

UNIVERSITE DES ANTILLES ET DE LA GUYANE
Faculté de Sciences exactes et naturelles

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université des Antilles et de la Guyane
Spécialité : Sciences de la vie

Présentée et soutenue publiquement le 08 Juillet 2015

Par

Régine HIERSO

**IMPLICATION DU STRESS OXYDANT DANS LA
PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE : CRISES
VASO-OCCLUSIVES, TAUX D'ANTICORPS ANTI-BANDE 3
ET OXYDATION DU GLOBULE ROUGE**

JURY

Pr. Mariane De Montalembert
Pr. Mariano Ostuni

Rapporteur
Rapporteur

Dr. Marie-Dominique Hardy-Dessources
Dr. Marc Romana

Directrice de thèse
Directeur de thèse

« Se donner du mal pour les petites choses,
c'est parvenir aux grandes avec le temps »

Samuel Beckett

*A ma grand-mère, Matie :
Je suis persuadée que c'est toi qui guides mes ailes
quand parfois je ne sais plus où voler.*

Remerciements

Mener à terme une thèse est loin d'être un travail solitaire. C'est donc tout naturellement que je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à ceux qui m'ont accompagnée pendant mon aventure doctorale.

En premier lieu, je remercie mes directeurs de thèse, madame le **Docteur Marie-Dominique Hardy-Dessources** et monsieur le **Docteur Marc Romana**, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en m'acceptant dans leur équipe et en encadrant mes travaux de recherche. Je suis consciente de toutes les heures que vous avez consacrées à diriger cette recherche et à corriger ce mémoire. Marie-Dominique, Marc, je vous remercie pour vos précieux conseils, vos encouragements, votre bonne humeur, votre grande disponibilité et votre rigueur scientifique. Je mesure ma chance de vous avoir eu comme directeurs de thèse et vous en remercie encore, à l'infini.

Je tiens à vous remercier, madame le **Professeur Mariane De Montalembert** et monsieur le **Professeur Mariano Ostuni** de me faire l'honneur de juger ce travail de thèse et de vous compter parmi les membres du jury, en ce jour si important à mes yeux.

Je suis également ravie d'avoir travaillé avec le **Professeur Philippe Connes**. Merci Philippe pour nos collaborations, les astreintes nocturnes que tu as accepté d'assurer aux côtés de Marie-Dominique, Marc et moi. Tes grandes compétences, ton dynamisme, ton appui scientifique et tes conseils m'ont permis de progresser. Ta bonne humeur et ton sens de l'humour ont fait le reste.

J'adresse ma profonde gratitude aux **Docteurs Monique Decastel et Lisiane Kéclard-Christophe**. Votre aide précieuse pour la recherche d'un financement de fin de thèse m'a permis de terminer mes travaux de recherche en toute sérénité. Nos échanges, quelles qu'ils aient été, ont été très enrichissants.

Je remercie également **Marie-Laure Blondeau** pour nos discussions et notre complicité. Tes encouragements et tes petites attentions envers moi m'ont beaucoup touchée.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe que j'ai rencontrés au cours de ces années de thèse. Certains sont devenus des amis. Merci **Xavier Waltz** (pour notre collaboration et nos discussions), **Yann Lamarre** (pour tes conseils et tous tes « tuyaux »), **Rajae Talhaoui** (même à des milliers de kilomètres j'ai fréquemment une pensée pour toi), **Séverine Ferdinand** (pour tes idées sympathiques : les vendredi gourmets-gourmands, les restaurants, les sorties qui me permettaient quelques moments d'évasion), **Kizzy-Clara Cita** (notre bonne entente, notre complicité et notre soutien mutuel m'ont

souvent reboostée. Merci ma Bouboune), **Lyza Hery** (t'avoir eu comme stagiaire a été un véritable plaisir), **Yohan Garnier** (je retiens de toi ton sérieux et ton côté taquin), **Laura Brudey** (pour ton aide précieuse quand j'étais en « STRESS »), **Keyne Charlot** (« Bibiche », pour ton sens de l'humour, tes bons conseils, ton aide pour les astreintes et le projet STRESS), **Bérénike Mockesch** (pour nos échanges plaisants), **Stella Ilise** (je retiens de toi ta douceur, ta discrétion et tes taquineries), **Vanessa Hachon** (je garde en tête tous les bons moments que l'on a passé et tes encouragements), **Suly Rambinaising** (j'ai rarement vu plus espiègle et plus rieur que toi), **Julien Hira** (pour tes attentions et ton soutien) et **Célia Cavas** (pour ton implication dans ce projet et nos nombreuses discussions).

En intégrant l'équipe Inserm de Guadeloupe, je n'aurais pu espérer mieux.

J'exprime ma sincère reconnaissance à **tous les patients drépanocytaires**, qui nous font confiance et acceptent de participer à nos projets de recherche. Soyez assurés que nous mettons tout en œuvre pour améliorer votre quotidien et alléger vos souffrances.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux membres du service des Urgences du CHU de Pointe-à-Pitre : **Docteur Patrick Portecop, Docteur Serge Ferracci**, messieurs **Lucien Jean-Denis et Claude Chilin** cadres de santé, aux infirmiers et aide-soignants. Merci d'avoir accepté de modifier le fonctionnement de votre service en y intégrant ce projet de recherche.

Mes pensées vont vers les docteurs **Maryse Etienne- Julian, Nathalie Lemonne, et Marie-Billaud** de l'Unité Transversale de la Drépanocytose. Je mesure la charge de travail supplémentaire que vous a procuré ce projet STRESS. Merci pour votre disponibilité, votre investissement et toutes vos indications me permettant de mener à bien mes travaux de recherche.

J'en profite également pour remercier les infirmières **Brigitte Guyonnet et Nathalie Negrit**, pour avoir prélevé patiemment tous les patients drépanocytaires inclus dans mon projet et pour tous nos échanges. Je remercie évidemment tous les autres membres de l'UTD : **Patrick, Alix, Géranie, Sylvie, Yohan**. Sans oublier **Joha, Sandrine, Karine** (je n'oublie pas que tout est arrivé suite à une discussion avec toi). **Loïc**, ma mention spéciale t'est destinée.

A **Marie-Laure Lalanne-Mistrih**. Pour ton implication et pour tout ce que tu as fait. Tu t'es battue pour ce projet de recherche, tu l'as aidé à voir le jour. Sois en ici profondément remerciée.

Vanessa Tarer et Benoît Tressières, merci pour votre rigueur, votre organisation et votre disponibilité. Vous m'avez été d'une aide précieuse.

A **Isabel Marcelino**. Merci de m'avoir laissé utiliser tant de fois les équipements du CIRAD. Merci pour ta sympathie et de tes précieux conseils pour m'aider à améliorer mes western-blots.

A **Rinaldo** et **Ada**. Mes parents cubains, une des meilleurs choses qui me soient arrivées au cours de cette aventure est de vous avoir rencontrés. Vous êtes des gens formidables, soyez assurés de ma reconnaissance et de ma grande tendresse à votre égard.

A ma famille : **Maman, Papa, Joëlle, Xavier, tonton Bruno**. Pour vos encouragements, pour avoir cru en moi plus que moi-même, pour toutes ces choses, grandes ou petites, qui font de moi ce que je suis aujourd'hui. Pour votre intérêt et votre écoute active même quand le langage scientifique vous dépassait parfois. Pour votre amour inconditionnel.

Maman, cette thèse est également la tienne. Trouve ici le résultat de ton soutien immense. Sans toi, rien n'aurait été pareil. **Joëlle**, maintenant tu es une pro du stress oxydant et de la vaso-occlusion. Tu aurais même pu m'aider à écrire ce mémoire.

A **Tony**. Tu m'encourages tous les jours à aller plus loin, plus haut. Je te remercie du fond du cœur.

Pour leur présence et leur soutien, je remercie chaudement mes amis : **Lyonel** (merci de t'être investi dans cette thèse du mieux que tu as pu et de m'avoir accompagnée dans les moments difficiles. J'aurais dû accepter tes nombreuses propositions pour mener cette thèse à ma place et rédiger mon mémoire), **Loïc** (comme d'habitude nous avons vécu les mêmes choses, au même moment, même à des milliers de kilomètres), **Noémie, Slaye, Valérie, Jessica, Coralie, Axelle, Joëlle, Maité**.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à la **Région Guadeloupe** pour la bourse doctorale qu'elle a bien voulu m'accorder pendant trois ans pour mener mon projet de thèse. Je suis également très reconnaissante pour les aides financières que le **Club Soroptimist** (Club de Pointe-à-Pitre), l'association **Carest**, l'association **Guadeloupe Espoir Drépanocytose**, la **Semsamar** et la **Fondation Semsamar Solidarités** m'ont octroyée pendant les derniers mois pour finaliser mes travaux de recherche. Merci du fond du cœur pour cette main que vous m'avez tendue.

Au moment où j'écris ces remerciements, une vague de nostalgie m'envahit. Un chapitre s'achève pour laisser place à un autre...

Sommaire

Abréviations	9
Avant-propos	12
REVUE DE LA LITTERATURE	13
I. La drépanocytose : généralités	14
I.1. Historique.....	15
I.2. Epidémiologie et distribution géographique	16
A. Dans le monde	16
☐ Drépanocytose et paludisme.....	17
☐ Les haplotypes drépanocytaires.....	18
B. En Guadeloupe	20
I. 3. Les syndromes drépanocytaires	21
II. Mécanisme primaire de la pathologie : polymérisation de l'hémoglobine.....	23
II.1. Structure et fonction de l'hémoglobine humaine.....	23
☐ Expression des gènes globines au cours du développement.....	24
☐ Localisation des gènes de l'hémoglobine	25
II. 2. Polymérisation : caractéristiques de l'hémoglobine S.....	26
A. Structure du polymère	26
B. Cinétique de polymérisation	27
☐ Effets de l'hémoglobine F	29
II.3. Conséquences de la polymérisation.....	29
A. Anomalies structurales du globule rouge drépanocytaire.....	30
☐ Altérations des lipides	30
☐ Altérations des protéines	31
B. Anomalies fonctionnelles	35
☐ Déshydratation du globule rouge.....	35
☐ Anomalies hémorhéologiques	36

III. Une physiopathologie complexe : de nombreux acteurs.....	40
III. 1. Adhérence cellulaire : interactions cellulaires.....	40
A. Interactions entre globules rouges et cellules endothéliales	40
B. Interactions cellulaires entre leucocytes et cellules endothéliales	43
C. Intervention des plaquettes	43
D. Interaction entre cellules circulantes	44
D. Activation cellulaire	45
□ Phénotype pro-inflammatoire.....	45
□ Phénotype pro-coagulant.....	46
□ Microparticules: témoins de l'activation cellulaire	47
III. 2. Anomalies du tonus vasculaire.....	50
A. Le monoxyde d'azote	50
B. L'endothéline-1	51
C. Anomalies du métabolisme du NO et de l'ET-1 dans la drépanocytose	52
III. 3. Hémolyse intravasculaire	53
III. 4. Oxydation tissulaire.....	54
IV. Le stress oxydant : acteur majeur de la physiopathologie.....	56
IV. 1. Les espèces réactives de l'oxygène.....	56
IV. 2. Les sources du stress oxydant dans la drépanocytose	59
A. L'auto-oxydation de l'hémoglobine	59
B. Xanthine oxydase.....	60
C. NADPH oxydase	61
D. Autres sources	62
IV. 3. Le système de défense anti-oxydant.....	63
A. Systèmes anti-oxydants enzymatiques	63
□ Les Superoxydes Dismutases (SOD).....	63
□ La catalase	64
□ Les glutathion peroxydases	65

