels intervenant dans son fonctionnement, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens* » (51). Celui-ci est conçu en tant que classe III, c'est-à-dire avec le niveau de risque le plus élevé.

En Octobre 2015, les autorisations sont obtenues pour commencer les essais sur l'Homme qui débutent rapidement au début de l'année suivante sous le nom OxyOp pour « *evaluation of a marine OXYgen carrier, HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup>, for hypOthermic kidney graft Preservation before transplantation* ». Comme son nom l'indique, le but de l'étude est d'évaluer l'innocuité et la sécurité d'utilisation du transporteur d'oxygène issu du ver marin *Arenicola marina* (HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup>) en tant qu'additif aux solutions de conservation habituellement employées pour les reins avant leur transplantation (41).

Cette étude multicentrique, première du genre à utiliser un transporteur d'oxygène d'origine marine chez l'Homme, inclut soixante patients répartis dans six centres de transplantation de référence en France (Brest, Paris, Tours, Poitiers, Lyon, Limoges). Pour information, OxyOp a pu voir le jour grâce à la participation financière d'une subvention nationale Française, le Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) et grâce aux fonds privés d'HEMARINA (25) (52). Le protocole correspond à celui utilisé chez les porcs, à raison d'1 gramme d'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> pour 1 litre de solution de préservation. HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> est conservé dans chaque centre à -20°C. Dès l'appel pour une greffe, les flacons sont décongelés et mis à température ambiante, pendant environ une heure à une heure et demie. Puis le rein est mis dans la solution de préservation habituelle à laquelle 1 g/L de HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> est ajouté, jusqu'au moment de la greffe. Juste avant la transplantation tous les greffons sont rincés avec la solution de préservation seule (40).

Pour être inclus dans cette étude, les patients doivent être âgés de plus de 18 ans, donner leur consentement éclairé par écrit et surtout être sous dialyse. Les patients sont en insuffisance rénale terminale et sont donc éligibles à une greffe. Les greffons, quant à eux, proviennent d'un donneur adulte dont la mort cérébrale a été constatée. Le greffon doit être placé dans une solution de conservation contenant de l'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> et venir de l'un des six centres de référence afin de permettre des transplantations *intra-muros* (53).

L'analyse de la sécurité d'emploi d'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> se base sur trois lignes directrices et est réalisée à dates fixes pendant les trois mois suivant la transplantation (Figure 14) (40) :

- ❖ Les effets indésirables : tous les évènements survenant lors de l'utilisation d'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> sont notifiés.
  
- ❖ L'intégrité du rein : les complications touchant le rein sont répertoriées, que ce soit une difficulté lors de l'intervention chirurgicale, une récupération lente du greffon, une non reprise de fonction, un rejet, une thrombose ou tout autre complication pouvant affecter le greffon.

- ❖ L'intégrité du receveur : tous les effets indésirables touchant le receveur sont notés, notamment, les signes vitaux et les analyses biologiques seront recueillis à J0 ; J1 ; J2 ; J3 ; J4 ; J5 ; J6 ; J7 ; J11 ; J14 ; M1 ; M2 ; M3.

Les six centres de références ont également des objectifs secondaires à remplir dont (Figure 14) :

- ❖ Comparer l'efficacité avec une population contrôle à 3 et 12 mois : les résultats sont comparés avec des patients témoins transplantés au même moment au sein de ces centres. Les groupes de comparaison sont formés en fonction de l'âge, du sexe et du temps d'ischémie froide (temps écoulé entre le prélèvement et la greffe) (44).
- ❖ Analyser les coupes histologiques après biopsie pré-implantatoire (à J7 et J14) et après 1 et 3 mois (M1 et M3) : permet de quantifier la fibrose interstitielle.
- ❖ Relever lors de la conservation des organes, les biomarqueurs urinaires et sanguins afin de les mettre en corrélation avec d'éventuelles lésions du greffon.

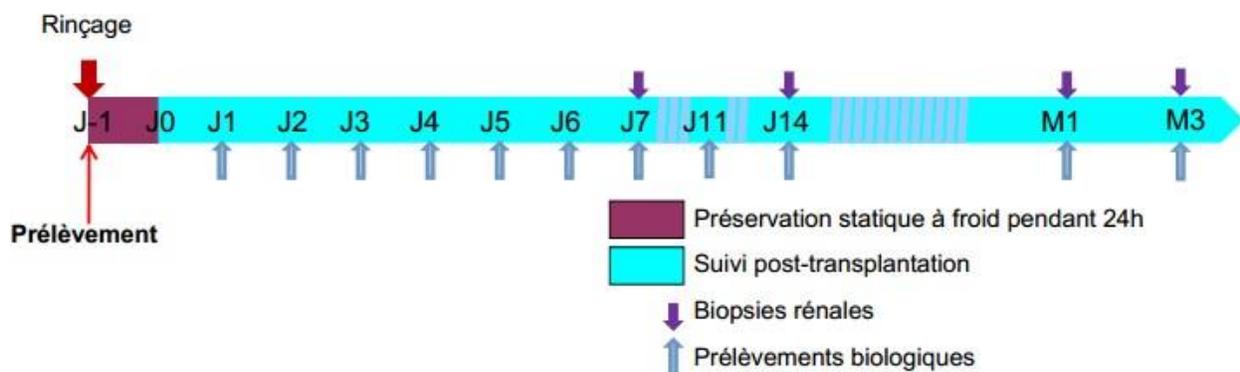


Figure 14 : Flèche chronologique du suivi post-transplantation des patients (40)

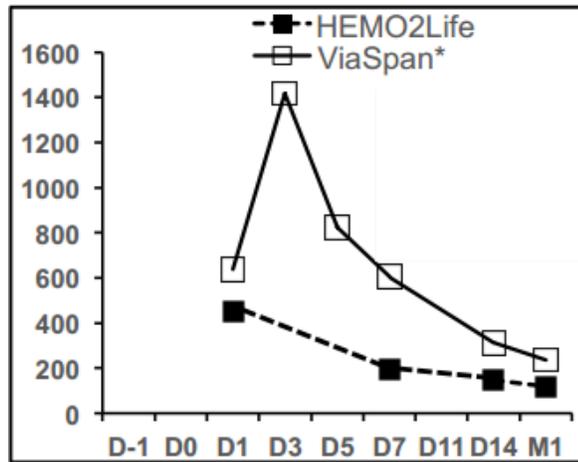
Créatinémie, DFG, ainsi que coupes anatomo-pathologiques, furent les trois principaux critères paracliniques utilisés dans cette étude pour évaluer la « santé » du greffon et son degré de récupération.

Bien que la créatinémie soit élevée à J1 (400  $\mu\text{mol/L}$ ) pour les reins conservés dans la solution de conservation mélangée avec de l'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup>, celle-ci diminue régulièrement sur une semaine pour atteindre des valeurs quasi normale (200  $\mu\text{mol/L}$ ) (Graphique 6). Et dès le quatorzième jour, celle-ci se normalise (< 150  $\mu\text{mol/L}$ ). Ces résultats sont assez superposables à ceux vus précédemment dans le modèle animal (Graphique 4).

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus chez des patients transplantés avec des greffons conservés seulement dans la solution UW<sup>®</sup> (Graphique 6). Là encore, nous retrouvons des résultats similaires à ceux obtenus chez les porcs.

Ainsi, après la transplantation, la créatinémie augmente brusquement jusqu'au quatrième jour pour y atteindre son maximum à 1400  $\mu\text{mol/L}$ . Ensuite, elle diminue lentement mais en restant toujours au-dessus des valeurs normales même après un mois (> 200  $\mu\text{mol/L}$ ).

Ces résultats témoignent des qualités de protection des greffons de la solution de conservation contenant de l'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup>. Elle permet, de plus, de prédire une bonne reprise de la fonction rénale et surtout d'un meilleur pronostic à long terme pour le patient.



Etude OXYOP (données préliminaires, \*comparaison avec données historiques ViaSpan)

Graphique 6 : Evolution de la créatinémie ( $\mu\text{mol/L}$ ) de greffons conservés dans HEMO<sub>2</sub>Life® comparé avec les données historiques du Viaspan®  
Les résultats de M2 et M3 sont identiques à M1 (43)

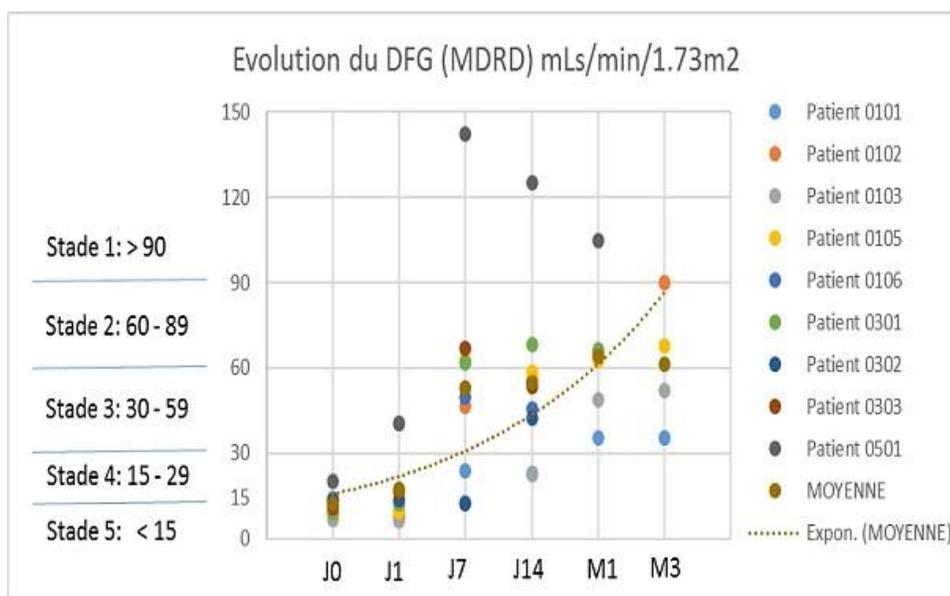
A partir des mesures de la créatinémie, le DFG (Tableau N°IX) a pu être calculé et analysé sur les trois premiers mois (Graphique 7).

Tableau N°IX : Rappel des différents stades de l'insuffisance rénale en fonction du DFG (54)

Stade	DFG (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	Définition
1	≥ 90	Fonction normale du rein
2	60 – 89	Insuffisance rénale légère
3	30 – 59	Insuffisance rénale modérée
4	15 – 29	Insuffisance rénale sévère
5	< 15	Insuffisance rénale terminale

Le Graphique 7 est très explicite sur la reprise de la fonction rénale. En à peine quatorze jours, la reprise du débit de filtration glomérulaire avec HEMO<sub>2</sub>Life® s'améliore

d'au moins deux stades fonctionnels, le rein passe d'un stade d'insuffisance rénale terminale à celui d'insuffisance rénale modérée (à J0 : DFG < 15 ml/min/1.73m<sup>2</sup> vs J14 : DFG ≈ 45 ml/min/1.73m<sup>2</sup>). La normalisation du DFG est en lien direct avec des créatinémies basses (Cf Graphique 6). En outre, le DFG est le critère le plus prédictif de la survie au long terme du greffon (55). Ces premières constatations renforcent les conclusions établies lors des essais pré-cliniques : HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> augmente donc la qualité de conservation des greffons impliquant par la suite, la réussite de la transplantation, la reprise rapide de la fonction rénale ainsi que la survie au long terme du greffon et par voie de conséquence, une augmentation des chances, pour le patient, de garder un greffon de bonne qualité (43).



Graphique 7 : Evolution du DFG (mL/min/1.73m<sup>2</sup>) après la transplantation des greffons conservés dans HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> (43)

Le 14 Novembre 2017, un communiqué de presse annonce les premiers résultats positifs de l'essai clinique d'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup>. L'utilisation d'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> en tant qu'additif aux solutions de conservation des greffons a démontré une totale sécurité d'emploi sur trois mois se traduisant par (56) :

- ❖ Aucune perte de greffon liée au produit.

- ❖ Aucun décès à 3 mois.
- ❖ Aucun événement indésirable majeur lié à HEMO<sub>2</sub>Life®.
- ❖ Aucun effet immunologique, allergique ou pro-thrombotique.

Enfin, le 6 Juin 2018, après un an de suivi des patients ayant reçu un greffon conservé avec HEMO<sub>2</sub>Life®, le CHRU de Brest et HEMARINA confirment l'innovation médicale et présentent leurs derniers résultats (41) :

- ❖ Seuls 7% (6.98%) des patients ayant reçu un rein conservé avec HEMO<sub>2</sub>Life® ont présenté un retard dans la reprise de fonction de leur greffon (mesuré par le DFG) contre 26% (26.19%) dans le groupe témoin.
- ❖ Le taux sanguin de créatinémie se normalise après 7 jours pour les patients ayant reçu un rein conservé avec HEMO<sub>2</sub>Life® contre environ 13 jours pour les patients témoins.
- ❖ Et ce, sans perte de greffon liée au produit, sans apparition d'événement indésirable majeur lié à HEMO<sub>2</sub>Life® et sans effet immunologique, allergique ou pro-thrombotique.

A la suite des résultats de l'étude, un dossier a été déposé pour HEMO<sub>2</sub>Life® pour l'obtention du marquage CE (Conformité Européenne) avant sa commercialisation prévue en 2019.

Il faut ajouter en parallèle à l'étude OxyOp des essais sur des animaux pour des transplantations hépatiques, cardiaques et pulmonaires. Pour exemple, des chirurgiens de Toronto ont réussi à maintenir fonctionnels pendant 48 heures les poumons de porcs hors de leur donneur avec la solution d'HEMO<sub>2</sub>Life®. Ceci représente une prouesse, compte tenu d'un taux de survie de 6 heures pour cet organe lorsque retiré de sa circulation. Malgré ce long délai, les fonctions pulmonaires post-transplantation ont été excellentes. Le produit a donc été validé sur d'autres organes lors d'essais précliniques pour des greffes de cœur, poumon et foie où les mêmes conclusions ont été dressées (2) (42).

Enfin, récemment, avant même sa commercialisation, l'HEMO<sub>2</sub>Life®, a été utilisé lors d'une seconde greffe totale de la face en Janvier 2018 par le Professeur Lantieri chez

un patient (Jérôme H.) atteint de la maladie de Recklinghausen (neurofibromatose d'origine génétique très polymorphe). Ce chef de service de chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique de l'hôpital Européen Georges Pompidou a déclaré en Octobre 2018 : « HEMO<sub>2</sub>Life® est une innovation, une révolution médicale et le futur de la transplantation. Je ne ferai plus jamais de transplantation sans ce produit. » (41).

Ce patient, présentait des tumeurs cutanées localisées au niveau de la totalité du visage, entraînant une déformation de celui-ci (57). En 2010, une première greffe totale de la face a été décidée. Le fait de réaliser une greffe assure au patient un non-retour des tumeurs des neurofibromes car le greffon mis en place n'est pas atteint par la pathologie et donc ne contient pas les anomalies génétiques.

Une greffe de peau représente une opération chirurgicale très complexe. Ainsi, depuis 2005, date du début des greffes de visage, seule une quarantaine de greffes de la face ont été réalisées dans le monde. Tout d'abord, il faut récupérer le visage d'un receveur pour n'obtenir qu'un seul morceau de tissu. Puis, vient la transplantation nécessitant une mise en continuité du greffon sur la zone receveuse. Les principaux points de fixation sont :

- ❖ Région frontale.
- ❖ Région orbitaire.
- ❖ Région nasale.
- ❖ Région buccale.
- ❖ Région massétérine (zone latérale de la joue).

Enfin, vient la réalisation de l'anastomose vasculaire et nerveuse (58). Après la transplantation, différentes complications peuvent survenir tels que (58) :

- ❖ Thrombose vasculaire : qui entraîne une ischémie partielle du greffon évoluant vers la nécrose du tissu avec un risque de perte du greffon.
- ❖ Difficulté de la récupération motrice : présentant un risque d'échec pour la réalisation des mimiques du visage, ainsi qu'une diminution de la mobilité buccale et palpébrale.
- ❖ Difficulté à la récupération sensitive.

- ❖ Rejet du greffon : le risque de rejet est bien plus important que pour les autres organes car la face est un tissu composite comportant plusieurs éléments (peau, tissus sous cutanés, artères, nerfs, muscles ...).
- ❖ L'aspect psychologique : nouvelle identité avec un nouveau visage qui n'est plus celui du receveur.

Malheureusement, six ans après cette greffe, le patient a présenté des signes de rejet, obligeant l'équipe chirurgicale à retirer le greffon fin 2017. Pendant trois mois, le patient vécut sans visage. A 43 ans, il est le premier patient au Monde à avoir subi une seconde transplantation de la face (photo N°3 en annexe). Pour avoir suivi de loin l'avancée des essais d'HEMO<sub>2</sub>Life® sur la conservation des organes, le Professeur Lantieri, convaincu par cette nouvelle innovation, demande à avoir recours à ce dispositif dans le but de conserver les tissus du donneur dans de meilleures conditions. Cette nouvelle greffe a été une « révolution » sur deux points de vue (59) :

- ❖ Dans le domaine des greffes vascularisées composites (main et face) : une re-transplantation est possible même après un rejet.
- ❖ L'utilisation d'HEMO<sub>2</sub>Life® a permis de conserver en parfait état les tissus du donneur et devrait apporter des bénéfices post-transplantation comme vu avec les greffes de reins.