B. Systèmes anti-oxydants non enzymatiques.....	66
V. Les manifestations de la drépanocytose	68
V. 1. Phénotype hémolytique avec dysfonction endothéliale.....	68
V. 2. Phénotype hyper-visqueux et vaso-occlusif	70
VI. Crises vaso-occlusives et stress oxydant.....	74
VI. 1. Adhérence	74
VI. 2. Autres altérations : Déshydratation, anomalies hémorhéologiques, émission de MPs	76
VII. Crises vaso-occlusives et implication du système nerveux autonome dans la drépanocytose.....	79
VIII. Stratégies thérapeutiques	81
VIII.1. Le dépistage néonatal et l'éducation thérapeutique.....	81
VIII. 2. Traitements préventifs des infections, traitements antalgiques et transfusion sanguine	81
VIII.3. La greffe de moelle.....	83
VIII. 4. L'hydroxyurée	83
VIII.5. Les anti-oxydants.....	84
TRAVAUX DE RECHERCHE	86
I. Objectif et mise en place de l'étude	87
II. Matériels et méthodes	89
RESULTATS	97
Etude 1 : Impact du stress oxydant sur la rhéologie sanguine des patients drépanocytaires	98
Etude 2 : Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la drépanocytose : crises vaso-occlusives, taux d'anticorps anti-bande 3 et oxydation du globule rouge.....	107
RESULTATS ADDITIONNELS	136
Etude des paramètres hémorhéologiques chez les patients drépanocytaires SS.....	137
Etude de l'activité du système nerveux autonome (SNA) chez les patients drépanocytaires SS.....	140
Evaluation du processus d'oxydation de la protéine bande 3 chez les patients drépanocytaires SS...	144
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	148
Références	155

Abréviations

α : alpha

β : beta

ε : epsilon

γ : gamma

ζ : zeta

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AOPP : Advanced oxidation protein products

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIDG : Centre Intégré de la Drépanocytose en Guadeloupe

CVO : Crise Vaso-Occlusive

DCF : 2,7- Dichlorofluoresceïne

DCFH-DA : 2,7-Dichlorofluoresceine-diacetate

DTNB : acide 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoïque

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique

ET-1, ET-2 et ET-3: endothéline 1, 2 et 3

ETA et ETB : récepteurs de l'endothéline-1

FITC : fluorescein-isothiocyanate

GSH : Glutathion réduit

GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

GR : Globule Rouge

GSSG : Glutathion oxydé

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

Hb A : Hémoglobine Adulte normale

Hb F : Hémoglobine Fœtale

Hb S : Hémoglobine anormale (*S* : *Sickle*)

HF : Haute fréquence

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IAP : Integrin-Associated Protein

Ig G : Immunoglobuline G

Inserm : Institut national de la santé et de la recherche médicale

LF : Basse fréquence (Low frequency)

LORCA : Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser

min : minute

mL : millilitre

MLCP : Myosin-Light-Chain Phosphatase

mm : millimètre

MPO : myeloperoxidase

MPs : Microparticules

ng : nanogramme

NO : Monoxyde d'azote

NOS : Oxyde nitrique synthase

NTB : nitroblue tetrazolium

NTBI : non-transferrin-bound serum iron

O_2^- : anion superoxyde

$OH^\cdot$: radical hydroxyle

ONOOH : nitroperoxyde

Pa : Pascal

PC : PhosphatidylCholine

PE : PhosphatidylEthanolamine

PE-AV : Phycoérythrine couplée à l'annexine V

PH : Potentiel Hydrogène

PS : PhosphatidylSérine

PVP : polyvinylpyrrolidone

ROS : Reactive Oxygen Species / Espèces réactives de l'oxygène

Sec : seconde

SM : SphyngoMyéline

SNA : Système Nerveux Autonome

SOD : Superoxyde Dismutase

STA : Syndrome Thoracique Aigu

TBHP : T-Butyl-HydroPeroxyde

TSP-1 : Thrombospondine 1

TNF α et TGF β : facteur de nécrose tumorale α et β

VFC : Variabilité de la Fréquence Cardiaque

Avant-propos

La drépanocytose, encore appelée anémie falciforme, est une maladie génétique qui, en raison de sa fréquence et de sa gravité, est un problème de santé publique dans de nombreuses régions. En Guadeloupe et en Martinique, on dénombre 12% de transmetteurs, 1 nouveau-né drépanocytaire sur 300 et environ 2000 patients drépanocytaires sur ces deux territoires.

Cette maladie monogénique grave, caractérisée par une grande variabilité d'expression, une physiopathologie complexe et des moyens thérapeutiques pauvres, suscite de très nombreuses interrogations et est au cœur d'une recherche intense. En dépit des progrès réalisés, la drépanocytose reste toujours associée à une morbidité et une mortalité significatives.

Les crises vaso-occlusives constituent le syndrome le plus handicapant de la maladie, du fait de leur caractère imprévisible et aléatoire. Le plus souvent de nature ostéo-articulaire chez l'adulte, elles sont associées à des douleurs intenses et sont de fréquences variables. Cependant, il n'existe pas de paramètres biologiques ou cliniques permettant d'établir un diagnostic prédictif précoce de leur sévérité. Les données de la littérature indiquent que les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le déclenchement des crises vaso-occlusives sont complexes et l'étiologie de cette complication reste encore largement incomprise. A partir du défaut premier de la drépanocytose, la polymérisation de l'hémoglobine S, se développe toute une série de processus anormaux qui contribuent au développement d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydant dus à une reperfusion traumatisante, et à l'auto-oxydation de l'hémoglobine S.

Le globule rouge est une des cibles des espèces réactives de l'oxygène générées au cours du stress oxydant. Celles-ci entraînent de sévères défauts au niveau de sa membrane et de nombreuses anomalies fonctionnelles, susceptibles de participer au déclenchement de la vaso-occlusion.

Les travaux de cette thèse ont pour objectif une meilleure compréhension de la physiopathologie extrêmement complexe de la drépanocytose en étudiant le rôle du stress oxydant dans le déclenchement des crises vaso-occlusives, première cause d'hospitalisation des sujets drépanocytaires. A terme, les différentes approches mises en œuvre devraient conduire à de nouvelles pistes thérapeutiques et à une amélioration de la prise en charge des patients.

REVUE DE LA LITTERATURE

I. La drépanocytose : généralités

La drépanocytose est une maladie héréditaire monogénique autosomale récessive touchant en premier lieu les globules rouges (GR). C'est une hémoglobinopathie causée par une mutation ponctuelle du gène β -globine situé sur le chromosome 11. Cette mutation unique résulte de la transversion Adénine→Thymine au niveau du 17^e nucléotide de l'ADNc affectant le 6^{ième} codon de la chaîne β -globine. Elle entraîne le remplacement de l'acide glutamique en position 6 par une valine (β 6Glu→Val) et la synthèse d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S (Hb S).

La valine hydrophobe, contrairement à l'acide glutamique, provoque un changement de conformation de l'Hb S lors de la désoxygénation des globules rouges. La baisse de la pression partielle en oxygène provoque la diminution de la solubilité de l'hémoglobine, liée à la polymérisation de la désoxy-Hb S. La valine augmente l'interaction hydrophobique entre les tétramères d'Hb S et favorise la formation de fibres tubulaires. Ces fibres ne sont pas sans conséquence pour les globules rouges : ce sont elles qui leur confèrent leur forme de faucille, distorsion mécanique caractéristique de la maladie.



Figure 1 : Un globule rouge falciformé et trois globules rouges de forme normale

Les GR perdent alors leur élasticité et ne sont plus capables de se déformer pour traverser les micro-vaisseaux sanguins qui ont un diamètre inférieur à leur diamètre. Rigides, ils restent bloqués dans les capillaires sanguins et les obstruent, ce qui entraîne des ischémies locales et

des crises vaso-occlusives particulièrement douloureuses dont la répétition entraîne des risques d'atteinte grave des différents organes.

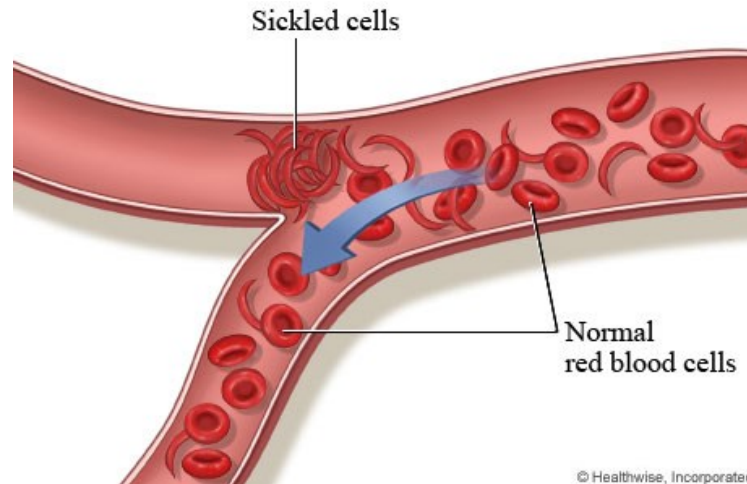


Figure 2 : Obstruction des vaisseaux sanguins par les globules rouges falciformés

Les GR rigidifiés sont également plus fragiles, entraînant une hémolyse de ces cellules à l'origine de l'anémie chronique symptomatique présentée par la majorité des patients drépanocytaires.

I.1. Historique

Le premier article scientifique sur la drépanocytose est apparu il y a plus de 100 ans. En 1910, le cardiologue James Herrick décrit le premier cas de drépanocytose en rapportant la présence de globules rouges adoptant une forme de faucille au niveau du frottis sanguin d'un jeune patient caribéen. Le bilan hématologique de ce patient montre une anémie très prononcée (Herrick, 1910).

Quelque temps après, le cas d'une autre patiente, présentant également cette déformation des globules rouges, met en évidence la transmission héréditaire de la maladie. En effet, lors d'analyses plus poussées, la falciformation des globules rouges est retrouvée dans le frottis sanguin de son père (Cook & Meyer, 1915).

En 1927, Hahn et Gillepsie font une découverte intéressante, ils remarquent que la déformation des globules rouges n'a lieu que lorsque la pression en oxygène dans le sang

est inférieure à 50 mm de mercure. De plus, cette déformation est réversible par l'augmentation de la pression en oxygène (Hahn & Gillespie, 1927). Dès 1940, un étudiant en médecine, Sherman, suggère même qu'un bas niveau en oxygène altère la structure de l'hémoglobine dans la cellule (Sherman, 1940).

En 1949, James Neel démontre que la transmission de cette maladie est mendélienne (Neel, 1949). La même année, Linus Pauling montre qu'elle est due à une structure anormale de l'hémoglobine, caractérisée par une moindre solubilité (Pauling & Itano, 1949). C'est ainsi la première fois que l'on découvre l'origine moléculaire d'une maladie génétique.

Dans les années 60, on démontre que le gène de la chaîne β -globine est situé sur le chromosome 11. En 1957 le Britannique Vernon Ingram montre que la drépanocytose est due à un remplacement sur le codon 6 d'un acide glutamique par une valine au niveau de la globine β S (Ingram, 1957).

En 1978, Tom Maniatis isole le gène de la β -globine (Lawn, Fritsch, Parker, Blake, & Maniatis, 1978). Deux ans plus tard, Yuet Wai Kan met au point un test génétique prénatal de la drépanocytose (Kan, Trecartin, & Dozy, 1980). Cette grande avancée dans l'identification moléculaire des causes de la maladie permet ainsi aux parents malades ou transmetteurs de la drépanocytose d'établir un diagnostic précoce quant au génotype de l'enfant à naître.

I.2. Epidémiologie et distribution géographique

A. Dans le monde

La drépanocytose représente la maladie génétique la plus répandue au monde, touchant des millions de personnes.

Initialement, la drépanocytose était retrouvée dans les régions endémiques pour le paludisme : Afrique sub-saharienne, bassin méditerranéen (notamment en Grèce et en Italie), Moyen-Orient et certaines parties du sous-continent indien et dans la péninsule Arabique (Haldane, 1949) (Labie, 2010) (Piel et al., 2010).

Suite à d'importants mouvements des populations, la drépanocytose s'est étendue indépendamment du paludisme, principalement le long des côtes orientales des Amériques, dans les Caraïbes et en Europe de l'Ouest (Piel, 2013).

Les flux migratoires récents ont également fait de la drépanocytose la première maladie génétique en France hexagonale (Roberts & de Montalembert, 2007).

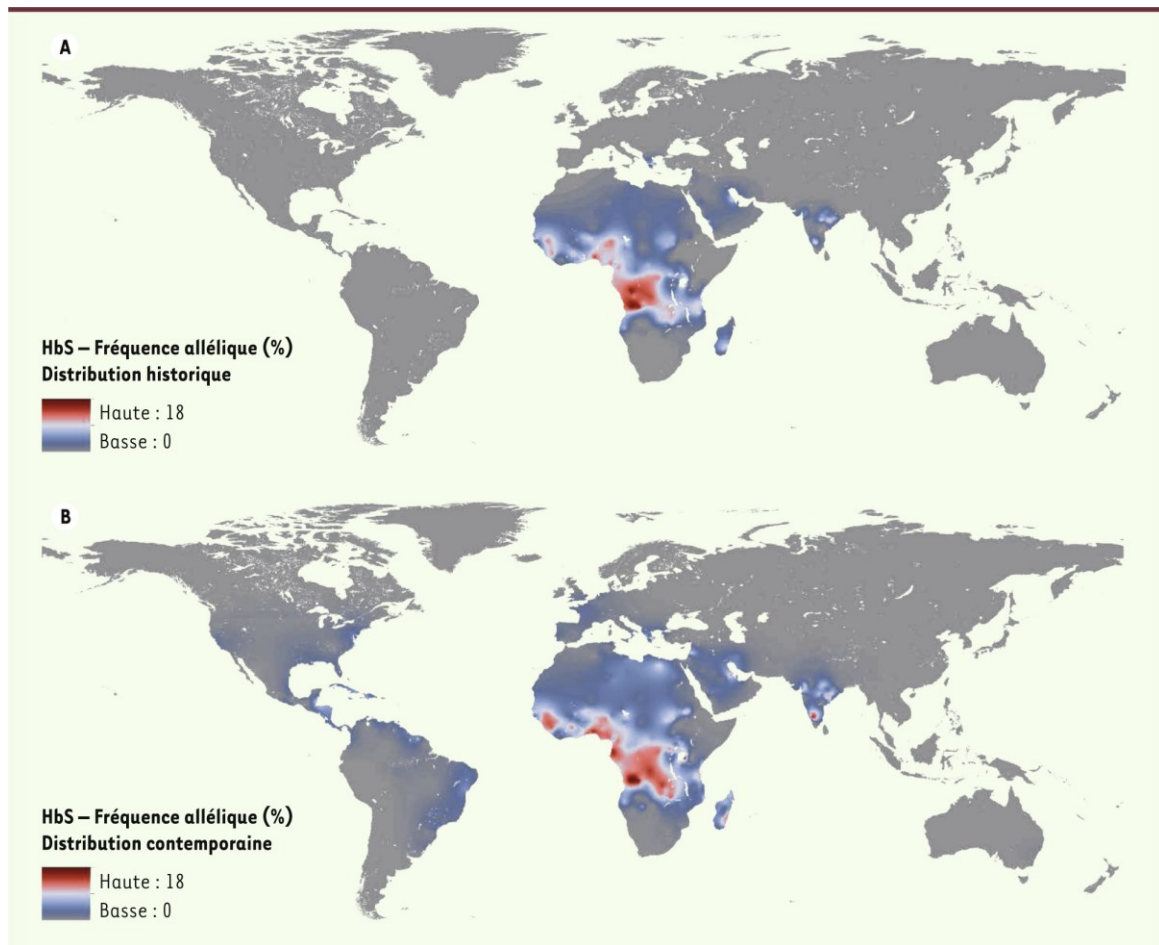


Figure 3 : Distribution historique et contemporaine (2010) de la drépanocytose
(Piel et al., 2010)

✓ Drépanocytose et paludisme

Le paludisme aussi appelé malaria est une maladie infectieuse due à un parasite du genre *Plasmodium*, propagée par la piqûre de certaines espèces de moustiques anophèles.

Comparant les cartes de répartition de la malaria d'une part et de la drépanocytose d'autre part, Haldane fut frappé par leur ressemblance (Lederberg, 1999). Une telle coïncidence suggérait que l'hémoglobine S pouvait apporter un avantage dans les régions où la malaria était présente. En effet, si les personnes ayant deux allèles du gène β^S (β^S / β^S) meurent de la drépanocytose, celles qui n'en ont qu'un (β^A / β^S) résistent mieux au paludisme que celles qui n'en ont aucun (β^A / β^A) (Aidoo et al., 2002) (Hill et al., 1991) (Willcox et al., 1983).

Il semblerait donc que les porteurs du trait drépanocytaire soient protégés contre le paludisme. En effet, d'après des études réalisées *in vitro*, l'invasion, la croissance et le développement du parasite *Plasmodium falciparum* responsable des formes graves du paludisme seraient plus difficiles dans les GR AS par rapport aux GR AA (Friedman, 1978) (Pasvol, Weatherall, & Wilson, 1978). D'autres études suggèrent que les GR AS infectés par le parasite palustre falciformeraient et seraient détruits prématurément au niveau de la rate (Roth et al., 1978) (Shear et al., 1993).

Ainsi, la fréquence de la drépanocytose serait élevée dans les populations africaines soumises à une forte pression du paludisme en raison de l'avantage sélectif des porteurs du trait drépanocytaire AS, permettant la pérennisation du gène β^s dans les régions impaludées.

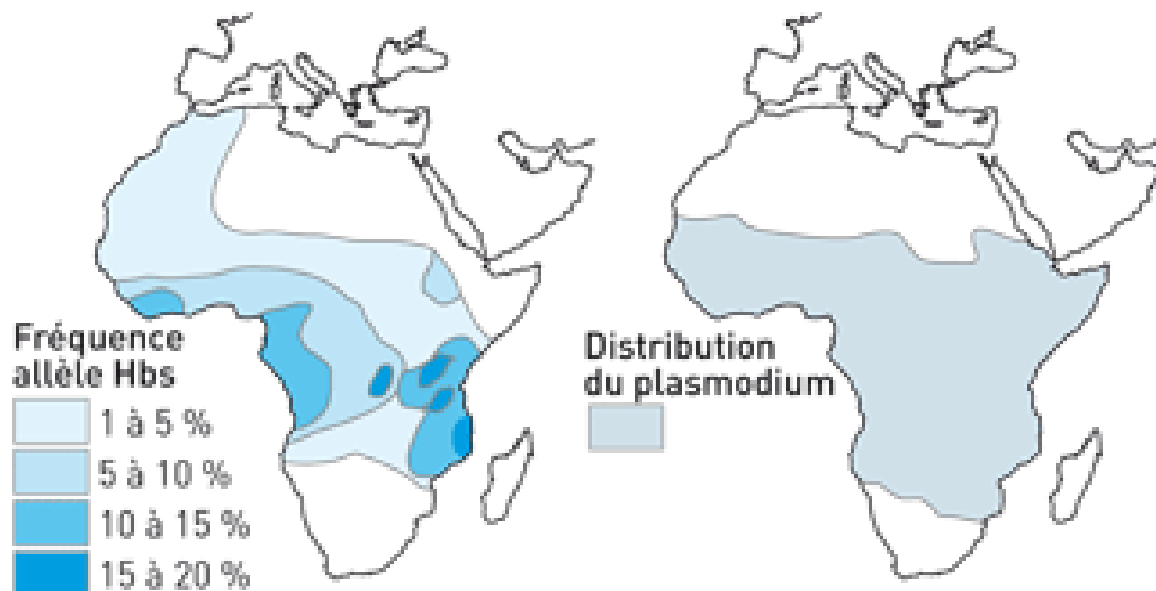


Figure 4 : Comparaison de la répartition géographique de la drépanocytose et du paludisme

✓ Les haplotypes drépanocytaires

Un haplotype est un groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble. Les haplotypes permettent aux généticiens de chercher les gènes associés à une maladie (Y. C. Chang, Smith, Moore, Serjeant, & Dover, 1995).

Dans les régions inter-géniques du locus β globine, des variations de la séquence nucléotidique, sans conséquence pathologique, ont été décrites. Elles sont désignées sous le

terme de polymorphisme lorsqu'elles ont une fréquence supérieure à 1%. Certaines modifications portant sur des sites spécifiquement reconnus par certaines enzymes de restriction, sont faciles à révéler par cartographie génique et ont été les premières étudiées. L'association non aléatoire de plusieurs polymorphismes définit un haplotype (Kan & Dozy, 1978).

Dans la drépanocytose, cinq haplotypes majeurs liés au gène β^S , à forte spécificité géographique dans l'ancien monde, ont été décrits:

- Bénin, dans la région centrale de l'Afrique de l'Ouest
- Sénégal, dans la région atlantique de l'Afrique de l'Ouest
- Bantou, dans l'Afrique Centrale ou Equatoriale
- Cameroun, dans le groupe ethnique Eton du Cameroun
- Arabo-indien, dans le sous-continent indien et dans la péninsule Arabique

La distribution géographique de ces différents haplotypes indique une apparition de la mutation S en cinq endroits différents. De nombreux travaux suggèrent que l'haplotype peut être un marqueur de l'hétérogénéité phénotypique des patients drépanocytaires (Green, Fabry, Kaptue-Noche, & Nagel, 1993) (Nagel & Labie, 1989) (Nagel et al., 1987) (Ragusa et al., 1988) (Steinberg et al., 1995) (J. J. Thomas, Kutlar, Scott, & Lanclos, 1998). En effet, certains haplotypes sont associés à des formes plus sévères, c'est le cas de l'haplotype bantou. La forme la plus modérée est associée à l'haplotype arabo-indien.

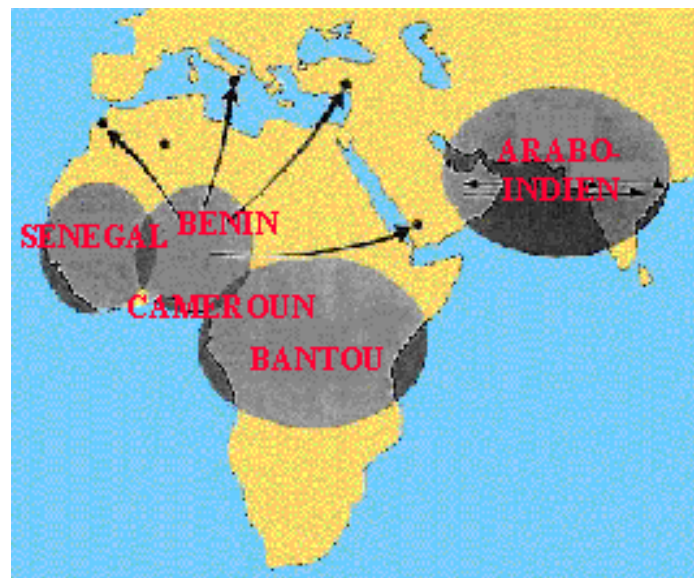


Figure 5 : La drépanocytose est associée à cinq haplotypes

Une étude réalisée sur des patients drépanocytaires a permis d'établir la distribution des haplotypes liés au gène β^S dans la population guadeloupéenne (Kéclard, 1996) : haplotype Bénin (72,6%), haplotype Bantou (13%), haplotype Sénégal (8%), haplotype Cameroun (2,5%), haplotype Arabo-indien (0,2%) et atypiques (3,7%).

B. En Guadeloupe

La Guadeloupe, département français d'Outre-Mer, est composée d'environ 90% d'afro-caribéens, de 8% de populations d'origine indienne et de 2% d'origine européenne ou libano-syrienne.

L'apport important des peuples d'Afrique et le métissage expliquent toutes les composantes génétiques de la drépanocytose : de la forme homozygote SS aux formes hétérozygotes composites (SC, S β -thalassémique, SD Punjab) et aux autres formes rares (HbS^{Antilles}) (Monplaisir et al., 1986) (Saint-Martin et al., 2013). Selon l'étude de Saint-Martin et collaborateurs, environ 1 enfant sur 304 serait atteint d'un syndrome drépanocytaire majeur (Saint-Martin et al., 2013).

En 1984, un test de dépistage néonatal systématique est mis en place (Saint-Martin et al., 2013). C'est le premier test de dépistage développé au niveau national.

En 1990, le Conseil Général de la Guadeloupe reconnaît officiellement la drépanocytose comme une priorité de santé publique et permet la création du Centre Intégré de la Drépanocytose de la Guadeloupe (CIDG), devenu Centre Caribéen Guy Mérault en 1996, puis Unité Transversale de la Drépanocytose du CHU de Pointe-à-Pitre en 2007. Il est le premier en France à instaurer un programme de prise en charge globale (médicale et sociale) couplé à la seule unité Inserm d'Outre-Mer dont les travaux de recherches sont axés sur la drépanocytose.