Ce dernier exemple sur l'emploi de ce produit confirme toutes ses qualités.

D'un emploi plus simple pour l'équipe chirurgicale, ce produit permet d'apporter du temps supplémentaire précieux dans la préparation de la transplantation tout en gardant une intégrité et une qualité du greffon intactes. Selon Franck Zal, ce produit devrait devenir la référence dans la préservation des greffons. Pour conclure, d'après les mots du fondateur d'HEMARINA « *Nous apportons à la médecine des produits innovants qui permettent de sauver des vies là où aucune solution n'existe* » (41).

Cette première application de l'hémoglobine d'Arénicole a montré grâce à ses propriétés oxygénantes des qualités de souplesse d'emploi et de conservation des greffons exceptionnelles.

La préservation des organes à greffer ne représente pas la seule situation dans laquelle un besoin d'oxygène se fait sentir. Ainsi, notamment dans les processus de cicatrisation des plaies, la qualité d'oxygénation des tissus est essentielle.

## 2. Application dans les plaies chroniques : HEMHealing®

Une plaie chronique est définie par la Haute Autorité de Santé (HAS) comme étant une plaie dont le délai de cicatrisation est allongé et dure depuis plus de 4 à 6 semaines.

Les causes majeures incluent (60) :

- ❖ Les ulcères de jambes.
- ❖ Les escarres.
- ❖ Le syndrome du pied diabétique.
- ❖ Les moignons d'amputation.

La prise en charge de ces plaies repose essentiellement sur l'utilisation de pansements destinés à favoriser la cicatrisation en milieu humide tout en évitant les phénomènes de macération. En fonction de l'état et du stade de cicatrisation de la plaie, on adaptera un type spécifique de pansement (Tableau N°X) (61) :

- ❖ Hydrogel : afin d'hydrater et d'absorber les débris nécrotiques et/ou fibreux.
- ❖ Hydrocolloïde : qui forme un gel au contact des sécrétions, maintenant ainsi un milieu humide et protégeant les tissus néoformés.
- ❖ Hydrocellulaire : qui absorbe les exsudats et protège la plaie grâce à un effet coussin anti-pression.
- ❖ Alginate de calcium : qui possède un effet hémostatique et qui draine ainsi, les plaies.

- ❖ Hydrofibre : pansement sous forme de mèche qui forme un gel au contact des sécrétions.
- ❖ Tulle gras : utilisé pour les plaies suintantes, va drainer les sécrétions.

Tableau N°X : Résumé des pansements (61)

<b>Stade</b> <b>Pansement</b>	<b>Nécrose</b>	<b>Fibrine</b>	<b>Bourgeonnement</b>	<b>Epidermisation</b>	<b>Exsudat</b>
<b>Hydrogel</b>	☒	☒			0
<b>Hydrocolloïde</b>	☒	☒	☒	☒	+
<b>Hydrocellulaire</b>			☒	☒	+ à ++
<b>Alginate de calcium</b>	☒	☒	☒		Sang +++
<b>Hydrofibre</b>		☒	☒	☒	++++
<b>Tulle gras</b>					0 à +

Actuellement, on compte en France près de deux millions de personnes atteintes de plaies chroniques (62). Ces plaies altèrent la qualité de vie des patients en entraînant des douleurs et une baisse de la mobilité (62). Un des risques majeurs essentiellement retrouvé dans le syndrome du pied diabétique est l'amputation. On comptabilise dans le monde une amputation toutes les trente secondes d'ue à ce syndrome (42). L'explication de telles plaies serait liée à :

- Soit une mauvaise vascularisation des tissus entraînant une mauvaise oxygénation.
- Soit une trop grande demande en oxygène due à la néoformation et au remodelage tissulaires.

Ceci aboutit à un retard de la cicatrisation avec un risque accru d'infections. En dehors des pansements précités, il existe très peu de traitement à l'heure actuelle. Nous

pouvons citer en cas de complications d'infections, une mise en place d'une antibiothérapie probabiliste. Celle-ci doit être efficace sur les *Staphylococcus* et *Streptococcus* ou parfois sur les Gram -, voir les germes anaérobies. Pour cela, l'utilisation de la pristinamycine à 3 grammes par jour ou l'association d'amoxicilline / acide clavulanique à 3 grammes par jour sont recommandée (63). Une autre alternative, née au CHU de Limoges, est l'apithérapie. Cette technique, encore trop méconnue en France, consiste en l'application directe de miel de thym sur les plaies, le pouvoir cicatrisant et antiseptique de ce dernier, ont même une efficacité supérieure aux traitements conventionnels (64). Certains centres hospitaliers utilisent le traitement par pression négative (TPN), pour soigner les plaies à haut risque de complication ou ne cicatrisant pas en première intention (65). Ce processus, connu sous le nom commercial VAC<sup>®</sup> (*Vacuum Assisted Closure* pour fermeture assistée sous vide), consiste à appliquer une pression négative sur une plaie complètement fermée au moyen d'une interface (photo N°4 en annexe). Un effet d'aspiration se crée permettant d'extraire l'exsudat et d'augmenter l'afflux sanguin qui, indirectement, amène plus d'oxygène sur la zone concernée (66). La mise au point du pansement HEMHealing<sup>®</sup> s'est inspirée du différentiel de pression apporté par le TPN mais sans création de vide. La quantité d'oxygène se trouve directement au contact de la lésion.

Pour cela, des molécules d'hémoglobine d'*Arenicola marina* sont placées sur une matrice d'hydrogel et du fait de l'existence d'un gradient d'oxygène entre la plaie et le pansement, celui-ci libère le précieux gaz directement sur la zone ciblée pauvre en O<sub>2</sub> (Figure 15).

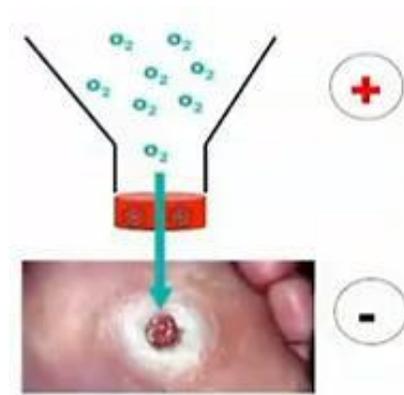


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'action du pansement HEMHealing® (42)

Ainsi, de cette façon, l'apport d'oxygène directement sur la plaie diminue de manière significative le temps de cicatrisation.

Des études sont actuellement en cours en partenariat avec l'un des leaders de pansements du marché Français (nom non dévoilé). Les tests sont réalisés à la fois *in vitro* et *in vivo* et les premiers résultats ont montré une réelle augmentation de la vitesse de cicatrisation de l'ordre de trois à quatre semaines en moins comparé aux pansements standards (2) (42).

HEMHealing® devrait prochainement être disponible sur le marché, d'ici début 2019, en tant que dispositif médical de classe III. Ce nouveau dispositif sera une innovation importante puisque du point de vue de la santé publique, il devrait diminuer le nombre d'amputations mais également le coût des soins et permettre à l'Assurance Maladie de faire des économies substantielles.

Ainsi, en 2017, en considérant seulement la prise en charge des pansements, le montant du remboursement annuelle par l'Assurance Maladie s'élevait à 365 millions d'euros (67). En France, plus de 350 000 plaies chroniques par an sont en attente d'un traitement réellement efficace. Pour celles-ci, ce pansement aurait toute son utilité (68).

### 3. Application : HEMOXYCarrier®

Durant les toutes premières conférences concernant les propriétés d'*Arenicola marina*, le docteur Franck Zal, par les résultats de ses recherches, a commencé à intéresser un certain nombre de partenaires potentiels. Ce fut, notamment, lors d'un congrès en Italie en 2016, suite à l'une de ses présentations, qu'il a attiré l'attention du gouvernement Américain et en à peine quelques mois, un partenariat a été signé entre l'US Navy et sa société HEMARINA (42).

Leur demande est extrêmement ciblée. En effet, depuis quelques années nous assistons, malheureusement, à une recrudescence des attentats (à titre d'exemple : *World Trade Center* 11 Septembre 2001 ; Charlie Hebdo 7 Janvier 2015 ; Bataclan 13 Novembre 2015 ; Manchester 22 Mai 2017 ; dernièrement Strasbourg 11 Décembre 2018 et dans bien d'autres lieux aussi de par le Monde).

De plus, un des plus gros problèmes rencontré par les militaires sur un champ de bataille n'est pas tant les hémorragies dues aux balles que les séquelles dues aux souffles produits par les explosions de toutes origines. En effet, celles-ci créent ce que l'on appelle un effet de « blast », qui correspond directement au souffle issu d'une onde de choc produite par la déflagration.

L'explosion, qui est la transformation quasi-instantanée d'un solide ou liquide en gaz, va créer un pic de pression (l'onde de choc) générant le souffle c'est-à-dire la mise en mouvement du gaz généré progressant de manière centrifuge (Figure 16) (69).

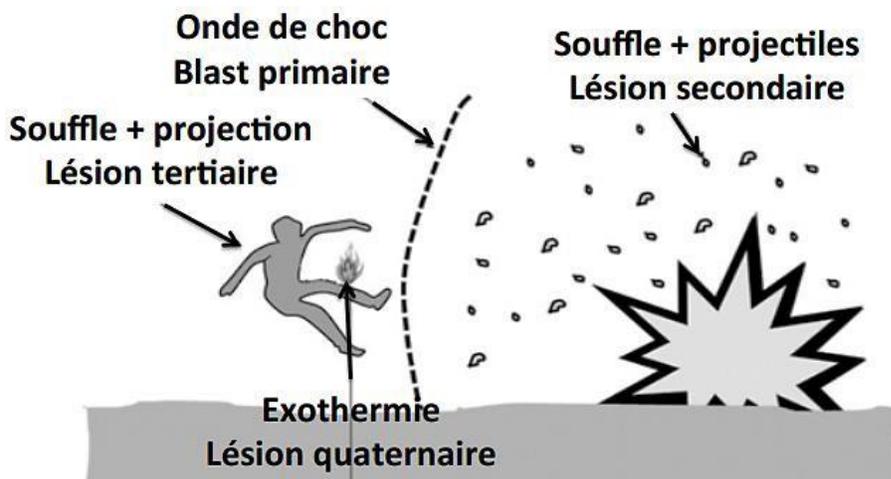


Figure 16 : Conséquences d'une explosion sur le corps humain (69)

Cet effet « blast » (souffle) peut avoir des conséquences dramatiques chez la victime car il se répand aussi bien au niveau externe qu'interne dans l'organisme, entraînant des dommages qui vont de la simple lésion aux hémorragies internes. Parmi ces dernières, les plus fréquemment notifiées par l'US Navy touchent la boîte crânienne en étant responsables d'accidents vasculaires cérébraux (AVC).

Le développement d'un produit à fort pouvoir d'oxygénation tissulaire en remplacement des hématies, facilement transportable, d'utilisation universelle et pouvant s'utiliser rapidement (« *on the spot* ») sur un champ de bataille permettrait de parer aux séquelles dues aux déflagrations, tout en permettant un rapatriement « aisé » des militaires blessés vers l'arrière du front (2).

Un certain nombre d'essais et d'études préliminaires ont été lancés par HEMARINA sous contrat de l'US Navy.

Tout d'abord, la demi-vie de HEMOXYCarrier® a été évalué en injectant 200 mg/kg d'AmHb marqué au fluorochrome à des souris (Figure 17) (43).

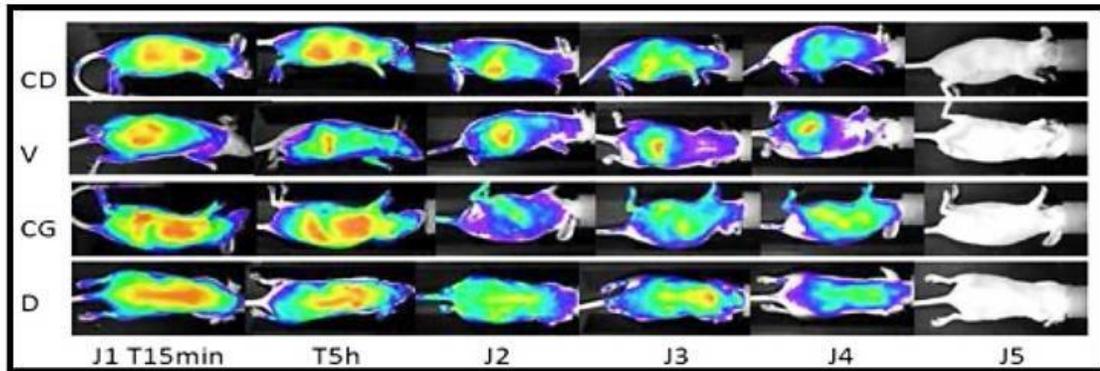


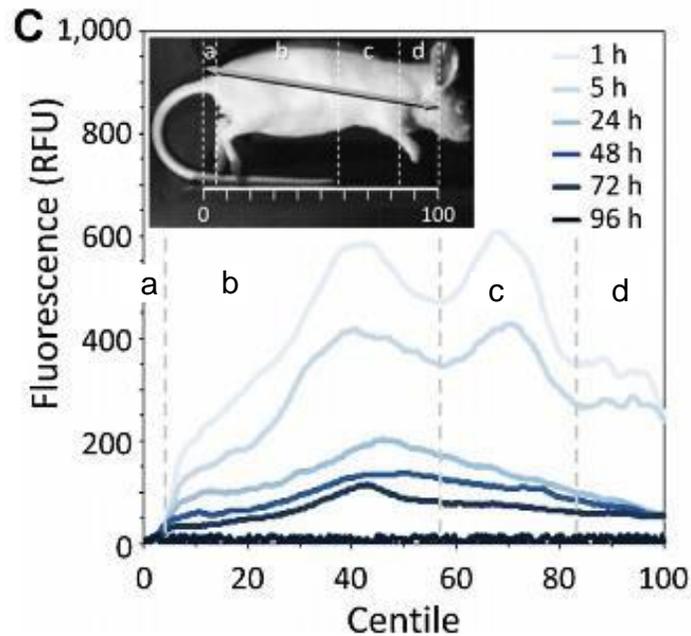
Figure 17 : Evaluation de la biodistribution de l'AmHb marqué au fluorochrome (43)

CD : côté droit – V : ventrale – CG : côté gauche – D : dorsale



Dès la quinzième minute suivant l'injection d'HEMOXYCarrier<sup>®</sup>, tout le produit se retrouve réparti homogènement dans l'ensemble de l'organisme des animaux testés. Même cinq heures après l'injection, on retrouve encore des traces du produit au niveau cérébral. La rémanence du produit est bonne, puisque la demi-vie d'HEMOXYCarrier<sup>®</sup>, permet de retrouver le produit injecté à la souris deux jours et demi après l'injection et ce dernier disparaît complètement de l'organisme au bout de cinq jours.

Pour avoir un aperçu de la répartition et de la rémanence du produit au sein de l'organisme des souris, l'intensité de la fluorescence ainsi que sa présence dans le corps de l'animal au cours du temps ont été étudiées (Graphique 8).



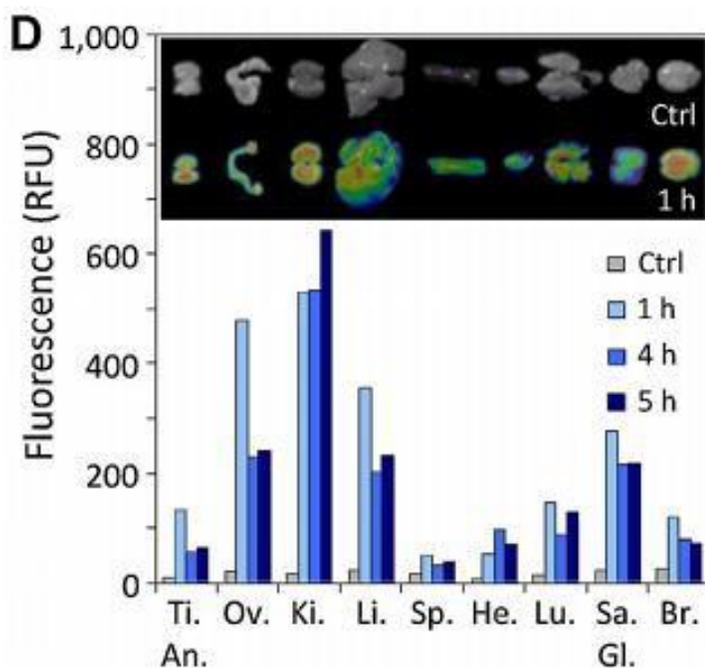
Graphique 8 : Profils de fluorescence (en unités de fluorescence relatives RFU) d'HEMOXYCarrier® le long du corps des souris à différents temps (70)  
 (a) zone postérieure (b) zone abdominale (c) zone thoracique (d) tête

Les différentes courbes montrent à différents temps le niveau de fluorescence dans une des quatre parties du corps de la souris. Nous observons que le taux de fluorescence, témoin de la présence du transporteur d'oxygène, est maximal une heure après l'injection et qu'il se présente principalement au niveau de l'abdomen et du thorax ( $\approx 600$  RFU). A partir du deuxième jour, nous assistons à une forte diminution dans l'ensemble du corps de l'animal du taux de fluorescence avec un signal au niveau de l'abdomen qui reste encore assez élevé ( $\approx 200$  RFU). Étonnamment, il faut noter l'absence totale de distribution au niveau de la partie postérieure caudale, le niveau de fluorescence restant à zéro. Ainsi, suite à ces résultats, la distribution dans l'ensemble du corps d'HEMOXYCarrier®, marqué au fluorochrome, a permis de distinguer trois zones

principales de diffusion du produit, à savoir : l'abdomen, le thorax et la tête (70).

Pour affiner nos résultats, certains organes ont été prélevés au cours du temps et les taux de fluorescence ont été quantifiés. Cette distribution a été comparée aux mêmes

organes de souris témoins, également traitées par le produit non marqué afin d'assurer la recevabilité de l'étude (Graphique 9).



Graphique 9 : Quantification d'HEMOXYCarrier® au cours du temps dans les organes suivants : muscle tibial antérieur (Ti. An.) ; les ovaires (Ov.) ; les reins (Ki.) ; le foie (Li.) ; la rate (Sp.) ; le cœur (He.) ; les poumons (Lu.) ; les glandes salivaires (Sa. Gl.) ; le cerveau (Br.) (70)

La quantification d'HEMOXYCarrier® marqué dans les organes isolés permet de mettre en évidence une distribution hétérogène du produit au sein de ceux-ci. Ainsi, les reins sont-ils les plus marqués, viennent ensuite les ovaires, le foie, les glandes salivaires, le cerveau, les poumons, le cœur, le muscle tibiale antérieur et enfin la rate.

Comme attendu, les taux de fluorescence diminuent dans chaque organe au fur et à mesure des heures suivant l'injection (pour les ovaires  $\approx 500$  RFU à 1h puis après 4-5 heures  $\approx 210$  RFU). A noter un effet inverse pour les reins, avec une concentration en produit plus importante cinq heures suivant l'injection ( $\approx 510$  RFU 1h après l'injection contre  $\approx 650$  RFU après 5h). Cette augmentation est très certainement liée à une élimination rénale.

Pour conclure, on notera que le produit diffuse bien dans l'ensemble du corps, avec malgré tout une imprégnation variant d'un organe à l'autre et que sa concentration est maximale dans les premières heures suivant l'injection (70).

Malgré tout, ces premiers essais sur l'HEMOXYCarrier® sont encourageants et montrent l'intérêt de son emploi directement sur les champs de bataille ou sur les lieux touchés par des attentats, puisque son activité d'oxygénation tissulaire au niveau des viscères, ainsi qu'au niveau cérébral est importante et perdue au moins pendant cinq heures. Cela permet ainsi, de protéger l'organe durant le transfert vers une unité de soin spécialisée.

Il faut vérifier maintenant l'absence d'effets indésirables chez l'Homme de ce produit, car pour le moment, tous les substituts sanguins en cours de développement ont un bénéfice risque plutôt défavorable (71).

Dès les années 60, les premiers substituts sanguins sont recherchés, quelques exemples comme transporteurs d'oxygène (1) (72) :

- ❖ Le perfluorocarbure : cet hydrocarbure perfluoré est un gaz pouvant transporter de l'oxygène. Il a été testé en plongeant des souris dans un liquide contenant ce gaz, ce qui leur a permis de pouvoir continuer de respirer.
- ❖ L'hémoglobine de bovin : les chercheurs ont directement utilisé l'hémoglobine issue du plasma qu'ils ont ensuite modifiée. En 2001, ce substitut a été commercialisé seulement en Afrique du Sud et ce pendant dix ans sous le nom de HEMOPURE®.
- ❖ L'hémoglobine humaine : elle est modifiée par l'ajout en surface d'une molécule de polyéthylène glycol (PEG) par exemple.
- ❖ L'hémoglobine recombinante : elle est obtenue par le biais d'une bactérie, *Escherichia coli*.
- ❖ Produire du sang artificiel : par prélèvement de cellules souches de la moelle osseuse humaine, suivi d'une induction de la différenciation cellulaire pour les orienter vers la lignée érythrocytaire afin d'obtenir des hématies

fonctionnelles. Cette technique permettrait de générer une lignée cellulaire immortelle. Pour le moment, il n'y a pas eu encore d'essai effectué sur des modèles animaux.

Parmi ces produits, certains n'ont pas atteint le stade d'étude clinique, d'autres ont été ou sont commercialisés en dehors de l'Europe mais tous présentent les mêmes effets indésirables à des degrés divers. En effet, le problème majeur de ces substituts sanguins est la vasoconstriction qu'ils induisent, engendrant une hypertension artérielle majeure. Les autres effets les plus importants relevés sont (71) (72) :

- ❖ Une insuffisance rénale.
- ❖ Une réaction allergique.
- ❖ Des troubles gastro-intestinaux algiques.
- ❖ Un ictère dose dépendante, suite à une hémolyse.

Pour démontrer l'innocuité de l'HEMOXYCarrier® des tests ont été pratiqués sur des hamsters chez lesquels ont été injectés différents types d'hémoglobine, afin de mesurer le diamètre de leurs artéioles ainsi que leur écoulement sanguin. Les hémoglobines utilisées pour ces études furent les suivantes :

- ❖  $\alpha\alpha$  Hb : hémoglobine humaine modifiée, avec seulement les deux chaînes alpha reliées entre-elles, afin d'obtenir une hémoglobine de plus petit poids moléculaire.
- ❖ PBH4 : hémoglobine bovine polymérisée qui présente aussi un petit poids moléculaire.
- ❖ PEG-Hb : hémoglobine humaine modifiée par l'ajout d'un groupement polyéthylène glycol, lui conférant ainsi, un haut poids moléculaire.
- ❖ HEMOX : hémoglobine du ver marin *Arenicola marina*, que l'on souhaite tester.

Parmi l'ensemble des hamsters traités par les différentes hémoglobines, le groupe contrôle recevra une injection de sérum physiologique (NaCl 0.9%). Les zones de mesures des micro-vaisseaux ont été prédéfinies en fonction du diamètre et du débit

sanguin de tous les groupes de rongeurs testés. Les mesures seront effectuées trente minutes après les injections au niveau de la veine jugulaire.

Les résultats obtenus avec la solution contrôle sont en accord avec ce que nous attendions. En effet, à la suite d'injections de  $\alpha\alpha$  Hb et de PBH4, nous observons une diminution du diamètre des artérioles de l'ordre de 10% par rapport à la valeur normale (Graphique 10) (43).

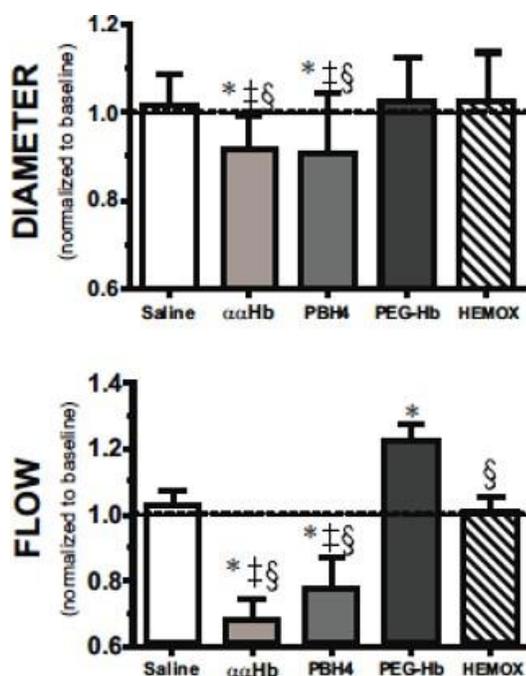
Ces résultats sont en corrélation avec les données du débit sanguin qui présentent, chez les hamsters ayant reçu une injection d' $\alpha\alpha$  Hb et chez ceux recevant le PBH4, un ralentissement de l'écoulement sanguin, respectivement de 30% et de 20% par rapport à la normale.

Ces deux hémoglobines induisent bien une vasoconstriction s'opposant à un écoulement normal.

Pour les résultats obtenus avec la solution PEG-Hb, aucune vasoconstriction n'est observée. En revanche, une augmentation de l'écoulement de 20% par rapport à la normale est notée (Graphique 10). Cette constatation serait due au volume moléculaire assez conséquent de l'hémoglobine pégylée (73). En effet, le fait que l'hémoglobine soit conjuguée à des chaînes de polyéthylène glycol augmente considérablement son volume. Cet accroissement moléculaire va limiter l'extravasation du sang à travers les parois vasculaires. Nous avons alors une diminution de vitesse de sortie du produit induisant une élévation du volume sanguin et donc du débit (74) :

$$D_v = \frac{V}{t} \quad (D_v : \text{débit volumique en m}^3/\text{s} ; V : \text{volume en m}^3 ; t : \text{temps en secondes}).$$

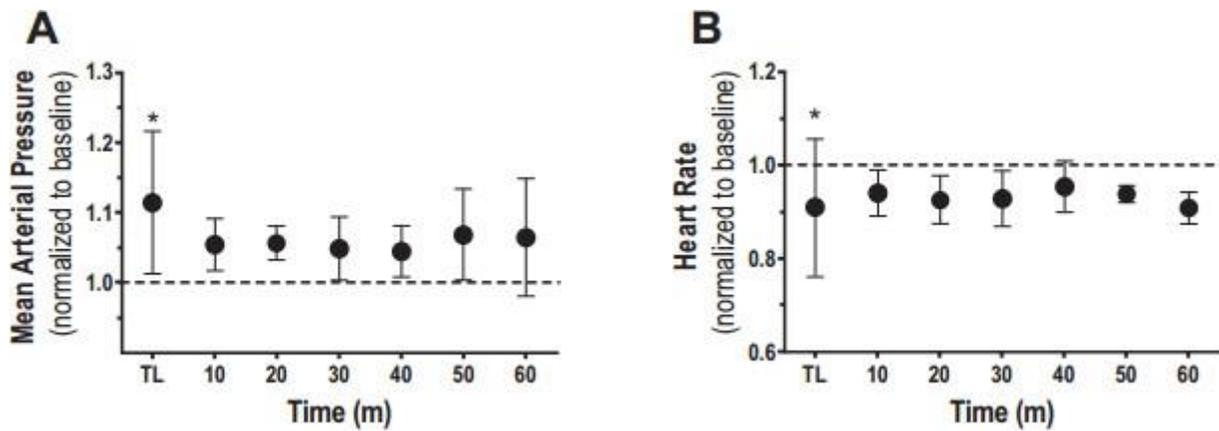
Enfin, les résultats obtenus après injection d'HEMOXYCarrier® ont montré aucun effet ni sur les artérioles ni sur le débit ou sur l'écoulement sanguin (résultats au même niveau que la ligne de référence et que le témoin sérum physiologique) (43).



Graphique 10 : Evolution du diamètre des artérioles et de l'écoulement sanguin en réponse à différentes hémoglobines chez des Hamsters (43)

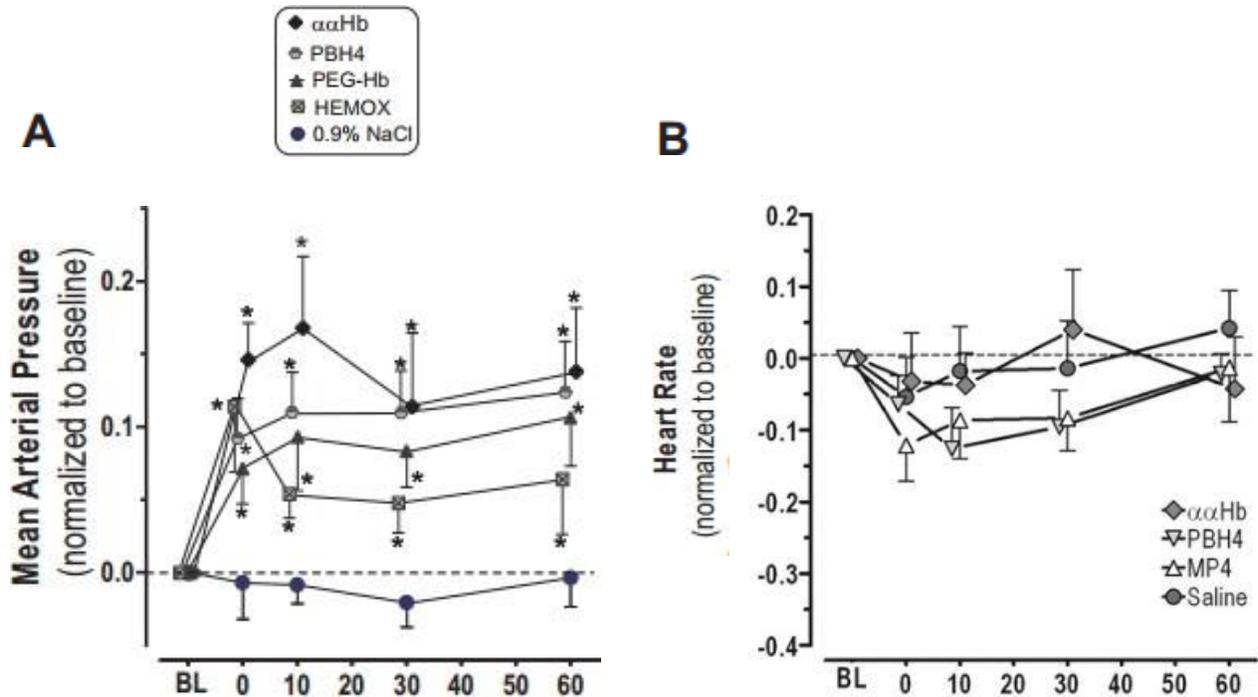
Cette étude confirme les bénéfices que pourraient offrir, au patient, l'emploi d'HEMOXYCarrier®.

Afin d'approfondir les qualités cardiovasculaires de ce produit, une étude a été réalisée pour mesurer la pression artérielle moyenne (MAP pour *Mean Arterial blood Pressure*) ainsi que le rythme cardiaque (HR pour *Heart Rate*) chez des hamsters. Comme précédemment, différents produits d'hémoglobine tels que : α α Hb ; PBH4 ; PEG-Hb ; HEMOX et la solution physiologique de contrôle ont été injectés aux animaux. Les résultats de MAP et de HR ont été relevés à 10, 30 et 60 minutes après l'injection intraveineuse d'une dose unique de 600 mg/kg de produit. Le Graphique 11 montre seulement l'effet du HEMOXYCarrier® sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque en fonction du temps par rapport à la valeur de référence (1.0) (73). Au moment de l'injection, on note une augmentation d'environ 12% de la pression artérielle moyenne associée à une diminution de 10% de la fréquence cardiaque. Mais dès la dixième minutes suivant l'injection, les valeurs commencent à se normaliser bien que restant, de façon non significative, différentes de la valeur de référence.



Graphique 11 : Evolution de la pression artérielle moyenne (A) et du rythme cardiaque (B) chez des Hamsters après injection d'HEMOXYCarrier® (73)

Les résultats obtenus à la suite des injections des autres solutions d'hémoglobines s'écartent significativement de la valeur seuil à l'exception de la solution saline, qui est la solution témoin de cette étude (Graphique 12).



Graphique 12 : Comparaison de la pression artérielle moyenne (A) et du rythme cardiaque (B) chez des Hamsters après injection des différentes hémoglobines moléculaires (75)

En ce qui concerne l'étude de la pression artérielle moyenne, toutes les hémoglobines moléculaires entraînent un pic de la pression lors de l'injection avec un maximum de 17% au-dessus de la moyenne pour  $\alpha\alpha$  Hb (Graphique 12 A). Après dix minutes, on ne remarque aucune normalisation de la pression avec les autres hémoglobines injectées, ce qui les différencie de HEMOXYCarrier®. Ce dernier entraînerait le moins de variations de la pression artérielle. Néanmoins, aucune différence statistiquement significative n'a été obtenue pour chacune des hémoglobines synthétiques employées.

En ce qui concerne la variation de la fréquence cardiaque, on note aussi le même profil d'évolution que pour l'HEMOXYCarrier®. Ainsi, toutes les hémoglobines testées induisent-elles une légère bradycardie avec un maximum de 12% de différence par rapport à la moyenne pour le PEG-Hb (ou MP4 Graphique 12 B). Toutes les solutions d'hémoglobines atteignent plus ou moins la ligne de référence de la fréquence cardiaque au bout d'une heure. Les variations notées entre l'injection et l'heure qui suit, ne présentent pas de différences statistiquement significatives sur le rythme cardiaque.