D'autres centres ont par la suite été créés en France métropolitaine et en Outre-mer, sur le modèle de la Guadeloupe, formant un réseau de centres nationaux de référence et de compétence régionale par le Ministère Français de la Santé. On estime le nombre de personnes drépanocytaires dans l'archipel guadeloupéen à 1200 dont 3/4 sont suivis par l'Unité Transversale de la Drépanocytose.

I. 3. Les syndromes drépanocytaires

Au-delà de la drépanocytose homozygote SS, la plus répandue et ayant la symptomatologie la plus sévère, la maladie s'exprime également sous d'autres formes associant la présence de l'allèle S avec un deuxième allèle muté du gène β -globine. Nous retrouvons ainsi les autres types de syndromes drépanocytaires suivants :

- S/C : hétérozygotie composite la plus fréquente. Elle résulte d'une mutation ponctuelle du codon 6 se traduisant par le remplacement d'un acide glutamique par une lysine au niveau du gène β -globine (β^C).
- S/ β^0 -thalassémie : le gène β -thalassémique n'est pas exprimé et les symptômes sont similaires à ceux d'un homozygote SS.
- S/ β^+ -thalassémie : le gène β thalassémique est partiellement exprimé et la sévérité des symptômes dépend en partie du taux d'Hb A résiduel.

Plus rarement, nous retrouvons les hétérozygoties composites ci-dessous :

- SD Punjab : symptomatique, l'hémoglobine D Punjab résulte d'une mutation sur le codon 121. Un acide glutamique est remplacé par une glutamine.
- On peut également citer les cas d'hétérozygotes composites SE ou SEpore qui correspondent respectivement à une hémoglobine anormale associée à un phénotype thalassémique et à une globine résultant d'un crossing - over anormal entre les gènes δ - et β - globine.

Enfin, d'autres variants plus rares associent une deuxième mutation en *cis* de la mutation β^S :

- S Oman : présente une deuxième mutation ponctuelle sur le codon 121 entraînant le remplacement d'un acide glutamique par une lysine.
- S Antilles : résulte d'une deuxième mutation ponctuelle sur le codon 23. Une valine est remplacée par une isoleucine.

Les sujets hétérozygotes dits AS sont porteurs et transmetteurs du gène drépanocytaire mais sont asymptomatiques , ils ne présentent pas les complications de la maladie.

<u>GENOTYPES</u>	<u>CARACTERISTIQUES</u>
SS	Homozygote SS
SC SD Punjad SO Arab	Gène β^S associé à un variant qualitatif du gène β -globine
S β^0 thalassémie S β^+ thalassémie S $\delta\beta$ thalassémie SE S Lepore	Gène β^S associé à un variant quantitatif du gène β -globine
AS Oman AS Antilles	Syndrômes drépanocytaires dominants
SC Antilles SC Harlem	Autres

Figure 6 : Les différents syndromes drépanocytaires

II. Mécanisme primaire de la pathologie : polymérisation de l'hémoglobine

II.1. Structure et fonction de l'hémoglobine humaine

Les globines constituent une famille de protéines impliquées dans le transport ou le stockage du dioxygène. L'hémoglobine adulte normale, dissoute dans le cytosol aqueux des érythrocytes en une solution très concentrée, assure le transport du dioxygène des poumons vers les tissus. Un globule rouge humain de 7 à 8 μm , contient environ 280 millions de molécules d'hémoglobine.

Chaque molécule d'hémoglobine est un tétramère formé par l'association de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes alpha composées chacune de 141 acides aminés et deux chaînes bêta de 146 acides aminés. Chacune des chaînes adopte une conformation spatiale lui conférant une forme globuleuse et ménageant une « poche » superficielle dans laquelle se trouve logée l'hème. Ce dernier est constitué d'une porphyrine complexée à un atome de fer à qui permet la fixation réversible de l'oxygène.

La cohérence du tétramère d'hémoglobine résulte de liaisons entre les chaînes latérales hydrophobes via des acides aminés situés à la périphérie de chaque globine.

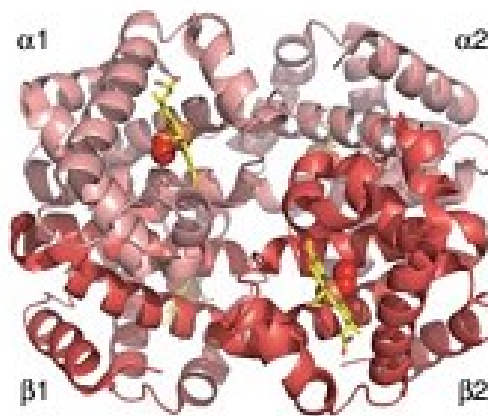


Figure 7 : Schématisation de la molécule d'hémoglobine

✓ Expression des gènes globines au cours du développement

Il existe diverses formes d'hémoglobines exprimées à différents stades de l'ontogénèse. On distingue ainsi les formes embryonnaires, fœtales et adultes.

Au début de la vie embryonnaire, les chaînes ζ et ϵ se combinent pour former l'hémoglobine Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), les chaînes α et ϵ s'associent pour former l'hémoglobine Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) et les chaînes ζ et γ forment l'hémoglobine Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Avant la naissance, les hématies du fœtus contiennent de l'hémoglobine fœtale (Hb F) ($\alpha_2\gamma_2$), qui reste néanmoins majoritaire au cours des premiers mois après la naissance. Puis, les hématies contiennent de l'hémoglobine adulte A ($\alpha_2\beta_2$) très largement majoritaire (97%), de l'hémoglobine A₂ ($\alpha_2\gamma_2$) (2%) et de l'Hb F (moins de 1%). Les hémoglobines F, A et A₂ assurent le transport du dioxygène, de la surface respiratoire (placenta pour le fœtus, alvéoles pulmonaires après la naissance) jusqu'aux cellules.

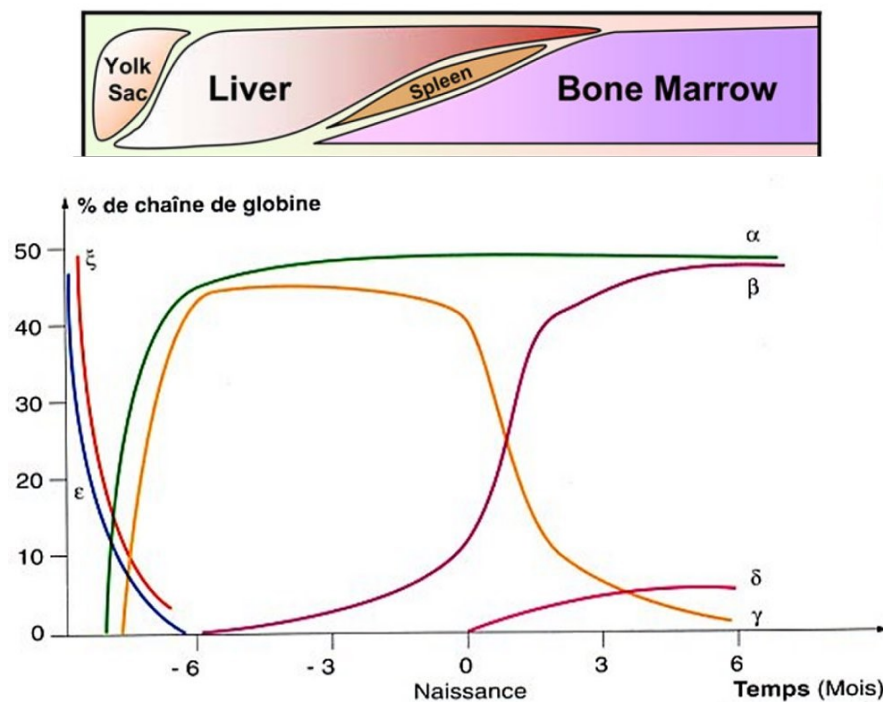


Figure 8 : Expression des gènes globines au cours du développement
(Sankaran, Xu, & Orkin, 2010)

✓ Localisation des gènes de l'hémoglobine

Les gènes de type alpha-globine sont regroupés sur le chromosome 16 et les gènes de type bêta-globine sur le chromosome 11 chez l'homme.

Dans le groupe alpha, le gène qui code pour la chaîne embryonnaire ζ précède, dans le sens 5' vers 3', les deux gènes des chaînes α , composants des hémoglobines fœtales et des hémoglobines adultes.

Dans le groupe bêta, le gène de la chaîne embryonnaire ϵ est suivi par les deux gènes des chaînes fœtales γ puis par les deux gènes des chaînes adultes δ et β .

L'organisation des gènes de globine humains le long des chromosomes correspond, dans le sens 5' 3', à l'ordre dans lequel ils sont exprimés au cours du développement.

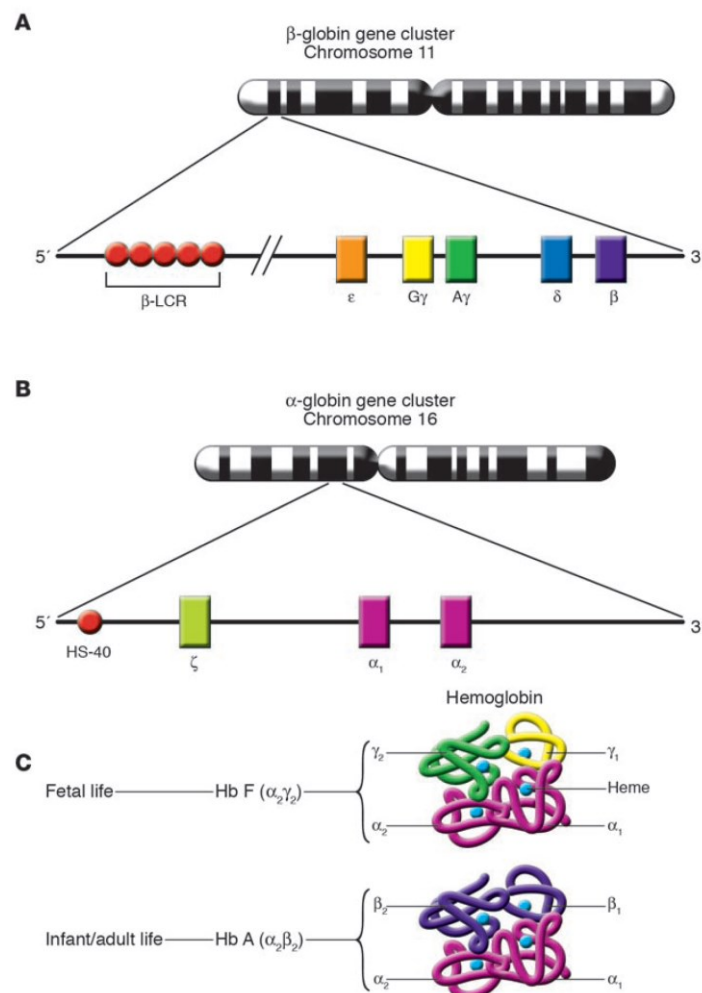


Figure 9 : Organisation chromosomique des clusters de gènes β et α globine

(Frenette & Atweh, 2007)

II. 2. Polymérisation : caractéristiques de l'hémoglobine S

A. Structure du polymère

On explique la polymérisation de l'Hb S par le fait que l'acide glutamique normalement hydrophile est remplacé par une valine hydrophobe en position 6 de la β -globine. En condition désoxygénée, des interactions hydrophobes ont lieu entre la leucine 88 et la phénylalanine 85 d'une chaîne beta d'une molécule d'hémoglobine et la valine 6 de la chaîne beta de la molécule d'hémoglobine voisine (Murayama, 1966), d'où la création d'une structure cristalline en fibres.