En conclusion, pour toutes hémoglobines confondues aucune d'entre-elles n'entraîne de variation de la pression artérielle ni de variation de la fréquence cardiaque, bien qu'une légère vasoconstriction avec diminution de l'écoulement sanguin ait été relevée pour l' $\alpha\alpha$  Hb et le PBH4. Dans ce cas, les variations constatées du diamètre des artérioles seraient liées à la taille des molécules. Une autre explication possible, serait que l'emploi de ces hémoglobines synthétiques provoquerait une extravasation plus importante. De même que l'augmentation du débit sanguin remarquée à la suite de l'emploi du PEG-Hb.

Bien que sur un court laps de temps (d'une heure), aucun impact significatif sur la pression artérielle ni sur le rythme cardiaque n'ait été noté, il faut néanmoins constater, comme l'ont montré d'autres études, que ces hémoglobines synthétiques peuvent entraîner des poussées hypertensives et des épisodes de vasoconstriction. Ces effets ont un rôle non négligeable sur l'oxygénation de tissus et/ou d'organes (71). En revanche, l'HEMOXYCarrier® ne montre aucun signe de vasoconstriction, ni de changement sur

l'écoulement sanguin, ni de poussées hypertensives aiguës, ni d'effets chronotropes. Celui-ci se présente donc, comme étant un bon transporteur d'oxygène aux tissus et aux organes (73).

Après avoir montré l'absence d'effets indésirables de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*, il ne restait plus qu'à démontrer ses qualités supérieures d'oxygénation tissulaire *in vivo*.

Pour cela, les chercheurs ont utilisé des souris qu'ils ont irradiées par des rayons gamma à la dose de 5 Gray, avant de procéder à une xéno greffe. Celle-ci consiste à leur injecter en sous-cutanée une solution contenant une lignée cellulaire HT-29 du cancer du côlon humain. Cette lignée va induire la différenciation des cellules saines en cellules cancéreuses, à l'origine de l'apparition d'une tumeur *in situ*.

Une fois que la tumeur sous-cutanée installée, atteint un diamètre d'environ 5 millimètres, l'hémoglobine du ver marin ou HBL-Hb est injectée (Figure 18) aux différents groupes de souris à trois doses différentes : 60, 600 et 1 200 mg/kg. Puis, une heure et cinq heures après les injections, des biopsies des tumeurs sont pratiquées (70).

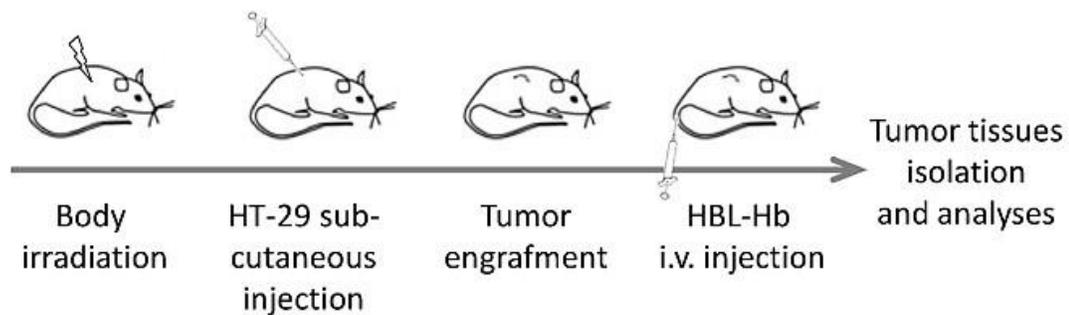


Figure 18 : Schéma résumant la procédure expérimentale (70)

Les coupes de tissus tumoraux sont analysées après coloration immunohistochimique utilisant des anticorps anti-Glut-1.

Glut-1 est un transporteur de glucose qui permet l'approvisionnement basal des cellules en glucose. Au sein des cellules tumorales, ce transporteur est sur-exprimé afin de couvrir leurs dépenses énergétiques importantes. Ici, Glut-1 sera employé comme

marqueur de l'hypoxie car les cellules tumorales ont tendance à croître beaucoup plus rapidement que le réseau capillaire se trouvant dans leur environnement direct. Ainsi en grandissant, les cellules tumorales deviennent rapidement hypoxiques (76) (77).

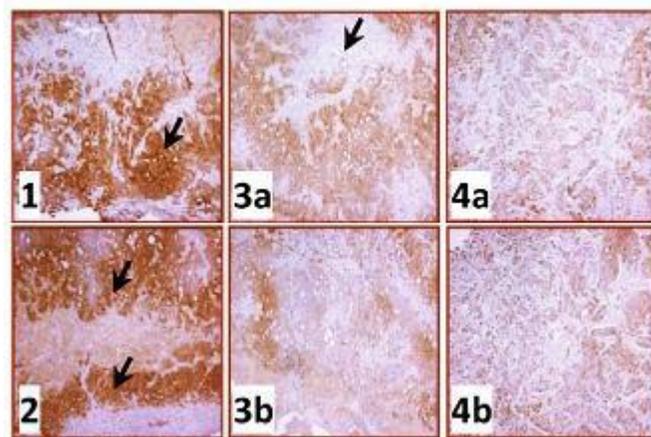


Figure 19 : Coloration immunohistochimique d'anticorps anti-Glut-1 sur des coupes de tissus tumoraux HT-29 inclus dans de la paraffine (x 100) (70)

1 : Contrôle négatif

2 : Coupe réalisée 5h après l'injection d'HEMOXYCarrier® à 60 mg/kg

3.a : Coupe réalisée 1h après l'injection d'HEMOXYCarrier® à 600 mg/kg

3.b : Coupe réalisée 5h l'injection d'HEMOXYCarrier® à 600 mg/kg

4.a : Coupe réalisée 1h l'injection d'HEMOXYCarrier® à 1 200 mg/kg

4.b : Coupe réalisée 5h l'injection d'HEMOXYCarrier® à 1 200 mg/kg

Chez les souris témoins (contrôle négatif) ne recevant aucune injection d'HEMOXYCarrier® et qui possèdent des tumeurs sous cutanées, on note une forte coloration brune indiquée par la flèche (Figure 19. 1), témoin d'une importante expression des transporteurs Glut-1, trahissant l'existence d'une zone hypoxique donc nécrotique.

Chez celles qui ont reçu une dose de 60 mg/kg d'HEMOXYCarrier® et qui ont été sacrifiées cinq heures après (Figure 19.2), on note que l'aspect histopathologique de la tumeur est identique à celui décrit chez le groupe témoin.

Pour le groupe de souris ayant reçu une dose du produit à 600 mg/kg (Figure 19.3), nous observons que la quantité de tissu nécrosé est moindre une heure après l'injection (3.a.) voire inexistante cinq heures après administration du produit (3.b.).

Enfin, sur les coupes effectuées une heure (Figure 19.4.a.) et cinq heures (4.b.) après une injection d'HEMOXYCarrier® à la dose de 1 200 mg/kg, on constate une absence totale de coloration spécifique du transporteur Glut-1.

Nous pouvons déjà conclure, comme on devait s'y attendre, au vu de ces résultats que l'activité de l'HEMOXYCarrier® est dose dépendante. Visiblement, il apparaît un effet notable sur la tumeur sous cutanée qu'à partir de 600 mg/kg, puisque nous observons une diminution impressionnante de la présence de Glut-1. De plus, cette décroissance témoigne de l'effet oxygénant d'HEMOXYCarrier®.

En effet, la diminution des transporteurs Glut-1, marqueurs de l'hypoxie cellulaire, signifie une réoxygénation des cellules.

Ces résultats nous permettent de conclure à l'existence d'une fonction importante de transporteur d'O<sub>2</sub> de cette hémoglobine et à sa capacité de rejoindre rapidement, une heure après injection, les tissus hypoxiques, même ceux qui sont mal vascularisés, tels que ceux constituant les tumeurs (70).

Pour vérifier l'effet oxygénant, observons sur l'ensemble de la tumeur les résultats de l'emploi de ce produit sur celle-ci (Figure 20).

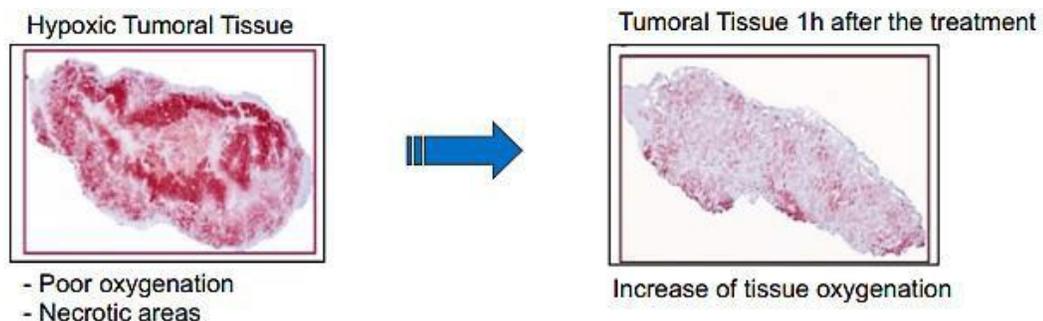
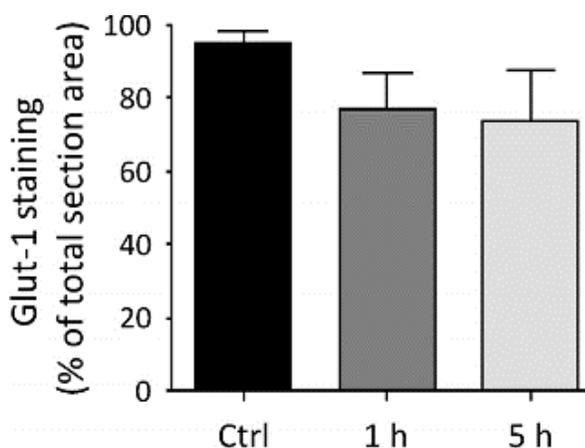


Figure 20 : Tumeur sous cutanée colorée par immunohistochimie par des anticorps anti-Glut-1 avant et 1h après injection d'HEMOXYCarrier® à la dose de 1 200 mg/kg (43)

Sans produit, on remarque après coloration de la tumeur par méthode histochimique que la tumeur exprime à sa surface de nombreux transporteurs Glut-1, c'est-à-dire de nombreuses zones pauvres en oxygène présentant, par endroits, des territoires nécrotiques (coloration rouge foncé) (Figure 20). En revanche, à la suite de l'injection de 1 200 mg/kg d'HEMOXYCarrier®, nous voyons au bout d'une heure une perte progressive de la coloration de Glut-1 (Figure 20) corrélée à une reprise de l'oxygénation des tissus proportionnellement à la quantité de Glut-1 coloré.



Graphique 13 : Quantification de la coloration de Glut-1 sur des coupes de tissus tumoraux du groupe témoin (Ctrl) et du groupe traité avec une dose de 1 200 mg/ kg par HEMOXYCarrier® à 1h et 5h après l'injection (70)

L'évaluation quantitative de l'effet de cette hémoglobine injectée, sera faite par la mesure de l'intensité de la coloration de Glut-1, qui est proportionnelle à la quantité de l'antigène présent au sein du tissu tumoral (Graphique 13) (70).

Nous observons, dès la première heure suivant l'injection de 1 200 mg/kg d'HEMOXYCarrier®, que l'intensité de la coloration de Glut-1 a déjà été réduite de 20% et de 23% cinq heures suivant l'injection. Cette quantification a été faite, seulement, sur 3 animaux, ne permettant pas d'affirmer les résultats, mais une oxygénation 20% supérieure au groupe contrôle reste non négligeable (70).

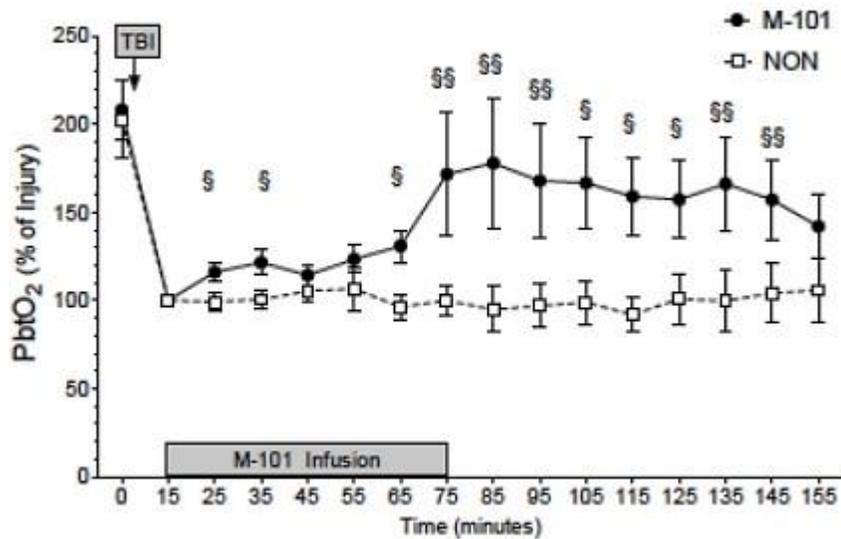
HEMOXYCarrier® a donc démontré son efficacité en tant que produit oxygénant mais cette expérience réalisée sur des tumeurs agrandit d'autant plus les champs d'application de l'hémoglobine d'*Arenicola marina*. Elle pourrait avoir un rôle majeur dans les applications en radiothérapie et en chimiothérapie car le fait de réoxygéner les cellules tumorales permettrait d'accroître la sensibilité aux traitements des tumeurs (43).

Les qualités d'oxygénation des tissus hypoxiques, mal irrigués, d'accès difficile, de cette hémoglobine marine, permet de penser un emploi dans le cas de traumatismes cérébraux d'origine variés mais dont l'hypoxie est toujours présente et pose le problème de la destruction du tissu cérébral et donc des séquelles.

Des chercheurs de l'US Navy ont utilisé des rats chez lesquels ils ont induit un traumatisme cérébral (*Trauma Brain Injury - TBI*), afin de reproduire l'effet « blast » que l'on peut rencontrer sur les champs de bataille.

Quinze minutes après le traumatisme, 12 mL/kg d'hémoglobine d'*Arenicola marina* (M101) ont été perfusés pendant une heure dans le groupe test (78) alors que le groupe contrôle ne recevait aucune perfusion de produit (*NOM*). La pression partielle en oxygène dans les tissus cérébraux (*PbtO<sub>2</sub>* exprimée en pourcentage par rapport aux valeurs post-traumatiques) a été mesurée dans chaque groupe avant que l'expérience ne commence.

Puis à partir de la perfusion, une mesure est faite toutes les dix minutes et cela sur une période de cent cinquante-cinq minutes (Graphique 14) (43).



Graphique 14 : Comparaison entre HEMOXYCarrier® (M-101) et le groupe contrôle (NON) sur la pression partielle en oxygène dans les tissus cérébraux (PbtO<sub>2</sub> en pourcentage par rapport aux valeurs post-traumatique) en fonction du temps (en minutes) (43)

Lors d'un traumatisme cérébral comme un AVC, une hémorragie ou encore un choc, le premier risque est l'hypoxie cérébrale. Cette perte d'oxygénation est un facteur fondamental dans le pronostic vital du patient en étant responsable de l'apparition de séquelles tant motrices que cognitives, voire du décès de celui-ci, d'où l'importance d'une prise en charge rapide.

Avant le traumatisme (Graphique 14), la pression en oxygène au niveau des tissus cérébraux est à son maximum (200%), et celle-ci décroît rapidement une fois le traumatisme infligé témoignant ainsi de l'apparition d'une hypoxie aiguë. Le cerveau n'est plus qu'à moitié oxygéné.

Durant la perfusion du produit HEMOXYCarrier®, nous ne notons pas de différence significative avec le groupe contrôle non traité, l'hypoxie est toujours présente. En revanche, après une heure de perfusion, nous remarquons une augmentation de l'apport en oxygène dans les tissus cérébraux de plus de 75% par rapport au groupe contrôle. Cette réoxygénation du tissu cérébral débute soixante minutes après le traumatisme et

reste stable jusqu'à la fin de l'étude, alors que l'on n'assiste, comme attendu à aucune récupération de l'oxygénation tissulaire dans le groupe contrôle (78).

Cette dernière étude confirme l'effet oxygénant d'HEMOXYCarrier® dans les zones hypoxiques et plus particulièrement, ici, au niveau des tissus cérébraux.

Pour conclure, HEMOXYCarrier® n'entraîne pas les effets indésirables habituellement rencontrés chez les autres substituts sanguins tels que la vasoconstriction, l'augmentation de la pression artérielle ou encore la diminution de la fréquence cardiaque. De plus, ces dernières études ont montré que le produit n'avait aucun impact sur l'écoulement sanguin, la substance n'étant pas visqueuse. Enfin, ce produit a montré des qualités indéniables comme le souhaitait l'US Navy ; de facilité d'emploi, de conservation aisé, limitant les effets délétères du souffle sur les soldats et permettant ainsi, d'oxygéner les différents organes dont le cerveau pendant au moins une heure. Ainsi, la planification de rapatriements sanitaires dans des structures spécialisées à l'arrière de la ligne de front devient possible.