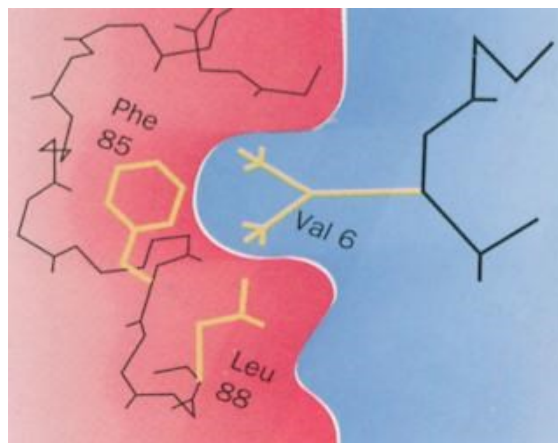


Figure 10 : Contact entre deux molécules d'hémoglobine voisines

Au niveau des hématies, cela se traduit par une falciformation marquée par une diminution de leur déformabilité, propriété essentielle pour cette cellule devant circuler dans les vaisseaux sanguins de diamètre inférieur au sien.

Des études par diffraction de rayons X ont permis de déterminer la structure du polymère et son mécanisme de formation (Wishner, Ward, Lattman, & Love, 1975). Ces spectres de diffractions de cristaux d'Hb S indiquent qu'au-delà de la valine $\beta 6$ de l'Hb S qui joue un rôle déterminant dans la formation de ce polymère, de très nombreux autres sites de l'hémoglobine sont également impliqués dans les contacts stabilisant le polymère. Ainsi, en condition désoxygénée, les molécules d'hémoglobine s'assemblent en structures fibreuses tubulaires formées de filaments de 1 à 15 μm de long (Harris, 1950). Ces associations d'Hb S peuvent

prendre des formes différentes (tiges, cristaux, microtubules). Un polymère d'Hb S comprend 7 paires de brins d'Hb S de forme hélicoïdale conduisant aux structures fibreuses tubulaire de 17 à 21 nm de diamètre.

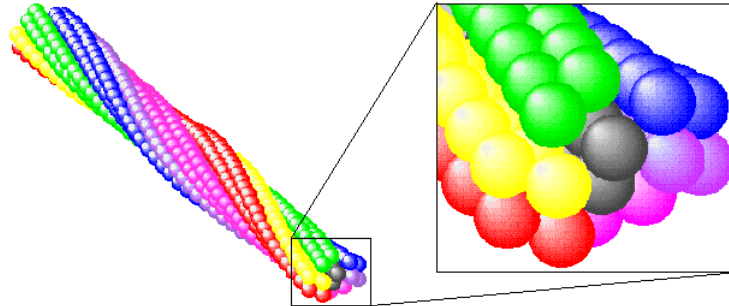


Figure 11 : Structure hélicoïdale d'un polymère d'hémoglobine S

(Dykes, Crepeau, & Edelstein, 1979)

La polymérisation de l'hémoglobine est un processus inhabituel et très complexe. Elle est provoquée par trois conditions:

- 1) Une basse pression en dioxygène qui favorise une prédominance de déoxy-Hb S, la seule forme d'Hb S présentant le site complémentaire à la chaîne hydrophobe de la valine, et donc qui favorise le phénomène de polymérisation.
- 2) Une forte concentration en Hb S qui favorise bien évidemment les contacts entre molécules ainsi que leurs interactions.
- 3) Une température élevée, témoignant d'une forte agitation thermique, qui favorise également la polymérisation.

B. Cinétique de polymérisation

Outre les conditions précédemment citées, il existe un délai préalable à la formation des polymères d'Hb S (Hofrichter, Ross, & Eaton, 1974) (Mozzarelli, Hofrichter, & Eaton, 1987). C'est le temps nécessaire pour qu'un certain nombre de molécules s'assemblent pour amorcer le processus.

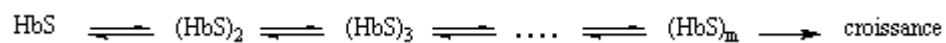
Ce temps de latence noté t_d , dépend des trois conditions énumérées précédemment selon la formule empirique suivante :

$$\frac{1}{t_d} = k \left(\frac{c_t}{c_s} \right)^n$$

où c_t est la concentration totale en Hb S avant précipitation, c_s la solubilité d'Hb S mesurée une fois la précipitation achevée et où k et n sont des constantes. Expérimentalement, k vaut environ 10^{-7} et n varie entre 30 et 50, ce qui fait que ce processus de polymérisation est un de ceux qui dépendent le plus de la concentration en Hb S.

Le processus général de polymérisation de l'Hb S pourrait se dérouler selon deux mécanismes:

1) La germination homogène: si la concentration en Hb S est suffisamment élevée, les molécules s'agrègent petit à petit pour former enfin un germe composé de m molécules :



Ces agrégats ne sont vraiment stables que lorsque le germe s'est enfin formé. Ce germe croît ensuite pour former une fibre de polymère d'HbS.

Le temps de latence t_d est le temps nécessaire à la formation de ce germe.

2) La germination hétérogène : dès qu'une fibre est formée, elle peut faciliter la germination d'autres molécules d'Hb S, jusqu'à la formation d'une autre fibre. Ce processus de polymérisation est donc autocatalytique.

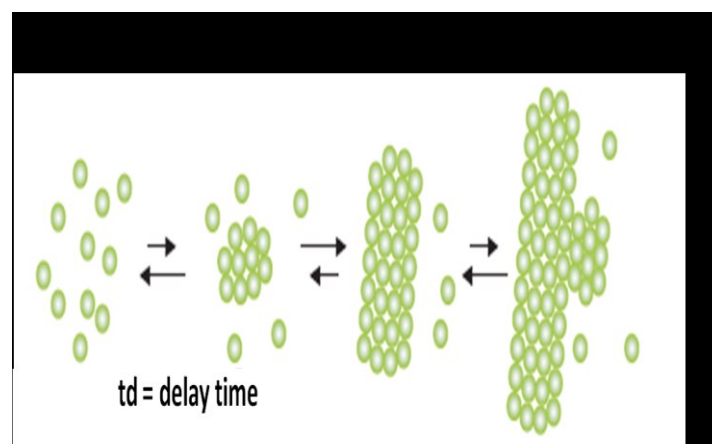


Figure 12 : Etapes de formation des polymères d'hémoglobine S
(Vekilov, 2007)

Ainsi, les conditions de début de polymérisation constituent un facteur limitant mais, une fois lancé, ce processus est extrêmement rapide.

Comme la polymérisation de l'Hb S est un processus coopératif qui demande un certain délai d'initiation, il y a une course de vitesse entre le temps de passage du globule rouge dans les capillaires et le temps de polymérisation qui transforme le globule rouge flexible en une cellule rigide susceptible de rester bloquée dans les vaisseaux. Cet aspect de la cinétique de la réaction peut expliquer pourquoi l'anémie falciforme se caractérise par des crises épisodiques, causées par des troubles de la circulation sanguine dus aux blocages de certains vaisseaux sanguins par les globules rouges falciformés, par les amas de fibres d'Hb S. Cependant, ces fibres se dissolvent automatiquement par oxygénation. Les artères étant des territoires vasculaires riches en oxygène, les globules rouges non irréversiblement falciformés y sont absents. De plus, une légère augmentation de la concentration c_t ou une légère baisse de la solubilité c_s (qui peuvent être dues à une déshydratation, à un manque d'oxygène ou à la fièvre) peuvent aboutir à une baisse significative du temps de précipitation t_d et ainsi causer une crise vaso-occlusive, qui ne fait qu'empirer la situation en réduisant le débit sanguin et le taux d'oxygène du sang.

✓ Effets de l'hémoglobine F

L'Hb F a la propriété d'inhiber la polymérisation de l'Hb S en s'intercalant dans le polymère de désoxy-hémoglobine S, inhibant ainsi la progression de la formation des fibres d'Hb S et diminuant de ce fait la rigidité cellulaire (Ngo et al., 2012) (Sebastiani et al., 2008).

Une étude récente (Bhagat, Patra, & Thakur, 2012) a démontré qu'une augmentation du taux d'Hb F chez des patients drépanocytaires SS était associée à une diminution significative de l'inflammation et de la peroxydation lipidique, démontrant ainsi le rôle bénéfique et protecteur de l'hémoglobine fœtale dans la maladie.

II.3. Conséquences de la polymérisation

Suite aux épisodes répétés de polymérisation de l'Hb S et de falciformation, la membrane du globule rouge est sujette à des altérations structurales engendrant des anomalies fonctionnelles du globule rouge et des altérations de sa capacité d'écoulement dans les vaisseaux sanguins.

A. Anomalies structurales du globule rouge drépanocytaire

✓ Altérations des lipides

Les lipides de la membrane du globule rouge jouent un rôle important dans son organisation propre et dans ses échanges avec le plasma. Les phospholipides qui en représentent le principal composant, sont disposés en une structure en double couche. La répartition des lipides dans la double couche n'est pas homogène : la sphingomyéline (SM) et la phosphatidylcholine (PC) sont retrouvés dans le feuillet externe, la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS) dans le feuillet interne (Zachowski, Favre, Cribier, Hervé, & Devaux, 1986). Le maintien de cette asymétrie est assuré par un complexe enzymatique transmembranaire :

- la Translocase ou Flippase : assure le transport de la PS et de la PE de la couche externe vers la couche interne. Son action est inhibée par l'augmentation des ions Ca^{2+} .
- la Floppase : transporte les phospholipides de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane de façon non spécifique.
- la Scramblase : permet le mouvement bidirectionnel des phospholipides dans la bicouche lipidique.

La PS, normalement enfouie dans le feuillet interne de la bicouche lipidique, est externalisée durant la sénescence des GR et les processus d'apoptose. Dans la drépanocytose, les cycles de falciformation/défalciformation provoquent aussi une externalisation de la PS. Les macrophages reconnaissent spécifiquement la PS à la surface des cellules et les éliminent de la circulation (Fadok et al., 1992) (Fadok, de Cathelineau A, Daleke, Henson, & Bratton, 2001) (Callahan, Williamson, & Schlegel, 2000) (R. F. Zwaal & Schroit, 1997), (R. F. A. Zwaal, Comfurius, & Bevers, 2005). L'externalisation de la PS est susceptible de favoriser la survenue de thromboses (Chiu, Lubin, Roelofsen, & van Deenen, 1981) par l'activation de facteurs de coagulation. Elle participe également à l'augmentation des interactions GR SS – cellules endothéliales (B. N. Y. Setty, Kulkarni, & Stuart, 2002), favorisant l'adhérence des GR à l'endothélium vasculaire via la TSP-1 mais aussi via un récepteur spécifique à la PS exprimé à la membrane des cellules endothéliales (Manodori, Barabino, Lubin, & Kuypers, 2000) (B. N. Y. Setty & Betal, 2008).

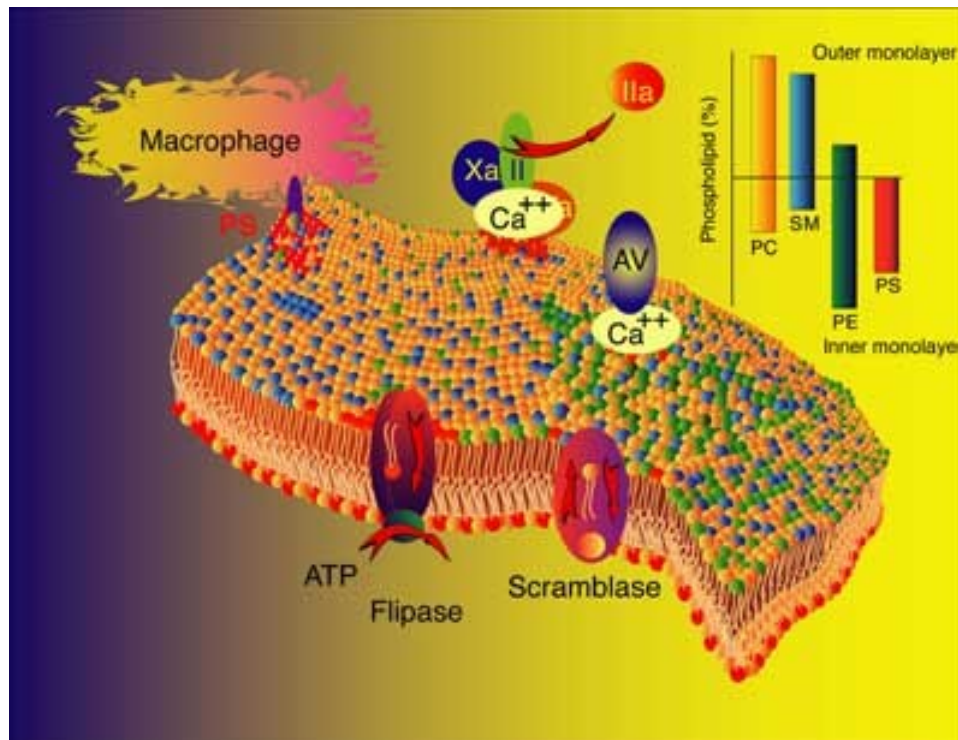


Figure 13 : Les perturbations de la bicouche lipidique de la membrane du globule rouge drépanocytaire

La PS est reconnue par les macrophages et par l'annexine V (AV)

✓ Altérations des protéines

Les protéines de la membrane des globules rouges humains peuvent être regroupées, de façon générale, dans deux grands groupes :

- Les protéines de la membrane érythrocytaire

Les protéines membranaires exercent diverses fonctions telles que le transport, l'adhérence avec les cellules circulantes mais aussi les cellules endothéliales, ou encore des rôles de récepteur de signalisation.

- Parmi les protéines membranaires assurant des fonctions de transport, nous pouvons citer l'aquaporine, la protéine Glut-1, la rhAG, la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, Ca^{++} ATPase, les cotransporteurs $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$, $\text{Na}^+\text{-K}^+$, $\text{K}^+\text{-Cl}^-$, et la protéine bande 3.

La protéine bande 3 est une protéine échangeuse d'anions transmembranaire. Elle doit son nom à sa position sur un gel d'électrophorèse et est présente sous la forme d'un dimère composé de deux sous unités identiques qui traversent chacune la membrane au moins une douzaine de fois. La protéine bande 3 sert de canal pour le passage passif des ions bicarbonate

et des ions chlorure de part et d'autre de la membrane érythrocytaire (Hunter, 1977). Il s'agit d'un rôle clé dans le mécanisme général de transport du CO₂ (Hamasaki, 2006). En effet, quand le sang circule dans les tissus, le dioxyde de carbone se dissout dans le plasma et se dissocie selon l'équation suivante :



Les ions bicarbonates (HCO₃⁻) pénètrent dans la cellule en échange des ions chlorures qui quittent la cellule. Dans les poumons où la concentration en dioxygène est importante, la réaction inverse a lieu. En plus de sa fonction biologique majeure, la protéine bande 3 représente également un site de fixation de plusieurs protéines périphériques telles que l'aldolase, la bande 6, la bande 4.2, la glycophorine A et l'ankyrine via sa queue cytoplasmique et joue un rôle majeur dans l'interaction entre la membrane et le cytosquelette comme indiqué ci - dessous.

De nombreux travaux de recherche ont été consacrés à la caractérisation d'une interaction entre l'hémoglobine et la bande 3 (Cassoly, 1983) (Chu, Breite, Ciraolo, Franco, & Low, 2008) (Low, 1986) (Walder et al., 1984) (Weber et al., 2004).

L'interaction entre les deux protéines semblent être dépendante de l'oxygène, puisque la désoxy-hémoglobine montre une affinité beaucoup plus grande pour la protéine bande 3 que l'oxy-hémoglobine (Campanella et al., 2008). Il semblerait que le domaine N-terminal de la protéine bande 3 s'insérerait à travers la cavité de fixation du 2, 3-DPG au milieu du tétramère de désoxy-hémoglobine, où les résidus 12-23 de la protéine bande 3 établiraient un contact majeur le long des parois de la désoxy-hémoglobine (O'Donnell, Mandaro, Schuster, & Arnone, 1979) (Richard, Dodson, & Mauguén, 1993).

- D'autres protéines sont impliquées dans l'adhérence cellulaire. C'est le cas des protéines VLA4, CD36, ICAM-4 et Lu.

- Les protéines du cytosquelette érythrocytaire :

La spectrine et l'actine constituent le réseau filamenteux protéique principal du squelette membranaire.

La protéine 4.1 stabilise l'association spectrine-actine et représente un premier point d'attache du squelette membranaire sur la face interne de la membrane par interaction avec la glycophorine C.

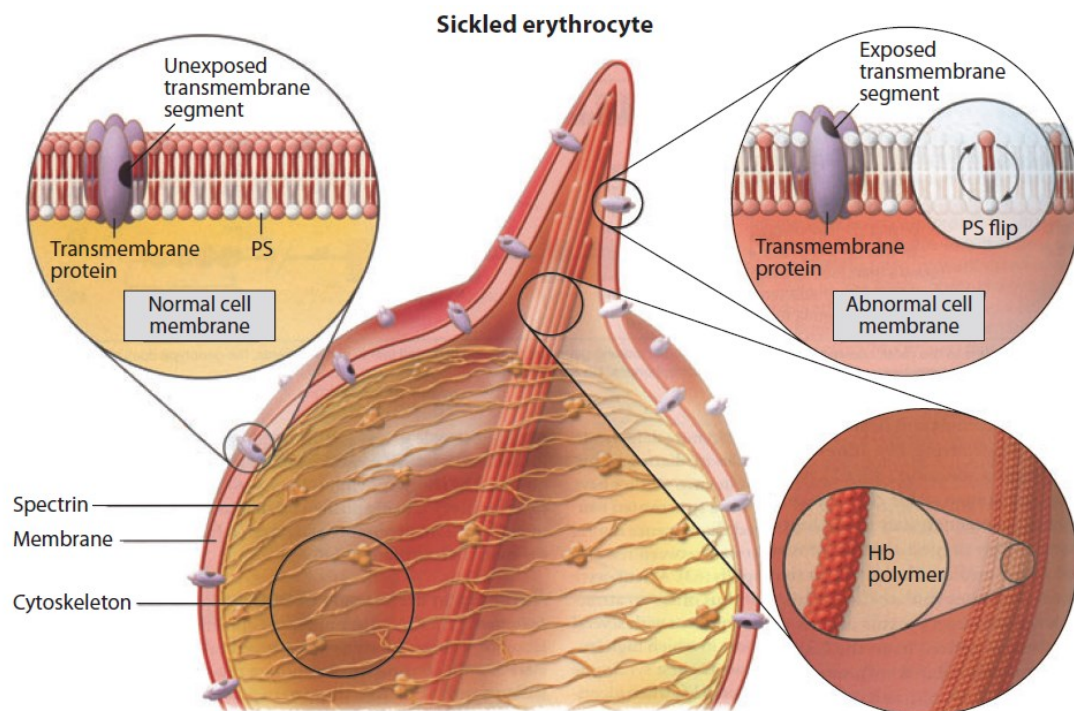
L'ankyrine (bande 2.1) a pour rôle majeur l'ancrage du squelette membranaire sur la face interne de la double couche lipidique grâce à sa fixation d'une part sur la chaîne de spectrine et d'autre part sur le fragment cytoplasmique de la bande 3.

D'autres protéines telles que l'adducine, la tropomoduline, la tropomyosine et la dématine sont également retrouvées.

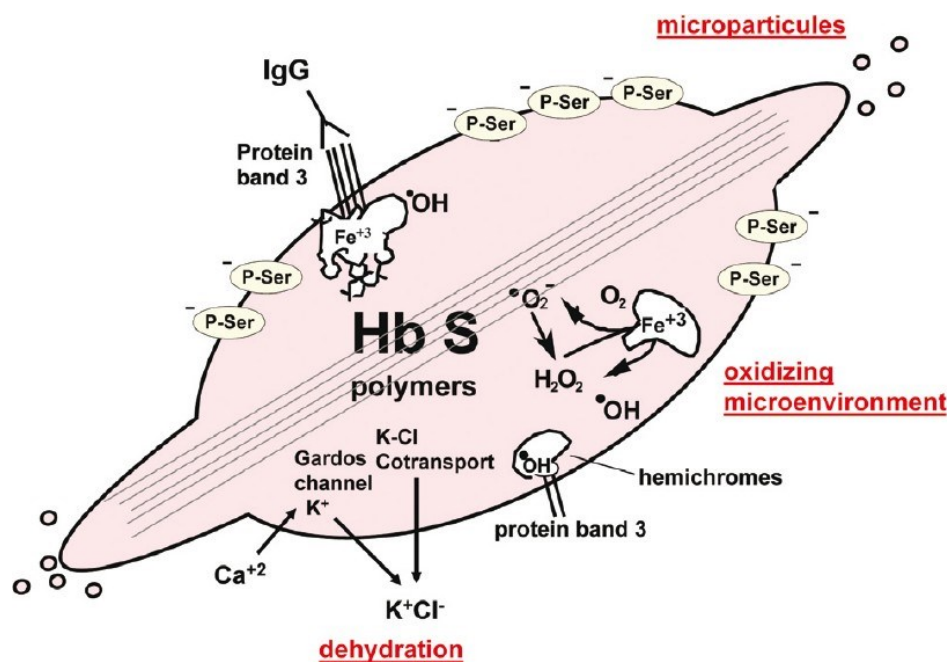
Figure 14 : Représentation schématique de la membrane du globule rouge
(An & Mohandas, 2008)

durée de vie réduite des GR drépanocytaires (R P Hebbel, Eaton, Balasingam, & Steinberg, 1982) (Nagababu, Fabry, Nagel, & Rifkind, 2008) (Rifkind & Nagababu, 2013).

En condition physiologique, les interactions protéines/protéines ou protéines/lipides sont étroitement régulées par des phosphorylations. Dans la drépanocytose, on retrouve une perturbation du niveau de phosphorylation soit augmenté (pour la protéine bande 3) soit diminué (pour la spectrine et l'ankyrine), altérant l'intégrité de la membrane érythrocytaire, provoquant une dissociation du squelette érythrocytaire du reste de la membrane (Waugh, Willardson, Kannan, Labotka, & Low, 1986) (Liu, Derick, Zhai, & Palek, 1991) (Schwartz, Rybicki, Heath, & Lubin, 1987), et participant aussi aux anomalies des transports ioniques (Fathallah, Coezy, de Neef, Hardy-Dessources, & Giraud, 1995).



(Gilda A Barabino, Platt, & Kaul, 2010)



(Marie-Hélène Odièvre, Verger, Silva-Pinto, & Elion, 2011)

Figures 15 : Altérations membranaires des GR drépanocytaires

B. Anomalies fonctionnelles

✓ Déshydratation du globule rouge

La déshydratation intracellulaire, observée aussi bien au stade de réticulocyte qu'au stade de globule rouge mature dans la drépanocytose, est due à l'augmentation de la perte en potassium. Cette perte en potassium est consécutive à :

- une activation excessive du co-transport K-Cl Mg²⁺ dépendant : ce transport est activé lorsque la concentration en magnésium intra-érythrocytaire diminue (Brugnara & Tosteson, 1987), ce qui est le cas dans le globule rouge drépanocytaire qui a une perméabilité membranaire accrue au magnésium (De Franceschi et al., 1997) ;
- l'activation du canal Gardos : l'augmentation de la perméabilité membranaire, induite par la désoxygénation du GR dans la drépanocytose permet une entrée de calcium, activant le canal Gardos, canal potassique calcium-dépendant (Gardos, 1958) (Durpès et al., 2010). Ceci conduit à une perte de potassium et d'eau (Apovo, Beuzard, Galacteros, Bachir, & Giraud, 1994).

La concentration intra-érythrocytaire d'hémoglobine augmente lorsque le GR drépanocytaire est déshydraté, facilitant ainsi la polymérisation de l'Hb S et le processus de falciformation de la cellule.