Ainsi, chaque soldat Américain pourra transporter avec lui du sang en poudre sur les champs de bataille. HEMARINA et l'US Navy continuent de travailler ensemble afin d'élargir leurs études au domaine neurologique (2).

#### 4. Application : HEMOXCell®

Les résultats obtenus par le Docteur Franck Zal et son équipe ont déclenché un réel engouement, aussi bien chez les médecins, qu'au sein du service de santé des armées ou encore parmi les industriels. Ce sont chez ces derniers que HEMOXCell® a vu le jour.

En effet, actuellement, nous sommes dans l'ère de la bio-production, c'est-à-dire de production à grande échelle de molécule thérapeutique. Le génie génétique est très utilisé dans ce domaine, particulièrement avec les protéines recombinantes qui sont produites via une cellule dont le matériel génétique a été modifié (Figure 21). Un autre procédé, utilisé dans la synthèse de telles substances, est la fermentation. Ici, il s'agit de la transformation de substances organiques sous l'action de micro-organismes qui vont produire les métabolites recherchés. Dans les deux cas, l'emploi de cellules ou de micro-

organismes est nécessaire. Les plus communément utilisés appartiennent aux différents groupes du vivant, parfois très éloignés phylogénétiquement les uns des autres (79) :

- ❖ Des bactéries : *Escherichia coli*, *Streptomyces* ...
- ❖ Des levures : *Saccharomyces cerevisiae* ...
- ❖ Des champignons : *Aspergillus niger* ...
- ❖ Des cellules de mammifères : *Chinese Hamster Ovary (CHO)* ...

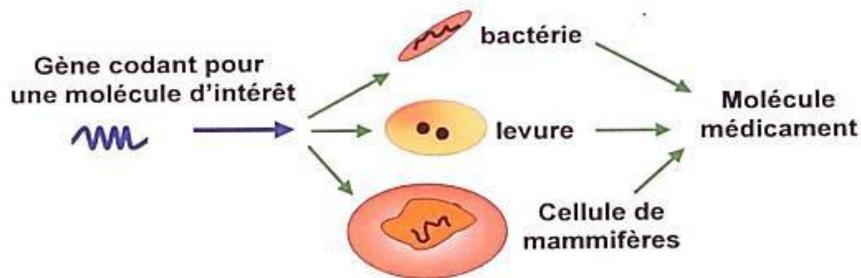


Figure 21 : Schéma résumant la production de protéines recombinantes (71)

Grâce à ces procédés utilisant des bioréacteurs afin de produire la biomasse nécessaire (la matière organique), l'industrie pharmaceutique synthétise des anticorps monoclonaux, des vaccins, des hormones, de l'insuline, des facteurs de croissance et encore bien d'autres médicaments impossibles à obtenir par synthèse chimique (80) (81) (82).

Mais le problème majeur est la complexité et le rendement de production de ces molécules thérapeutiques qui, pour certaines d'entre elles, nécessitent entre autre pour leurs biosynthèses une oxygénation constante des organismes cellulaires producteurs entraînant de ce fait des coûts exorbitants pour les traitements, pouvant aller jusqu'à quarante mille euros pour un mois de soins (83).

Des industriels ont donc demandé à la société HEMARINA « *Peut-on utiliser l'hémoglobine du ver marin pour apporter de l'oxygène aux cellules synthétisant ces médicaments ?* » (83).

En effet, une fois les cellules dans le bioréacteur pour amplifier ce que l'on souhaite obtenir, il faut travailler dans des conditions opératoires optimales pour s'assurer du meilleur rendement (81) :

- ❖ Apport en dioxygène ( $O_2$ ) : les cellules consommant en continu de l' $O_2$ , il faut s'assurer d'une concentration suffisante en  $O_2$  et d'un apport constant. La manipulation du dioxygène doit être sécurisée afin d'éviter tout risque d'incendie car ce gaz est un comburant.
- ❖ Apport ou retrait de dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) : certains micro-organismes consomment du  $CO_2$  alors que d'autres en rejettent. Ce gaz étant toxique par inhalation, des sondes en mesurent constamment la concentration dans l'air ambiant pour la protection du personnel.
- ❖ Apport de diazote ( $N_2$ ) : certaines cellules ont besoin du  $N_2$  pour leur consommation.
- ❖ Contrôle de la température et du pH : selon le type cellulaire ou l'organisme utilisé, son métabolisme demandera une surveillance continue de la température et du pH afin d'atteindre son optimum de production.
- ❖ Contrôle de l'agitation : afin d'homogénéiser le milieu de culture, il faudra s'assurer d'une agitation constante au sein du bioréacteur.

Pour résumer, la production de molécules thérapeutiques est longue et complexe. De nombreux paramètres rentrent en ligne de compte afin d'optimiser la production nécessitant une augmentation du nombre de contrôles de qualité. Ainsi, au sein du bioréacteur (Figure 22) :

- ❖ Tous les gaz qui y seront ajoutés devront passer au travers d'un filtre antiparticules stérilisant.
- ❖ La température interne de celui-ci devra être évaluée constamment au moyen d'une sonde car la multiplication des cellules dégage de la chaleur.
- ❖ Enfin, pour éviter toute surpression (qui peut être due par exemple au colmatage des filtres), un manomètre mesurera en permanence sa pression interne.

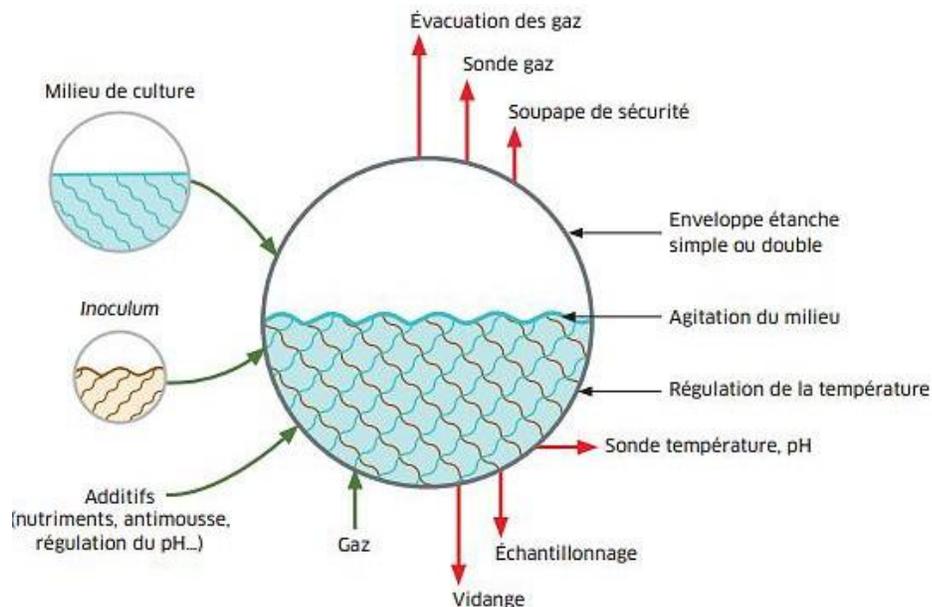


Figure 22 : Schéma fonctionnel d'un bioréacteur (72)

Nous savons que l'hémoglobine d'*Arenicola marina* peut transporter jusqu'à 156 molécules d'oxygène pour les libérer selon un gradient de pression partielle en dioxygène existant dans la solution. Ainsi, il suffirait de mettre une quantité suffisante d'hémoglobine dans le bioréacteur afin de fournir en continu de l'oxygène aux cellules sans passer par une alimentation en O<sub>2</sub> par bonbonne. De surcroît, ce ver marin possède des propriétés antioxydantes, ce qui limiterait au sein du milieu de culture les réactions d'oxydation et protégerait ainsi les organismes producteurs et l'intégrité des molécules thérapeutiques synthétisées (84).

Bien évidemment, plusieurs points ont dû être étudiés afin de prouver son utilité dans ces procédés pharmaceutiques. Ainsi, les études entreprises se sont-elles focalisées sur la détermination des taux de viabilité, d'apoptose et de densité cellulaire obtenus en présence d'HEMOXCell®.

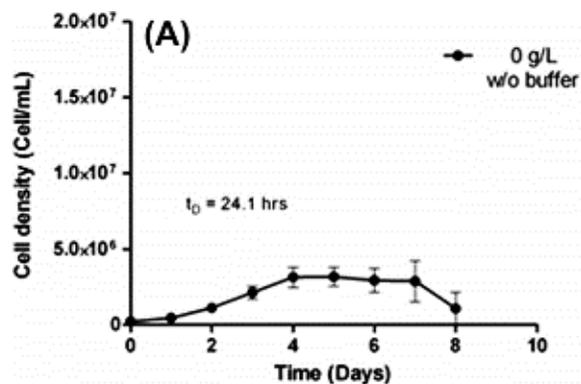
Rappelons que la lignée cellulaire Ovarienne d'Hamster Chinois ou CHO (*Chinese Hamster Ovary*) correspond au système cellulaire le plus utilisé pour la production à grande échelle de protéines recombinantes (85). Cette lignée à l'avantage d'être immortelle, elle peut se multiplier indéfiniment et ce rapidement (85). Les CHO seront

donc utilisées pour déterminer la pertinence de l'ajout d'HEMOXCell® dans les bioréacteurs.

Dans un premier temps, le dioxygène du milieu a été apporté par du HEMOXCell®, dans le but de montrer que la croissance cellulaire n'était pas affectée, au moins négativement par ce changement.

La croissance cellulaire de la lignée CHO se définit par quatre phases (Graphique 15) :

- ❖ Phase de latence : nous n'observons aucune croissance cellulaire. C'est le temps nécessaire aux CHO d'adapter leur métabolisme aux conditions du milieu de culture.
- ❖ Phase de croissance ou phase exponentielle : la croissance cellulaire est optimale. La vitesse de multiplication est constante, le nombre de cellules double à intervalles de temps réguliers. C'est dans cette phase que nous pouvons calculer le temps de doublement de la population (PDT pour *Population Doubling Time*). Ce paramètre est important pour évaluer l'expansion de la culture. Ici, il est de 24 heures.
- ❖ Phase stationnaire : la croissance cellulaire ralentit et atteint un plateau.
- ❖ Phase de déclin : les cellules ne se divisent plus et meurent. Cela peut s'expliquer par un manque d'apport de nutriments ou encore à une augmentation de la quantité de déchets toxiques dans le milieu de culture.

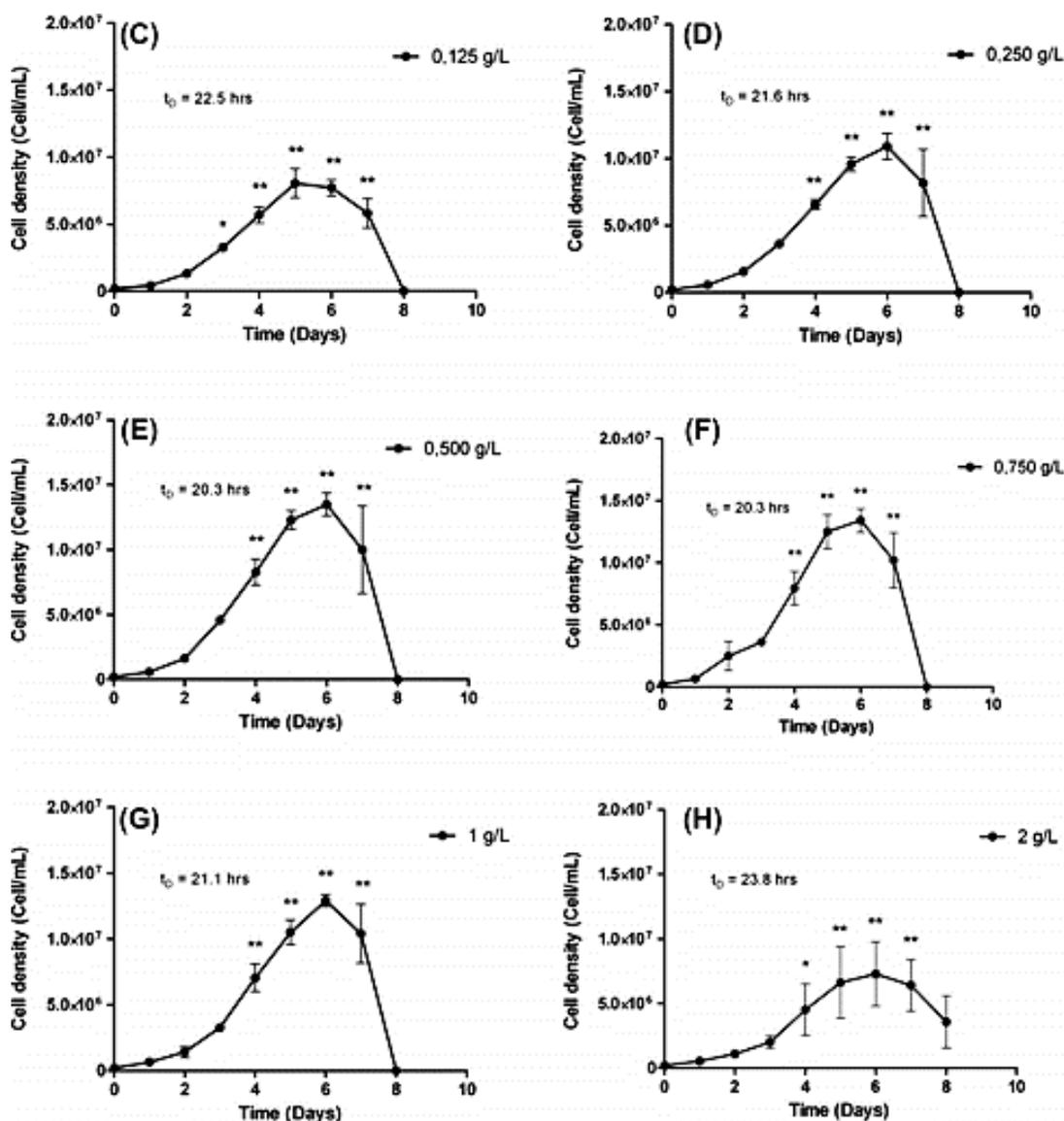


Graphique 15 : Densité cellulaire de culture de CHO classique (cellules/mL) en fonction du temps (jours) (86)

Ce graphique nous servira de témoin pour comparer l'aspect des courbes de croissance des cultures de CHO en présence d'HEMOXCell®. Ce produit sera ajouté à différentes concentrations (0.125 g/L ; 0.250 g/L ; 0.500 g/L ; 0.750 g/l ; 1 g/L ; 2g/L) au milieu de culture. Les quatre phases de croissance seront observées (Graphique 16).

Nous constatons que l'emploi d'HEMOXCell® permet de réduire le temps de doublement de la population (à 0.500 g/L → PDT = 20.3 heures vs culture témoin PDT = 24.1 heures) et permet également d'augmenter la densité cellulaire (à 0.500 g/L  $\approx$   $1.5 \cdot 10^7$  cellules/mL vs culture témoin  $< 5 \cdot 10^6$  cellules/mL). Néanmoins, nous remarquons qu'au-delà d'une concentration optimum qui est de 0.500 g/L - 0.750g/L, le PDT commence à réaugmenter et la densité cellulaire chute (à 0.500 g/L - 0.750g/L → PDT = 20.3 heures et  $1.5 \cdot 10^7$  cellules/mL vs 1 g/L → PDT = 21.1 heures et un nombre de cellules identique autour de  $1.5 \cdot 10^7$  cellules/mL). La décroissance de la densité cellulaire apparaîtra à partir d'une concentration de 2 g/L (à 0.500 g/L - 0.750g/L → PDT = 20.3 heures et  $1.5 \cdot 10^7$  cellules/mL vs 2 g/L → PDT = 23.8 heures et moins de  $1 \cdot 10^7$  cellules/mL).

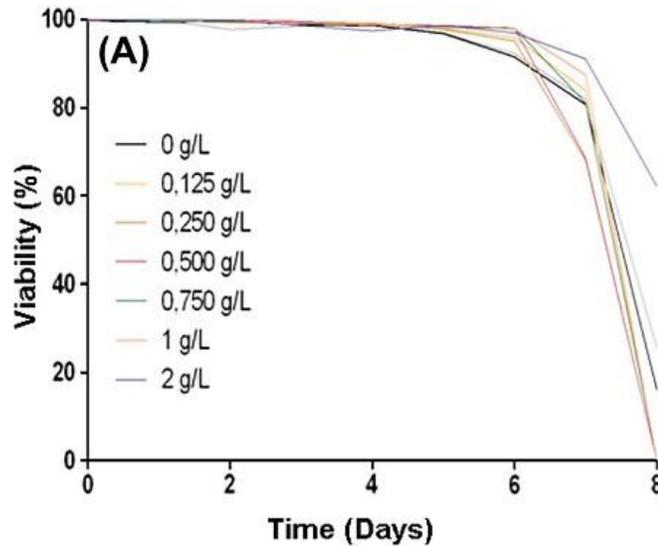
HEMOXCell® permet donc, à une concentration d'utilisation idéale de 0.500 g/L, de produire plus de cellules CHO en réduisant son PDT par rapport aux conditions d'oxygénation habituelle (86).