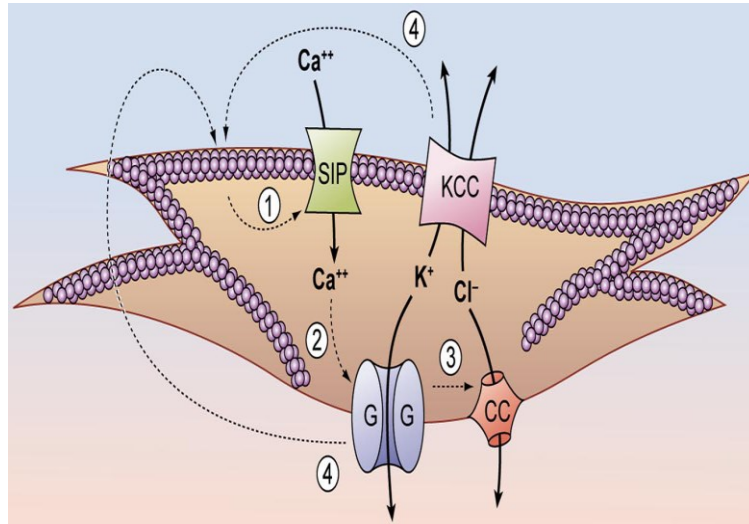


Figure 16 : Transporteurs ioniques impliqués dans la déshydratation du GR drépanocytaire (KCC : cotransporteur KCl; SIP, sickling-induced pathway; G : canal Gardos et CC : voie de conductance du Cl⁻)
(Joiner et al, 2009)

✓ Anomalies hémorhéologiques

Les globules rouges drépanocytaires déshydratés sont rigides et peu déformables. Cette diminution de la déformabilité du globule rouge drépanocytaire ainsi que d'autres anomalies (viscosité, agrégation, seuil de désagrégation) ont été mises en évidence à la faveur du développement d'outils appartenant au domaine de l'hémorhéologie qui évalue l'écoulement sanguin et les propriétés biophysiques du sang et des éléments qui le composent.

Notions de base

La vitesse d'écoulement, la vitesse de cisaillement et la contrainte de cisaillement sont les trois propriétés qui définissent l'écoulement d'un fluide. En effet, lors de cet écoulement, les couches de fluide coulissent les unes sur les autres. Il en résulte un frottement entre ces

couches, c'est la contrainte de cisaillement (τ). Les couches se déplacent avec des vitesses différentes, responsables d'un gradient de vitesse encore appelé vitesse de cisaillement (γ).

La viscosité est un paramètre rhéologique majeur, identifiée comme la résistance intrinsèque d'un fluide à son écoulement. Elle se définit comme étant le rapport entre la contrainte de cisaillement et la vitesse de cisaillement τ/γ .

La rhéologie classe les fluides en deux grands groupes :

1) les fluides newtoniens dont la viscosité est indépendante de la vitesse ou contrainte de cisaillement appliquée. On parle de viscosité absolue. Elle n'est fonction que de la température et de la pression extérieures. C'est le cas de l'eau, du plasma et de la plupart des solvants.

2) les fluides non newtoniens dont la viscosité entretient une relation linéaire avec la vitesse /contrainte de cisaillement. C'est le cas du sang.

Il existe deux types de liquides non newtoniens :

- Les fluides rhéofluidifiants, comme le sang, dont la viscosité apparente diminue avec l'élévation de la vitesse de cisaillement.
- Les fluides rhéoépaississants dont la viscosité apparente augmente avec l'élévation de la vitesse de cisaillement.

Au-delà de ses caractéristiques non-newtoniennes et rhéofluidifiantes, le sang possède également des propriétés visco-élastiques (il est caractérisé par la présence d'un seuil d'écoulement en dessous duquel il ne s'écoule pas) et thixotropes (la thixotropie traduit la capacité de certains gels à se liquéfier sous l'effet d'une agitation constante et de se restructurer après un certain temps de repos).

• Viscosité sanguine

Les drépanocytaires homozygotes SS, du fait de l'anémie dont ils sont sujets, ont une viscosité sanguine plus faible que celle observée chez les sujets sains. En revanche, les hétérozygotes SC présentent une viscosité sanguine supérieure à celle des sujets sains, car l'anémie plus modérée de ces patients ne permet pas de compenser les autres anomalies rhéologiques caractérisées dans la maladie, engendrant ainsi une hyper-viscosité sanguine chronique chez les SC (Tripette et al., 2009).

Cependant, à hémocrite comparable, la viscosité sanguine des drépanocytaires homozygotes SS est supérieure à celle des sujets sains du fait de la rigidité accrue de leurs globules rouges (Chien, Usami, & Bertles, 1970).

De même, les travaux de Kaul (Kaul DK, 1981) rapportent une hyperviscosité sanguine chez les patients drépanocytaires, cette élévation de la viscosité étant liée à la concentration élevée en Hb et à son degré de polymérisation.

De nombreuses études ont établi dans le cadre de la drépanocytose, une association étroite entre l'élévation de la viscosité sanguine et la survenue de CVO chez les homozygotes SS (Yann Lamarre et al., 2012) (Nebor et al., 2011), d'ostéonécroses chez les drépanocytaires SS et SC (Lionnet et al., 2012) et de rétinopathies prolifératives chez les hétérozygotes SC (Lemaire et al., 2013).

Deux propriétés rhéologiques des globules rouges décrites ci-dessous modulent la viscosité sanguine : la déformabilité et les propriétés d'agrégation/ désagrégation érythrocytaire.

- **Déformabilité érythrocytaire**

La déformabilité érythrocytaire est une condition sine qua non du flux sanguin dans les vaisseaux. Les globules rouges ont un diamètre qui est supérieur à celui des plus petits vaisseaux : il est indispensable que ces cellules puissent se déformer pour pouvoir passer à travers les capillaires les plus étroits.

Il est à présent clairement établi que les globules rouges des patients drépanocytaires sont caractérisés par une déformabilité érythrocytaire réduite comparés à celle des sujets sains (Brandão et al., 2003) (Chien et al., 1970) (Kaul, Fabry, Windisch, Baez, & Nagel, 1983) (Mohandas & Chasis, 1993) (Mohandas & Evans, 1994) (Tripette et al., 2009).

Par ailleurs, de plus en plus d'études proposent une association entre les altérations hémorhéologiques retrouvées dans la drépanocytose et les différentes complications aiguës et chroniques de la maladie. En effet, des études réalisées au sein de notre équipe ont démontré que les glomérulopathies et les ulcères de jambe retrouvés chez certains patients drépanocytaires étaient associés à une déformabilité érythrocytaire réduite (Yann Lamarre et al., 2014) (Connes et al., 2013). En revanche, des globules rouges plus déformables pourraient être impliqués dans le développement de vasculopathies cérébrales (Connes et al., 2013). Lemonne et collaborateurs ont également démontré que les globules rouges étaient plus déformables chez les patients développant des ostéonécroses (Lemonne et al., 2013). Cette augmentation de la déformabilité érythrocytaire serait certainement due à la présence d' α -thalassémie puisque les patients ayant une α -thalassémie avaient une déformabilité érythrocytaire plus importante que ceux sans α -thalassémie. Des études additionnelles sont

cependant nécessaires pour comprendre les mécanismes par lesquels la déformabilité érythrocytaire augmenterait le risque de survenue d'ostéonécrose (Lemonne et al., 2013).

- **Agrégation érythrocytaire**

Le phénomène d'agrégation érythrocytaire est un processus au cours duquel les globules rouges s'empilent les uns sur les autres comme des assiettes pour former des rouleaux linéaires.

La comparaison de l'agrégation érythrocytaire entre des patients adultes drépanocytaires et des sujets sains démontre, pour un niveau d'hématocrite comparable, une agrégation érythrocytaire réduite chez les drépanocytaires (Tripette et al., 2009). Il y aurait donc probablement une association entre déformabilité érythrocytaire réduite et agrégation érythrocytaire réduite, les érythrocytes drépanocytaires plus rigides offrant certainement moins de surface pour former des agrégats entre eux (Baskurt & Meiselman, 2003) (Reinhart & Singh, 1990). Cependant, Tripette et collaborateurs indiquent également un seuil de désagrégation érythrocytaire très élevé traduisant une difficulté importante à rompre le contact des globules rouges entre eux, une fois que celui-ci a pu s'établir, et pouvant perturber la microcirculation (Tripette et al., 2009).

Les anomalies relatives au seuil de désagrégation érythrocytaire sont plutôt fréquentes chez les sujets drépanocytaires présentant des syndromes thoraciques aigus (Yann Lamarre et al., 2012) et des glomérulopathies (Yann Lamarre et al., 2014).

Bien qu'une association étroite entre les différentes complications de la maladie et les altérations hémorhéologiques retrouvées dans la drépanocytose soit clairement établie, les mécanismes à l'origine des différences d'expression de la maladie, de sa sévérité et de la survenue d'une complication préférentiellement à une autre chez les patients drépanocytaires restent encore flous. L'implication du stress oxydant comme paramètre pouvant expliquer une partie de cette variabilité a récemment été proposée (Connes et al., 2014).

III. Une physiopathologie complexe : de nombreux acteurs

La polymérisation de l'hémoglobine S est le mécanisme primaire de la vaso-occlusion et a pour conséquence la falciformation des globules rouges. Cependant, cette polymérisation de la désoxy-hémoglobine nécessite un temps de latence qui est supérieur au temps requis pour le passage des globules rouges dans la micro-circulation. Les cellules devraient ainsi normalement revenir dans le tronc artériel avant que leur falciformation entraîne un blocage au niveau des micro-vaisseaux (Mozzarelli et al., 1987). Ce constat a naturellement laissé supposer qu'il y a d'autres mécanismes qui entraînent le ralentissement circulatoire, permettant ainsi aux globules rouges de rester assez longtemps dans les micro-vaisseaux pour avoir le temps de falciformer au niveau de ce territoire.

Dès les années 1980, Hoover met en évidence l'adhérence accrue des globules rouges à l'endothélium vasculaire, adhérence à l'origine d'un ralentissement circulatoire favorisant ainsi la vaso-occlusion (Hoover, Rubin, Wise, & Warren, 1979). Puis Hebbel décrit l'adhérence anormale des GRs de patients drépanocytaires à une couche de cellules endothéliales issues de la veine de cordons ombilicaux (R P Hebbel, Boogaerts, Eaton, & Steinberg, 1980). D'autres travaux de recherche viennent confirmer ces constats (G A Barabino, McIntire, Eskin, Sears, & Udden, 1987) (Mohandas & Evans, 1984).

Par ailleurs, des études réalisées *in vivo* à partir des modèles murins ont montré que le temps de transit des globules rouges SS dans la microcirculation est augmenté du fait d'interactions impliquant l'endothélium vasculaire et les cellules circulantes, Ces interactions cellulaires favorisent la polymérisation de l'Hb S, la falciformation des globules rouges et l'occlusion de la microcirculation (Chiang & Frenette, 2005) (Frenette, 2004) (Lipowsky & Chien, 1989) (Turhan, Weiss, Mohandas, Coller, & Frenette, 2002).

III. 1. Adhérence cellulaire : interactions cellulaires

A. Interactions entre globules rouges et cellules endothéliales

A la base de ces processus d'adhérence, des interactions moléculaires complexes sont mises en jeu. Le mécanisme de vaso-occlusion se ferait en deux étapes : l'adhérence des

réticulocytes prématurément sortis de la moelle osseuse, dits "réticulocytes de stress", et/ou celle des globules rouges matures puis le blocage par les globules rouges falciformés et des drépanocytes irréversibles (D Labie & Elion, 2005).

Les réticulocytes libérés dans la circulation portent les protéines de surface VLA-4 et CD36 qui leur confèrent un phénotype pro-adhérent (Browne, Mosher, Steinberg, & Hebbel, 1996) (Joneckis, Ackley, Orringer, Wayner, & Parise, 1993) (Swerlick, Eckman, Kumar, Jeitler, & Wick, 1993). Ces protéines de surface viennent se lier aux cellules endothéliales :

- Si l'intégrine VLA-4 établit une liaison directe avec VCAM-1, molécule induite par les cytokines pro-inflammatoires (Gee & Platt, 1995), elle reconnaît un large panel de ligands, et les modalités d'interaction avec ceux-ci apparaissent de plus en plus complexes. Au-delà de VCAM-1 présents sur l'endothélium activé, elle se lie à la fibronectine (Fn) plasmatique et la Fn de la matrice extracellulaire (MEC). La mise en évidence d'une activation de VLA-4 dans la drépanocytose joue aussi vraisemblablement un rôle clé dans la survenue des CVO en favorisant l'adhésion des GR drépanocytaires aux cellules endothéliales *via* différents ligands notamment TSP, Lu-BCAM en plus des ligands classiques VCAM-1, Fn (Takada, Huang, & Hemler, 1987) (Telen, 2000) (Masumoto & Hemler, 1993) (Julia E Brittain, Han, Ataga, Orringer, & Parise, 2004) (Gee & Platt, 1995) (Wassim El Nemer et al., 2007) (W El Nemer et al., 2008).