Graphique 16 : Densité cellulaire (cellules/mL) de CHO cultivé avec HEMOXCell® à différentes concentrations en fonction du temps (jours) (86)

A la suite de ces premiers résultats encourageants, la viabilité des cellules en présence de ce produit a été évaluée. En effet, il est essentiel de maintenir un taux de survie élevé dans le but d'améliorer le taux de production des cellules mais aussi d'éviter une production trop importante de déchets due aux cellules mortes. Pour contrôler celui-ci, la méthode d'exclusion au bleu trypan a été utilisée. Ce procédé permet de colorer les

cellules mortes qui garde le bleu trypan alors qu'il est expulsé par les cellules vivantes (87). Ci-dessous les résultats obtenus (Graphique 17) :



Graphique 17 : Taux de viabilité des cultures de CHO (%) en fonction du temps (jours) (86)

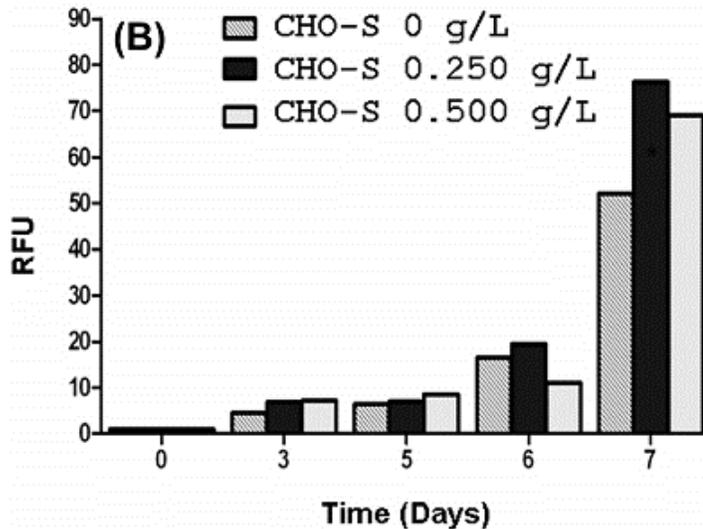
La viabilité des cellules témoins (culture CHO sans HEMOXCell®) se maintient au-dessus de 95% jusqu'au cinquième jour (Graphique 17). Puis le déclin se fait progressivement avec 80% de cellules viables au septième jour pour ensuite chuter brusquement à moins de 20% de taux de survie au huitième jour (Graphique 17).

En ce qui concerne les résultats des taux de viabilité des CHO obtenus en présence d'HEMOXCell®, nous voyons que pour chaque concentration le taux de viabilité reste au-dessus des 95% jusqu'au sixième jour. Puis pour les concentrations allant de 0,125 g/L à 1 g/L, le taux de survie chute à 75 à 80%, ce qui est légèrement inférieur à celui obtenu au même jour avec les CHO cultivés en milieu habituel. En revanche, la réponse cellulaire obtenue à la suite de l'ajout de 2 g/L d'HEMOXCell® dans le milieu de culture permet de constater que la viabilité baisse plus lentement pour se retrouver à 60% au huitième jour.

Bien que les différences observées ne soient pas significatives, cette expérience a permis de montrer l'absence d'impact négatif d'HEMOXCell® sur les cultures cellulaires (86).

Cela étant, si le taux de survie chute, il faut s'assurer que cette baisse soit due à une mort cellulaire par apoptose et non par nécrose. En effet, une mort par nécrose est la conséquence d'une agression structurale ou chimique, on parlera alors, de mort par voie accidentelle, la cellule s'autolysant. Alors que la mort cellulaire, par voie apoptotique, est la voie naturelle et programmée de cette disparition. La distinction faite entre ces deux voies de mort cellulaire d'origine différente a pour but de garantir l'absence d'effet cytotoxique d'HEMOXCell®.

Pour cela, les scientifiques ont mesuré par fluorescence l'activation de la caspase 3. Cette protéase est activée lors de la cascade d'évènements associés à l'apoptose et non lors d'une nécrose. L'expérience a été réalisée sur la culture témoin (sans ajout d'HEMOXCell®) et sur deux cultures avec 0.250 g/L et 0.500 g/L d'HEMOXCell®. Les résultats ci-dessous sont exprimés en unités de fluorescence relatives (RFU) (Graphique 18).



Graphique 18 : Mesure par fluorescence (RFU) de l'activation de caspase 3 en fonction du temps (jour) (86)

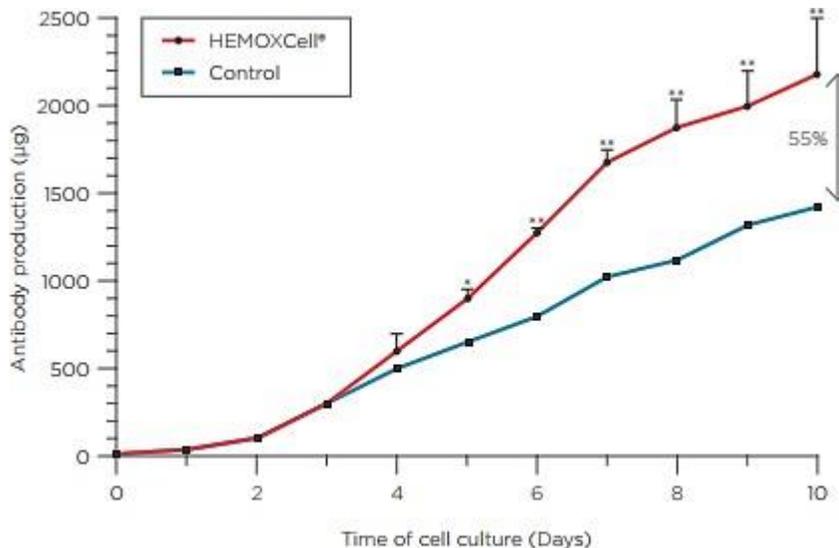
Si nous commençons par analyser la culture de CHO sans ajout d'HEMOXCell®, nous retrouvons les données précédemment vues, soit 95% de cellules viables au cinquième jour et à partir du sixième, un taux de fluorescence qui devient plus important (20 RFU) pour atteindre un seuil de 50 RFU au septième (Graphique 18), témoignant de l'augmentation de cellules touchées par l'apoptose.

En ce qui concerne les résultats obtenus avec les cultures de CHO en présence de 0.250 g/L et de 0.500 g/L d'*AmHb*, bien que leur taux d'activation de la caspase 3 fut un peu plus important que celui rencontré avec la culture contrôle (à 7 jours : CHO-S 0 g/L  $\approx$  50 RFU ; CHO-S 0.250 g/L  $\approx$  78 RFU ; CHO-S 0.500 g/L  $\approx$  70 RFU), ces différences ne sont pas significatives. Il a donc été mis en évidence qu'HEMOXCell® n'induit pas de mort par nécrose mais bien par apoptose puisque l'activation de la caspase 3 est similaire au taux retrouvé chez la culture témoin. En conclusion, HEMOXCell® n'induit aucun processus inflammatoire par la voie apoptotique et présente une qualité de multiplication des cellules intéressante (86).

En biotechnologie, le plus souvent, les cellules CHO sont utilisées pour la production d'anticorps monoclonaux. Avant leur amplification dans le bioréacteur, celles-ci seront transfectées avec le gène voulu, ainsi lors de leurs multiplications successives, celui-ci sera également exprimé. Dans cette étude, la cellule CHO utilisée a elle aussi été modifiée pour produire un anticorps monoclonal. Une fois la biomasse récoltée, il faut la purifier et isoler notre anticorps synthétique en quantité suffisante.

La dernière étape de cette étude, consistera donc à quantifier la production des anticorps monoclonaux en présence d'HEMOXCell®, afin de vérifier si celui-ci induit une production plus importante d'anticorps.

Nous comparerons, donc, la quantité d'anticorps produits dans les conditions de culture normales avec celle obtenue en ajoutant au milieu de culture 0.250 g/L d'HEMOXCell® (Graphique 19).



Graphique 19 : Quantité d'anticorps produite (µg) au cours du temps (jours) en présence ou non d'HEMOXCell® (88)

Au bout de 10 jours de culture, nous constatons que 1 400 µg d'anticorps ont été produits par la culture contrôle et 2 200 µg à la suite de l'ajout d'HEMOXCell® (à la concentration de 0.250 g/L), ce qui correspond à une augmentation de 55% de la production d'anticorps (88).

En conclusion, l'ajout d'HEMOXCell® a démontré que par un apport d'oxygène en continu grâce à l'hémoglobine du ver marin, nous obtenons une augmentation de la densité cellulaire, de la viabilité des cellules (plus ou moins), sans effet cytotoxique. Cet apport d'oxygène permet d'augmenter la productivité, donc par voie de conséquence le rendement, abaissant d'autant le coût de production, et donc celui des médicaments issu de cette biotechnologie. Une majoration de 70% à 90% a été calculée pour le rendement des cultures utilisant l'HEMOXCell® (83).

Ces bénéfices ont été obtenus avec une concentration optimale de 0.500 g/L. Au-delà, le temps de doublement de la population augmente et la croissance cellulaire stoppe plus rapidement.

Cette solution prête à l'emploi d'HEMOXCell® a été testée sur différentes lignées cellulaires (CHO-320 ; CHO-S ; MSC ; Sp2/O et NSO) et toutes ont permis d'obtenir d'excellents rendements.

En résumé, voici les principaux avantages qu'apporte l'emploi de ce produit HEMOXCell® à l'industrie pharmaceutique par rapport à d'autres facteurs de croissance qui sont régulièrement ajoutés dans les bioréacteurs (84) :

- ❖ Pas d'ajout de cofacteurs.
- ❖ Solution prête à l'emploi et stable entre 4°C à 37°C.
- ❖ HEMOXCell® libère de l'oxygène en continu et en fonction des besoins des cellules. Les conditions d'oxygénation sont donc idéales.
- ❖ L'hémoglobine *AmHb* avec son activité *SOD-like* protège le milieu de culture de la formation des radicaux libres et lutte contre la détérioration de la qualité de celui-ci épargnant aussi les cellules.
- ❖ Augmente les rendements et la productivité des protéines recombinantes sans modifier les conditions de culture.

Pour conclure, HEMOXCell® est un nouveau produit tout à fait innovant et original dont l'emploi en tant qu'additif aux cultures cellulaires, présente de très nombreux avantages. A ce jour, plus d'une vingtaine de brevets ont été déposés attestant de l'efficacité d'HEMOXCell® (84) (86).

Récemment, en 2013, la société HEMARINA signa un accord commercial de distribution avec le laboratoire Français EUROBIO pour l'accélération des cultures cellulaires. Cette entreprise française produit et commercialise des solutions pour la recherche dans les domaines de l'immunologie, de la biologie moléculaire et de la biologie cellulaire. Avec ce partenariat, HEMARINA met son premier produit sur le marché Européen. C'est grâce à cet accord, qu'EUROBIO en commercialisant HEMOXCell® met celui-ci à la disposition de l'ensemble des laboratoires de recherche et développement privés et académiques (89).

## V. Conclusion

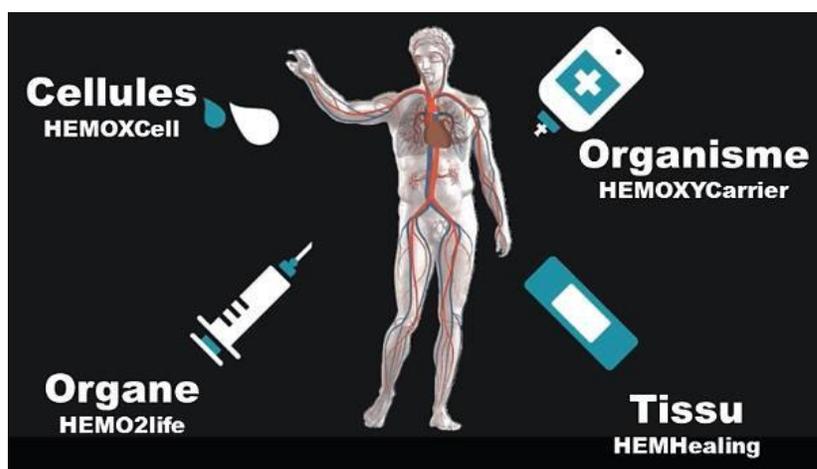
C'est en observant la nature, puis en essayant de comprendre le mode de vie d'un ver marin, *Arenicola marina*, que le Docteur Franck Zal a démarré sa start-up en 2007. Après de nombreuses recherches, son équipe et lui-même ont découvert que cet annélide possédait une hémoglobine capable de lier 156 molécules d'oxygène contrairement aux quatre qui se fixent sur l'hémoglobine humaine. De plus, ils ont montré que l'affinité du dioxygène pour l'AmHb était cinquante fois plus importante que celle pour l'hémoglobine humaine.

Ces différences majeures qui font de cette hémoglobine un transporteur d'oxygène idéal, innovant et unique à ce jour, ont été décrites dans de nombreuses études que nous vous avons présentées.

De plus, contrairement aux substituts sanguins synthétiques, cette hémoglobine possède des propriétés tout à fait exceptionnelles. En effet, celle-ci est extracellulaire et ne présente donc pas de réponse immunogène et/ou allergique, ni d'effets secondaires notamment ceux affectant le système cardiovasculaire que l'on rencontre habituellement avec les autres hémoglobines de synthèse, telles que, vasoconstriction, hypertension artérielle et insuffisance rénale. Cette molécule a également l'avantage de posséder sa propre activité antioxydante la protégeant, ainsi des radicaux libres. Les nombreux essais effectués, ont montré sa stabilité d'emploi entre 4°C à 37°C et une conservation possible sous forme de solution dans un flacon pendant 5 ans à -20°C ou bien une conservation à température ambiante sous forme de lyophilisat pendant la même période de temps, ce qui la différencie du sang humain de conservation plus délicate et éphémère. En effet, les globules rouges humains se conservent seulement 42 jours à 4°C. Et même après ces étapes, les contraintes d'utilisation de la poche de sang ne sont pas terminées puisqu'il est nécessaire de vérifier la compatibilité sanguine entre le donneur et le receveur. Ce problème ne se retrouve pas avec l'hémoglobine d'*Arenicola marina* car c'est une hémoglobine extracellulaire non glycosylée et qui ne possède aucun antigène à sa surface permettant d'être administrée chez n'importe quel type de receveur. Cette propriété la rend très intéressante en médecine transfusionnelle. A ces avantages

s'ajoutent celui de l'innocuité et de l'absence de risque de transmission de pathologies infectieuses comme on peut le rencontrer avec un don de sang pour lequel l'échantillon nécessite une purification et de multiples analyses sérologiques afin d'écartier tout risque infectieux.

Enfin, tout ce qui nécessite un apport rapide en oxygène en médecine humaine, tels que les greffes, les pansements cicatrisants, l'oxygénation post-traumatique ou encore pour « booster » les cultures cellulaires, sont de bons candidats à la prescription de l'AmHb. De ces études a découlé la fabrication de plusieurs produits qui devraient être disponibles sur le marché courant 2019, tels que : HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> ; HEMOXYCarrier<sup>®</sup> et HEMHealing<sup>®</sup>. HEMOXCell<sup>®</sup>, quant à lui, est disponible depuis 2013.



L'hémoglobine de ver marin tient donc une place centrale dans tout l'arsenal thérapeutique nécessitant un apport en oxygène.

L'une des prochaines étapes concerne la mise à disposition des Service d'Aide Médicale Urgente (SAMU) d'HEMOXYCarrier<sup>®</sup> et d'HEMO<sub>2</sub>Life<sup>®</sup> sous forme lyophilisés pour traiter en urgence (AVC ; chocs hémorragiques ; chocs traumatiques ...) (90).

Le but premier du Dr. Franck Zal était de trouver un substitut sanguin universel, cette hémoglobine marine est la première à répondre à ce souhait. Elle pourrait donc remplacer dans un avenir proche, nos poches de sang, comme le laissent espérer les performances prometteuses décrites.

Je tiens à terminer cette thèse sur une citation de Léonard De Vinci, grand visionnaire de la Renaissance, qui avait déjà, semble-t-il, tout compris :

*« Prends tes leçons dans la nature, c'est là qu'est ton futur ».*

## Bibliographie

---

1. société HEMARINA. ARTE - Le sang une quête permanente [Internet]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=x8qYtKekh7E>
2. société HEMARINA. Intervention Franck Zal Ouestransplant [Internet]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=1TJBleGhmY0>
3. De l'Antiquité à la Renaissance [Internet]. [cited 2019 Feb 21]. Available from: <http://www.ch-charcot56.fr/index.php/de-lantiquite-a-la-rennaissance.html>
4. Irène. Histoire du sang en médecine, Partie I [Internet]. Podcast Science. 2014 [cited 2019 Feb 4]. Available from: <https://www.podcastscience.fm/dossiers/2014/12/16/histoire-du-sang-en-medecine/>
5. Données ABM rein [Internet]. [cited 2017 May 30]. Available from: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2015/donnees/organes/06-rein/pdf/rein.pdf>
6. Thalassa : Santé, nourriture, habitat, les promesses de l'océan [Internet]. Santé, nourriture, habitat, les promesses de l'océan. 2017. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=zPLJUKkG9Ug>
7. Arenicola marina | DORIS [Internet]. [cited 2017 May 31]. Available from: [http://doris.ffessm.fr/Especies/Arenicola-marina-Arenicole-577/\(rOffset\)/16](http://doris.ffessm.fr/Especies/Arenicola-marina-Arenicole-577/(rOffset)/16)

8. Ichtyonymie bretonne - Atlas linguistique de la faune marine de Bretagne [Internet]. [cited 2017 May 31]. Available from: <http://ichtyo.cnrs.fr/pages/fr/fichefr.php?var=37>
9. Arénicole sang - [ANIMAUX] [Internet]. Mikroskopia. [cited 2018 Nov 12]. Available from: <http://forum.mikroskopia.com/topic/15212-arenicol-sang/>
10. Wells G-P. The lugworm (*Arenicola*): a study in adaptation. *Neth J Sea Res.* 1966;3(2):294–313.
11. Inc D. Lugworm Gusano Marino Grande Del Filo Annelida Vintage Línea Dibujo [Internet]. Depositphotos. [cited 2019 May 21]. Available from: <https://sp.depositphotos.com/210885206/stock-illustration-lugworm-large-marine-worm-phylum.html>
12. Annélides polychètes sédentaires [Internet]. [cited 2017 Jun 1]. Available from: [http://nature22.com/estran22/vers/annelides/annelides\\_sedentaires.html](http://nature22.com/estran22/vers/annelides/annelides_sedentaires.html)
13. *Arenicola marina* (Arénicole des pêcheurs) [Internet]. [cited 2017 Jun 8]. Available from: <http://mglebrusc.free.fr/textes/la%20mer/Faune/arenicole.html>
14. Annélides polychètes (cours université de Rennes) [Internet]. [cited 2017 Jun 8]. Available from: <https://perso.univ-rennes1.fr/sebastien.dugravot/CM1%20J%20Russo.pdf>
15. Arénicole dans la baie de Saint Briec [Internet]. [cited 2017 Jun 8]. Available from: <http://www.reservebaiedesaintbriec.com/wp-content/IMG/pdf/dossiers/l%27arenicole.pdf>

16. Toulmond A. Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina* (L.). *J Exp Biol.* 1975;63:647–60.
17. Schumann-Bard P. Cours 1 DFASP 1 - Physiologie sanguine. 2015.
18. Schumann-Bard P. Cours 3 DFGSP 2 - Pathologie respiratoire. 2015.
19. Les besoins en sang - Etablissement français du sang | Etablissement français du sang [Internet]. [cited 2019 Feb 11]. Available from: <https://dondesang.efs.sante.fr/comprendre-quoi-servent-les-dons-de-sang/les-besoins-au-quotidien>
20. Les différents groupes sanguins - Etablissement français du sang | Etablissement français du sang [Internet]. [cited 2018 Nov 12]. Available from: <https://dondesang.efs.sante.fr/comprendre-quest-ce-que-le-sang/les-groupes-sanguins>
21. Groupes sanguins [Internet]. Hema-Quebec. [cited 2017 Jun 26]. Available from: <http://www.hema-quebec.qc.ca/sang/savoir-plus/groupes-sanguins.fr.html?jsessionid=9337CB3D37937C6E4DE0C87502B45FCB>
22. Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, Lagente V, Pirow R, Rees J-F, et al. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J.* 2006;1(3):333–345.
23. Le parcours de la poche de sang - Etablissement français du sang | Etablissement français du sang [Internet]. [cited 2017 Jun 26]. Available from:

<https://dondesang.efs.sante.fr/comprendre-que-devient-la-poche-de-sang/le-parcours-de-la-poche-de-sang>

24. Franck Zal. Conférence “Comment un ver marin m’a révélé le secret du sang universel” [Internet]. 2014. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=tTcrwOjAo30>
25. 01 Hemarina - YouTube [Internet]. [cited 2018 Nov 14]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=a-sbzMI-SKg>
26. Extracellular Hemoglobins from Annelids, and their Potential Use in Biotechnology [Internet]. [cited 2017 May 30]. Available from: <http://www.atzlabs.com/pdf/ZalRousselot2014%20.pdf>
27. Chabasse C. Caractérisation des familles multigéniques des globines et des linkers codant l’hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina*, dans le cadre de la mise au point d’un substitut sanguin humain [Internet]. Paris 6; 2005. Available from: <http://hal.upmc.fr/tel-01114957>
28. Adaptations respiratoires des annélides polychètes de milieux abyssaux hypoxiques [Internet]. [cited 2017 Jul 5]. Available from: <http://hal.upmc.fr/tel-01115532/document>
29. Magazine FM UP’. UP Magazine - Hemarina : le ver marin prêt à révolutionner la santé [Internet]. [cited 2017 Jul 10]. Available from: <http://www.up->

magazine.info/index.php/le-vivant/bio-innovations/5377-le-ver-marin-pret-a-revolutionner-la-sante

30. CESIM SANTE. Un donneur de sang universel venu des mers [Internet]. (FUTEREMAG - Arte). Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=Q2LCb4Eromc>
31. Biochimie Structurale et Fonctionnelle - Pascale Bobillo - Coopérativité des liaisons [Internet]. [cited 2017 Jul 25]. Available from: <https://restice.univ-montp2.fr/BsfDun/co/cooperativite.html>
32. Stress oxydant, RMLg, 2007.pdf [Internet]. [cited 2017 Jul 26]. Available from: <http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/8914/1/Stress%20oxydant%2c%20RMLg%2c%202007.pdf>
33. Recherche d'inhibiteurs de la superoxyde dismutase à partir de substances naturelles [Internet]. [cited 2018 Nov 19]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01754826/document>
34. HEPES. In: Wikipédia [Internet]. 2018. Available from: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=HEPES&oldid=148542410>
35. Dr. Zal F, Rolland N. Etudes sur Arenicola marina et photos. 2019.
36. biomimexpo Hemarina - YouTube [Internet]. [cited 2018 Nov 14]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=oE0f-UdevXk>

37. Les vers marins, donneurs universels du sang du futur [Internet]. LExpress.fr. 2017 [cited 2018 Nov 14]. Available from: [https://www.lexpress.fr/actualite/societe/sante/les-vers-marins-donneurs-universels-du-sang-du-futur\\_1958897.html](https://www.lexpress.fr/actualite/societe/sante/les-vers-marins-donneurs-universels-du-sang-du-futur_1958897.html)
38. HEMARINA V2 1 - YouTube [Internet]. [cited 2018 Nov 14]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=CoukgITfN0c>
39. GERMAIN S. Ce ver marin à l'histoire de l'homme dans le sang. Ouest-Fr. 2018 Sep 25;2(La mer notre avenir Cahier n°2):8–9.
40. Etude OxyOp [Internet]. [cited 2017 May 30]. Available from: [http://www.sfnfdt.org/sn/PDF/epart/assoc/CJN/2016\\_brest/02\\_lemeur.pdf](http://www.sfnfdt.org/sn/PDF/epart/assoc/CJN/2016_brest/02_lemeur.pdf)
41. Hemarina - Actualités - HEMO2Life [Internet]. [cited 2018 Nov 15]. Available from: <http://www.hemarina.com/index.php?rub=actualites>
42. Dr. Zal F. Innovation bio-inspirée : la nature comme source de solutions durables [Internet]. 2018. Available from: <https://vimeo.com/265163002>
43. M101 du brevet à l'essai clinique [Internet]. [cited 2017 Aug 2]. Available from: <http://www.ouest-transplant.org/pdf/007.pdf>
44. Thèse de Mme. BOIRON Ophélie : Méthodes de conservation des organes en transplantation - 2016 [Internet]. [cited 2017 May 30]. Available from: <http://nuxeo.edel.univ-poitiers.fr/nuxeo/site/esupversions/daaaa0ae-2790-4f04-b7ce-63f4c88ebd14>

45. Valeurs biologiques usuelles humaines. Conseil Scientifique des Concours de l'Internat en Pharmacie; 2009.
46. Inserm. Origine et maîtrise des complications chez le receveur d'organe [Internet]. INSERM; [cited 2018 Nov 19]. Available from: [http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/92/Chapitre\\_15.html](http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/92/Chapitre_15.html)
47. Boulouard M. Cours 3 DFASP 1 - Système cardiovasculaire. 2015.
48. Fibrose rénale [Internet]. [cited 2018 Nov 21]. Available from: [http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/2565/1994\\_12\\_1263.pdf?sequence=1](http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/2565/1994_12_1263.pdf?sequence=1)
49. Demain, l'ischémie reperfusion en transplantation rénale [Internet]. [cited 2018 Nov 19]. Available from: <https://www.jmpg.fr/documents/2016/08-ischemie-reperfusion.pdf>
50. Progression et régression de la fibrose rénale [Internet]. [cited 2018 Nov 21]. Available from: [http://www.sfndt.org/sn/PDF/enphro/publications/actualites/2004/2004\\_07.pdf](http://www.sfndt.org/sn/PDF/enphro/publications/actualites/2004/2004_07.pdf)
51. Code de la santé publique - Article L665-3. Code de la santé publique.
52. Communiqué de presse : Greffe rénale : l'étude clinique multicentrique OxyOp destinée à évaluer l'utilisation du transporteur d'oxygène HEMO 2life ® se poursuit conformément au protocole établi [Internet]. [cited 2017 May 30]. Available from: [http://docs.wixstatic.com/ugd/5ccb0f\\_151389b25e2d4d35af532accc48ac798.pdf](http://docs.wixstatic.com/ugd/5ccb0f_151389b25e2d4d35af532accc48ac798.pdf)

53. Evaluation of a Marine OXYgen Carrier: HEMO2Life® for hypOthermic Kidney Graft Preservation, Before Transplantation (OXYOP) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2018 Nov 23]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02652520>
54. Nouvelles recommandations de l'EMA pour les études chez l'insuffisant rénal [Internet]. SiteGPR. 2016 [cited 2018 Nov 25]. Available from: <http://sitegpr.com/fr/nouvelles-recommandations-de-lema-pour-les-etudes-chez-linsuffisant-renal/>
55. MDRD-estimated GFR at one year post-renal transplant is a predictor of long-term graft function [Internet]. [cited 2018 Nov 25]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/08860220801947686>
56. CP Hemarina CHRU Brest\_resultats du premier essai clinique HEMO2life.pdf [Internet]. [cited 2018 Nov 25]. Available from: [http://www.hemarina.com/vars/fichiers/CP%20Hemarina%20CHRU%20Brest\\_resultats%20du%20premier%20essai%20clinique%20HEMO2life.pdf](http://www.hemarina.com/vars/fichiers/CP%20Hemarina%20CHRU%20Brest_resultats%20du%20premier%20essai%20clinique%20HEMO2life.pdf)
57. Orphanet : Neurofibromatose1 [Internet]. [cited 2018 Nov 29]. Available from: <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Neurofibromatose1-FRfrPub185.pdf>
58. Allotransplantation faciale : analyse de techniques chirurgicales par le Dr. Bouhanna [Internet]. [cited 2018 Nov 29]. Available from: <http://www.hopitalsaintlouis.org/theses/Bouhanna.pdf>

59. Le premier homme à se faire greffer un deuxième visage a bénéficié de l'hémoglobine de ver marin [Internet]. Sciences et Avenir. [cited 2018 Nov 29]. Available from: [https://www.sciencesetavenir.fr/sante/os-et-muscles/le-premier-homme-a-se-faire-greffer-un-deuxieme-visage-a-beneficie-de-l-hemoglobine-de-ver-marin\\_123163](https://www.sciencesetavenir.fr/sante/os-et-muscles/le-premier-homme-a-se-faire-greffer-un-deuxieme-visage-a-beneficie-de-l-hemoglobine-de-ver-marin_123163)
60. Plaies et pansements - HAS [Internet]. [cited 2018 Nov 29]. Available from: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-01/pansements\\_synthese\\_rapport.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-01/pansements_synthese_rapport.pdf)
61. German G. Cours 3 DFASP 2 - Dispositif médicaux - Plaies et escarres.
62. Améli.fr. Bien traiter les plaies chroniques [Internet]. [cited 2018 Nov 29]. Available from: <https://www.ameli.fr/infirmier/actualites/bien-traiter-les-plaies-chroniques>
63. VIDAL - Escarres, ulcères - Prise en charge [Internet]. [cited 2019 Mar 5]. Available from: [https://www.vidal.fr/recommandations/1782/escarres\\_ulceres/prise\\_en\\_charge/](https://www.vidal.fr/recommandations/1782/escarres_ulceres/prise_en_charge/)
64. Koechler S. Le miel dans la cicatrisation des plaies : un nouveau médicament ? [Limoges]; 2015.
65. Fiche de bon usage : traitement des plaies par pression négative - HAS [Internet]. [cited 2018 Dec 1]. Available from: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-02/fiche\\_de\\_bon\\_usage\\_traitement\\_des\\_plaies\\_par\\_pression\\_negative.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-02/fiche_de_bon_usage_traitement_des_plaies_par_pression_negative.pdf)

66. VAC : fermeture des plaies par pression négative - OCCETS [Internet]. [cited 2018 Dec 1]. Available from: [https://www.cadth.ca/media/pdf/221\\_vac\\_cetap\\_f.pdf](https://www.cadth.ca/media/pdf/221_vac_cetap_f.pdf)
67. Le parcours du pansement - reportage infirmière libérale [Internet]. [cited 2018 Dec 1]. Available from: [https://www.snitem.fr/sites/default/files/ckeditor/enquete\\_pansements\\_infirmiere\\_libera\\_magazine.pdf](https://www.snitem.fr/sites/default/files/ckeditor/enquete_pansements_infirmiere_libera_magazine.pdf)
68. Hemarina - Français - Pansement [Internet]. [cited 2018 Nov 29]. Available from: <http://www.hemarina.com/index.php?rub=pansement>
69. Prise en charge initiale blessé par explosion - Services de Santé des Armées [Internet]. [cited 2018 Dec 3]. Available from: [http://www.urgences-serveur.fr/IMG/pdf/2015\\_explo\\_daban.pdf](http://www.urgences-serveur.fr/IMG/pdf/2015_explo_daban.pdf)
70. In vivo biodistribution and oxygenation potential of a new generation of oxygen carrier\_Journal of Biotechnology.pdf [Internet]. [cited 2017 May 30].
71. Transporteurs d'oxygène « substituts sanguins » | CADTH.ca [Internet]. [cited 2018 Dec 3]. Available from: <https://cadth.ca/fr/transporteurs-doxygene-substituts-sanguins>
72. Transporteurs d'oxygène “ substituts sanguins ” - La lettre du Pharmacologue [Internet]. [cited 2018 Dec 5]. Available from: <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/3684.pdf>

73. Microcirculation and NO-CO Studies of a Natural Extracellular Hemoglobin Developed for an Oxygen Therapeutic Carrier [Internet]. [cited 2018 Dec 5]. Available from: [https://www.atzlabs.com/pdf/Tsai\\_et\\_al\\_2012\\_CDDT.pdf](https://www.atzlabs.com/pdf/Tsai_et_al_2012_CDDT.pdf)
74. Schumann-Bard P. PACES Mécanique des fluides. 2011.
75. Tsai AG, Cabrales P, Manjula BN, Acharya S, Winslow R, Intaglietta M. Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carrier. *Blood J.* 2006 Dec;108(10):3603–10.
76. Gauduchon P. Cours 1 DFASP 1 - Oncologie. 2015.
77. Dr. Géry B. Cours 1 DFASP 1 - Oncologie. 2016.
78. Moon-Massat P, Mullah SH-E-R, Abutarboush R, Saha BK, Pappas G, Haque A, et al. Cerebral Vasoactivity and Oxygenation with Oxygen Carrier M101 in Rats. *J Neurotrauma.* 2017 Oct 1;34(19):2812–22.
79. Garon D. DFGSP 2 - Biotechnologies. 2014.
80. Biotechnologies et médicaments [Internet]. [cited 2018 Dec 21]. Available from: <http://cidpharmef.org/fichiersession/download/6>
81. Institut National de Recherche et de Sécurité. Bioréacteurs : risque et prévention. 2016.
82. Dumas J, Robert B. Bioproduction de protéines thérapeutiques - Revue et perspectives. *médecine/sciences.* 2009 Feb 1;25:18–26.

83. société HEMARINA. 9h50 le matin [Internet]. Bretagne; 2017. Available from: [https://www.youtube.com/watch?v=Ctq\\_BIVadP8&feature=youtu.be](https://www.youtube.com/watch?v=Ctq_BIVadP8&feature=youtu.be)
84. Hemarina-HEM-B-Hemoxcell-Fr.1.1 [Internet]. [cited 2017 May 29]. Available from: <http://celld.com/documents-pdf/hemarina-HEM-B-Hemoxcell-Fr.1.1.pdf>
85. Thèse de Julien Robitaille : Modélisation dynamique de cultures de cellules CHO produisant un anticorps monoclonal en mode cuvée alimentée [Internet]. [cited 2019 Jan 9]. Available from: [https://publications.polymtl.ca/1714/1/2015\\_JulienRobitaille.pdf](https://publications.polymtl.ca/1714/1/2015_JulienRobitaille.pdf)
86. Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line [Internet]. [cited 2018 Dec 20]. Available from: <http://www.ascomed.cz/uploads/katalog/Hemarina%20Recombinant%20Protein.pdf>
87. Bleu de trypan [Internet]. [cited 2019 Jan 11]. Available from: <http://fracademic.com/dic.nsf/frwiki/1845924>
88. HEMOXCell brochure 05.2017 [Internet]. [cited 2019 Jan 14]. Available from: [http://www.hemarina.com/vars/fichiers/HEMOXCell%20brochure\\_052017.pdf](http://www.hemarina.com/vars/fichiers/HEMOXCell%20brochure_052017.pdf)
89. Hemarina - Eurobio : un partenariat pour la distribution d'HEMOXCELL - 21.05.2013 [Internet]. [cited 2019 Jan 15]. Available from: [https://www.tech-brest-iroise.fr/files/258/8\\_actualites\\_et\\_agenda/42\\_2013/44\\_actualit%c3%a9s/49\\_mai\\_juin/665\\_Hemarina\\_Eurobio\\_HEMOXCELL\\_FINAL\\_Mai21\\_2013.pdf](https://www.tech-brest-iroise.fr/files/258/8_actualites_et_agenda/42_2013/44_actualit%c3%a9s/49_mai_juin/665_Hemarina_Eurobio_HEMOXCELL_FINAL_Mai21_2013.pdf)

90. Projet HEMLYO [Internet]. [cited 2019 Jan 17]. Available from:  
[http://www.hemarina.com/vars/fichiers/Fiche\\_HEMLYO.pdf](http://www.hemarina.com/vars/fichiers/Fiche_HEMLYO.pdf)
91. @NatGeoFrance. France : double greffe de la face, histoire d'une prouesse médicale [Internet]. France : double greffe de la face, histoire d'une prouesse médicale | National Geographic. 2018 [cited 2018 Nov 29]. Available from:  
<http://www.nationalgeographic.fr/sciences/france-double-greffe-de-la-face-histoire-dune-prouesse-medicale>
92. Lycée Français d'Irlande 1ère Scientifique. Escarre - Cicatrisation [Internet]. l'Escarre. [cited 2018 Dec 1]. Available from:  
<http://tpeescarrelefenaro.weebly.com/cicatrisation.html>

## Annexe

---

Photo N°1 : *Arenicola marina* (14) :



Photo N°2 : Dispositif de transfert d'HEMO2Life® dans la solution de préservation (40)

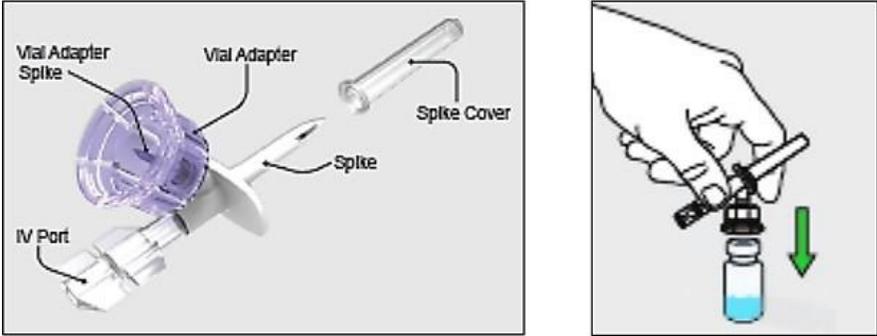
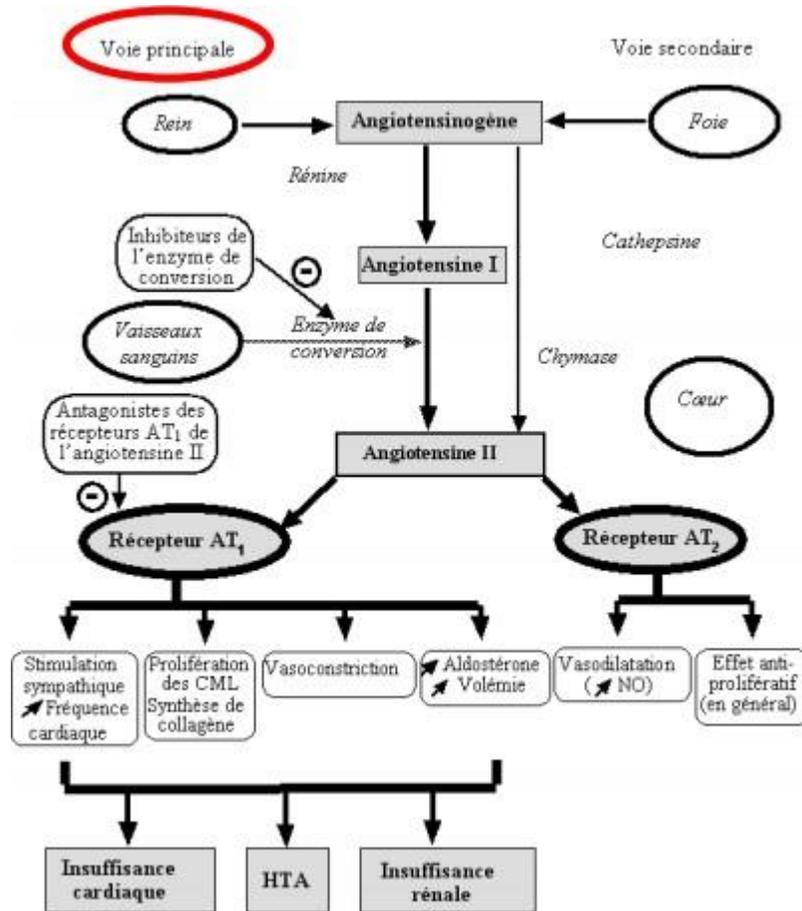
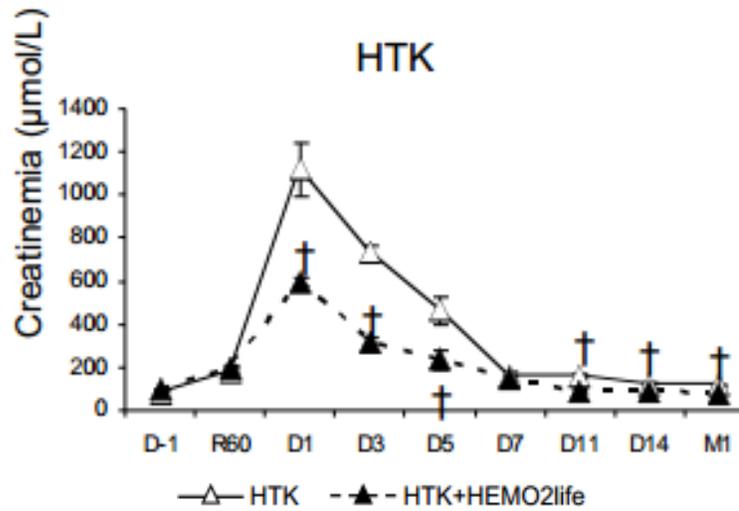


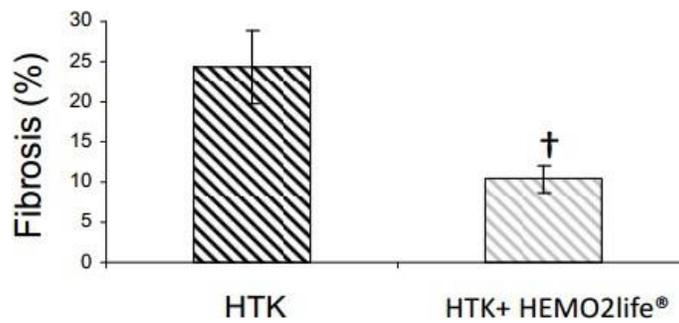
Schéma N°1 : Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (47)



Graphique N°1 : Evolution de la créatinémie ( $\mu\text{mol/L}$ ) chez des porcs transplantés après conservation des greffons dans la solution *HTK*<sup>®</sup> seule ou avec l'*AmHb* (40)



Graphique N°2 : Taux de fibroses rénale chez les porcs auto-transplantés par la solution *HTK*<sup>®</sup> ou par la solution *HTK*<sup>®</sup> avec *HEMO<sub>2</sub>Life*<sup>®</sup> (40)



Graphique N°3 : Coupe histologique de néphrons de porcs conservés soit dans la solution *HTK*<sup>®</sup> seule ou avec *HEMO<sub>2</sub>Life*<sup>®</sup> (40)

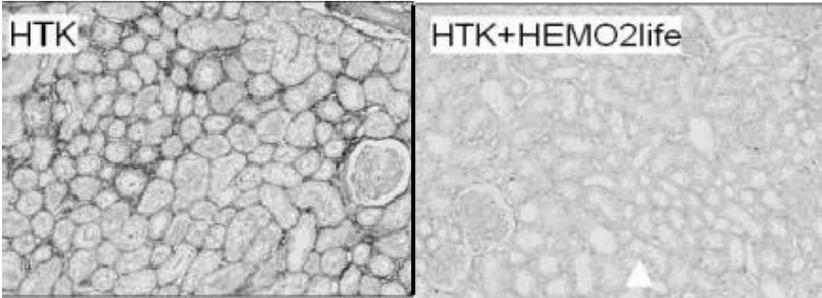


Photo N°3 : Evolution du visage de Jérôme.H (91)

Photo de gauche : visage affecté par la neurofibromatose.

Photo du milieu : suite de la première greffe totale du visage.

Photo de droite : suite de la seconde greffe totale du visage conservée avec HEMO<sub>2</sub>Life®.

[Image contenant des données à caractère personnel non communicable]

Photo N°4 : Mécanisme d'action du traitement par pression négative (92)

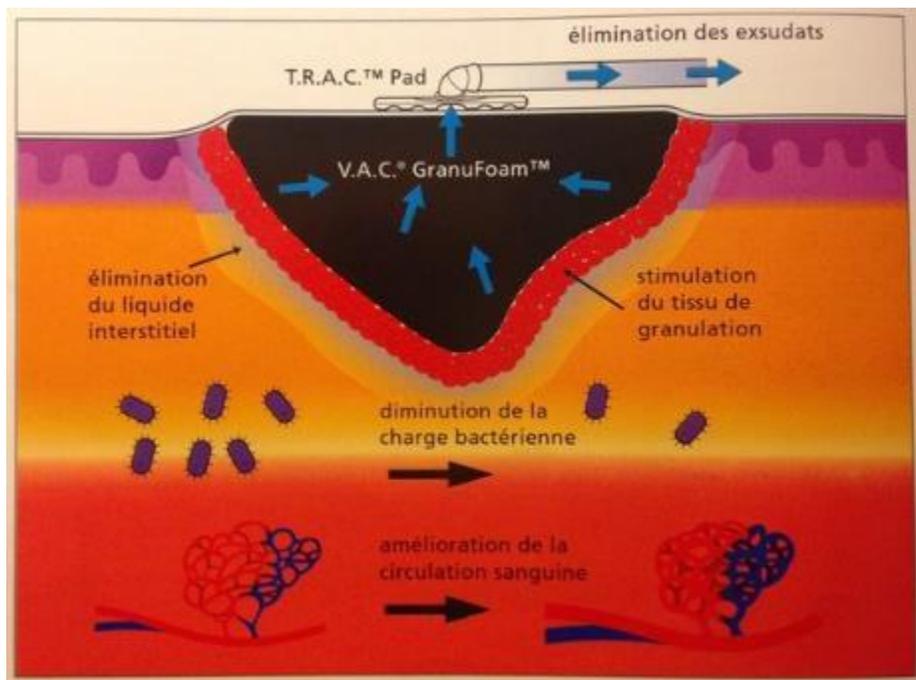
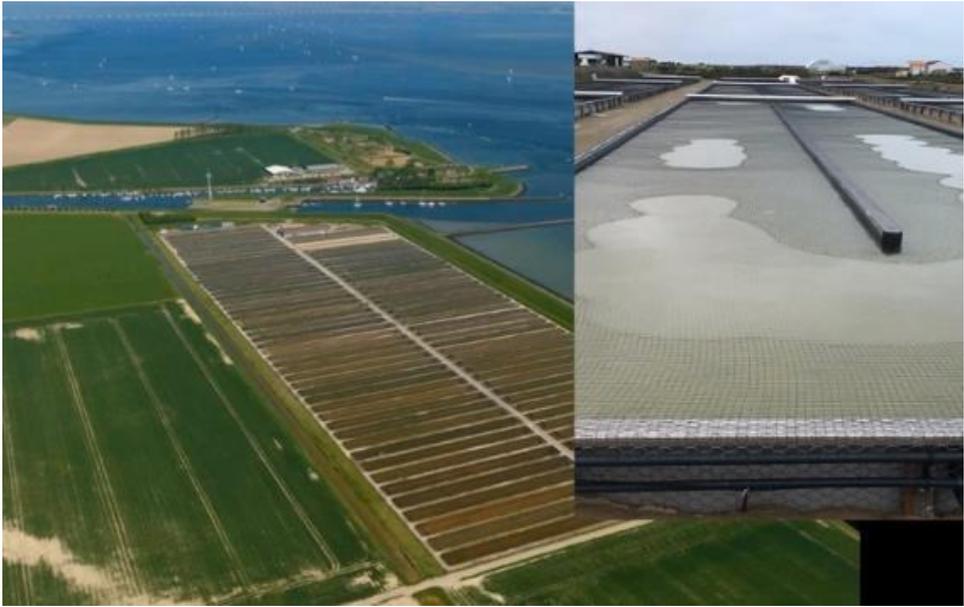


Photo N°5 : Vues extérieure et intérieure de la société HEMARINA (35)







UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE

**U.F.R. Santé**

**Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

---

**TITRE**

***Arenicola marina* : le nouvel espoir marin pour la santé publique**

---

**Résumé**

Le sang est reconnu depuis des millénaires comme étant indispensable à la vie. C'est grâce à lui que l'oxygène en particulier, et les nutriments sont transportés aux tissus et organes. Depuis quelques années, la recherche se tourne vers l'élaboration d'un substitut sanguin, capable de remplacer nos globules rouges lors de transfusions ou bien comme solution de conservation des greffons.

L'espérance de vie s'accroissant, les pathologies chroniques sont par conséquent de plus en plus fréquentes avec une augmentation des insuffisances rénales ou cardiaques. Malheureusement, plus de 50% des greffons ne peuvent pas être transplantés à cause d'une mauvaise conservation du fait de l'hypoxie et d'un laps de temps entre le prélèvement et la transplantation trop important. S'ajoutent à cela, les problèmes de compatibilité sanguine, le risque de transmission de pathologies infectieuses ou encore le manque de don de sang. Les essais réalisés avec des transporteurs d'oxygène à base d'hémoglobine de synthèse ont tous révélé un bénéfice risqué défavorable avec un nombre non négligeable d'effets secondaires importants.

Un ver marin, *Arenicola marina*, découvert par le Docteur Franck Zal, semble posséder les capacités de palier à l'ensemble de ces problèmes. En effet, son hémoglobine extracellulaire capable de transporter 156 molécules d'oxygènes est 50 fois plus « oxygénante » que la nôtre et peut être utilisée, dans de nombreux domaines dont la conservation des greffons, les pansements oxygénant, lors de traumatismes crâniens, de polytraumatismes, ou encore en tant que « booster » de cultures cellulaires, comme l'ont montré de nombreuses études que nous avons présentées.

---

Nom et Prénom de l'auteur : Lupo Joanna

Adresse de l'auteur : Université de Caen

**TITLE**

*Arenicola marina*: the new hope of public health

---

**Summary**

Since millennia, blood is known indispensable to life. It is thanks to this one, that oxygen mainly, and the nutrients are transported to tissues and organs. In recent years, research has turned to the development of a blood substitute, able to replace our red blood cells during transfusions or as a graft preservation solution.

As life expectancy increases, chronic diseases are therefore more and more frequent with an increase in renal or cardiac insufficiency. Unfortunately, more than 50% of the grafts cannot be transplanted because of poor storage due to hypoxia and a time lapse between taking and transplanting too much. Add to this the problems, blood compatibility, the risk of transmission of infectious diseases or the lack of blood donation. Tests conducted with synthetic haemoglobin-based oxygen transporters all revealed adverse risk benefit with significant adverse effects.

A marine worm, *Arenicola marina*, discovery by Doctor Franck Zal, seems to have the bearing capacity for all these problems. Its extracellular haemoglobin capable of transporting 156 molecules of oxygen is 50 times more "oxygenating" than ours and can be used in many areas including the conservation of grafts, oxygenating dressings, trauma brain injury, polytrauma, or as a "booster" of cell cultures, as shown by many studies that we have presented.

---

**Mots-clés**

*Arenicola marina* – oxygène – hémoglobine extracellulaire – greffe rénale

Nom et Prénom de l'auteur : Lupo Joanna

Adresse de l'auteur : Université de Caen