- CD36 réticulocytaire établit une liaison avec une molécule CD36 endothéliale via un pontage par la thrombospondine-1 (TSP-1), une protéine plasmatique synthétisée par les plaquettes activées dont les taux sont élevés chez les patients drépanocytaires (Browne et al., 1996) (Sugihara, Sugihara, Mohandas, & Hebbel, 1992).

- La protéine CD47 ou IAP (Integrin-Associated Protein), de la superfamille des immunoglobulines des protéines membranaires, est responsable en grande partie de l'adhésion des GR drépanocytaires à la TSP (Julia E Brittain et al., 2004) (J E Brittain, Mlinar, Anderson, Orringer, & Parise, 2001). Les GR normaux et les GR drépanocytaires expriment approximativement la même quantité de CD47 à leur surface. Néanmoins, les récepteurs CD47 des GR drépanocytaires permettent leur adhésion à la TSP, alors que celle-ci est négligeable chez les GR normaux.

Ces partenaires protéiques, les premiers identifiés, constituent les interactions les plus étudiées mais ne sont pas les seules. En effet, d'autres protéines semblent avoir un rôle important dans l'adhérence des réticulocytes. Ainsi la protéine Lu-BCAM interagirait avec la laminine sous-endothéliale et le facteur von Willebrand interagirait plutôt au niveau des gros

vaisseaux (D Labie & Elion, 2005) (Junette S Mohan, Lip, Wright, Bareford, & Blann, 2005) (Udani et al., 1998).

Les GRs matures et les drépanocytes interagissent avec l'endothélium via des immunoglobulines G (IgG) dont les taux sont anormalement élevés chez les drépanocytes (R P Hebbel & Miller, 1984) (R P Hebbel, Visser, Goodman, Jacob, & Vercellotti, 1987). Ces IgG peuvent se fixer sur les domaines extracellulaires des protéines bande 3 agglomérées au sein de la membrane des globules rouges drépanocytaires (Schlüter & Drenckhahn, 1986), conduisant à la destruction prématurée du globule rouge par la rate, exacerbant ainsi l'anémie des patients.

L'externalisation de la phosphatidylsérine favorise également l'adhérence des globules rouges via la TSP-1 mais aussi via un récepteur spécifique à la PS plus récemment identifié, exprimé à la membrane des cellules endothéliales lors de leur activation (Manodori et al., 2000) (B. N. Y. Setty & Betal, 2008).

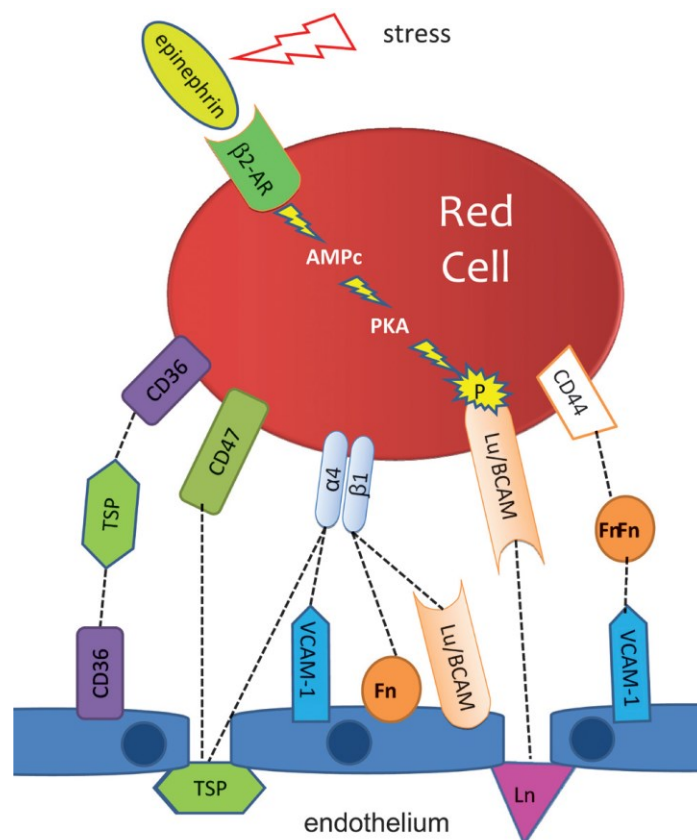


Figure 17 : Adhérence des globules rouges à l'endothélium dans la drépanocytose

(Marie-Hélène Odièvre et al., 2011)

B. Interactions cellulaires entre leucocytes et cellules endothéliales

Les polynucléaires neutrophiles tendent à adhérer de façon accrue à l'endothélium vasculaire durant les CVO (Fadlon et al., 1998). Ces résultats renforcent ainsi le rôle de ces cellules dans la vaso-occlusion.

Les leucocytes expriment à leur surface des molécules d'adhésion : la L-sélectine, l'intégrine $\alpha M\beta 2$ et l'intégrine $\alpha L\beta 2$. Ces molécules sont exprimées en très grande quantité chez les patients drépanocytaires (Fadlon et al., 1998) (Benkerrou et al., 2002) (Okpala, Daniel, Haynes, Odoemene, & Goldman, 2002). Leurs ligands au niveau des cellules endothéliales incluent les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, les E-sélectines et les P-sélectines (Okpala et al., 2002).

C. Intervention des plaquettes

Le rôle exact des plaquettes dans les processus vaso-occlusifs n'est pas encore complètement élucidé.

Une étude de Wood et collaborateurs suggère une adhérence des plaquettes aux cellules endothéliales des micro-veinules cérébrales chez des souris drépanocytaires (K. Wood, Russell, Hebbel, & Granger, 2004).

Par ailleurs, des études *in vitro* ont démontré chez les patients drépanocytaires des interactions entre les plaquettes et les monocytes, mais aussi entre les plaquettes et les GR SS (Wun et al., 1999) (J E Brittain & Parise, 2008). De façon plus générale, l'activation des plaquettes semblent influencer la surexpression de molécules et de récepteurs d'adhérence (Wun et al., 1998) (Chiang & Frenette, 2005).

Il semblerait que les plaquettes participent de façon indirecte à l'adhérence cellulaire en augmentant l'adhésion des érythrocytes à l'endothélium vasculaire via la libération de facteurs tels que la thrombospondine (H. A. Brittain, Eckman, Swerlick, Howard, & Wick, 1993). En accord avec ces résultats, Antonucci et collaborateurs ont démontré que l'adhésion de GR SS à des cultures de cellules endothéliales de veines ombilicales est augmentée en présence de plaquettes (Antonucci, Walker, Herion, & Orringer, 1990).

D. Interaction entre cellules circulantes

Des études *in vitro* ont montré que les GRs drépanocytaires adhèrent de manière anormale aux monocytes (Schwartz et al., 1985) et aux polynucléaires neutrophiles (J. Chang, Shi, Chiang, & Frenette, 2008) (Hofstra, Kalra, Meiselman, & Coates, 1996) (Chiang, Hidalgo, Chang, & Frenette, 2007). Il a également été démontré que les polynucléaires neutrophiles des patients drépanocytaires sont moins déformables que ceux d'un individu normal (Chiang & Frenette, 2005), favorisant ainsi l'occlusion des vaisseaux.

Les travaux de Chaar et collaborateurs démontrent chez les patients drépanocytaires la formation d'agrégats entre les monocytes périphériques et les globules rouges circulants, via l'interaction entre la protéine Lu-BCAM érythrocytaire et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ monocytaire (Chaar et al., 2010). Ces agrégats pourraient participer au processus vaso-occlusif.

En résumé, comme illustré dans la Figure 18, des interactions impliquant de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires, favorisées par des processus d'activation cellulaire participent au développement du processus vaso-occlusif.

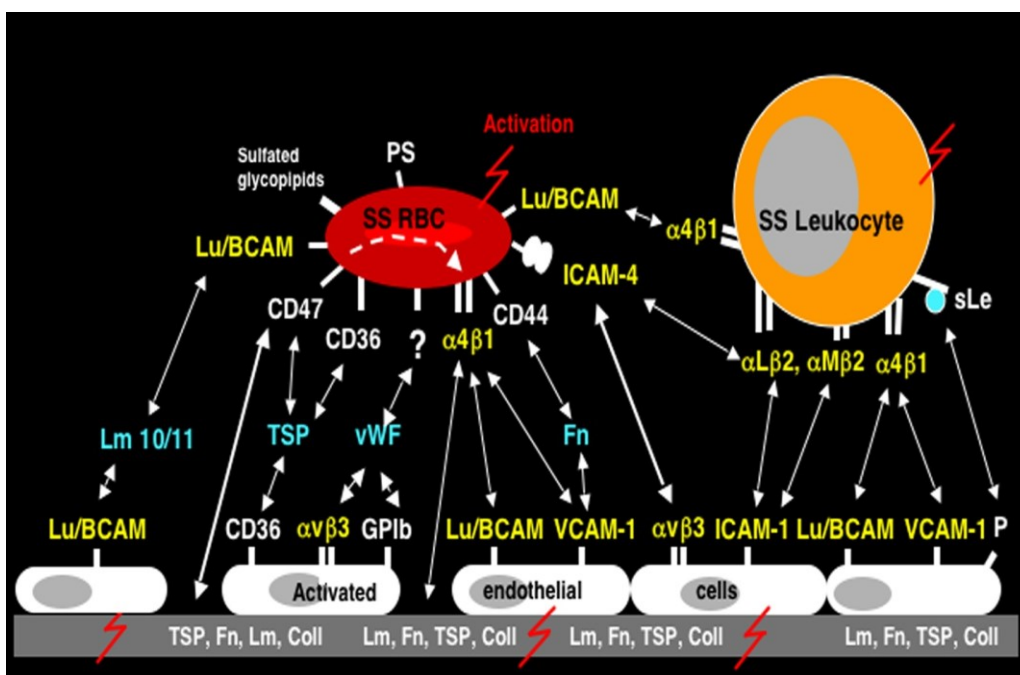


Figure 18 : Schéma général de l'adhérence cellulaire dans la drépanocytose.

Interactions multiples entre protéines plasmatiques et cellules activées : leucocytes, GRSS, CEs et la matrice extracellulaire. Les liaisons peuvent se faire directement ou indirectement par un pontage des facteurs plasmatiques

D. Activation cellulaire

✓ Phénotype pro-inflammatoire

Il est aujourd'hui largement admis que l'inflammation joue un rôle majeur dans la pathogenèse et les conséquences physiopathologiques de la drépanocytose.

L'inflammation est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. Cette réponse fait intervenir des phénomènes d'immunité, c'est à dire de résistance aux agressions. Les cellules endothéliales recrutent alors les leucocytes afin de localiser et réparer les lésions. L'augmentation du nombre des leucocytes (hyperleucocytose) et leur état d'activation constituent des marqueurs de l'état pro inflammatoire associés à la maladie drépanocytaire (Belcher, Marker, Weber, Hebbel, & Vercellotti, 2000) (Lard, Mul, de Haas, Roos, & Duits, 1999).

Les occlusions provoquées par l'adhérence des GRSS aux cellules endothéliales entraînent une réponse du type ischémie-reperfusion avec des signaux qui déclenchent l'activation du facteur de transcription NF- κ B contribuant à l'expression de facteurs pro-inflammatoires provoquant une activation vasculaire chronique avec la stimulation de l'expression de molécules endothéliales d'adhésion.

Parmi les médiateurs de l'inflammation, nous pouvons également citer:

- les chimiokines, protéines activatrices des leucocytes présentant des propriétés chimiotactiques attirant ces cellules au site même de l'inflammation
- les cytokines, protéines sécrétées par les leucocytes assurant la communication intercellulaire
- les molécules d'adhérence.

L'inflammation récurrente ainsi que les cytokines inflammatoires augmentent la capacité d'adhésion des leucocytes (Francis & Haywood, 1992) (Croizat, 1994). En effet, l'endothélium vasculaire est activé par l'hypoxie, les infections et les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , IL-1 et IL-6. Ces stimuli activent les leucocytes qui à leur tour activent l'endothélium vasculaire, engendrant ainsi un cercle vicieux. Cette double activation endothéliale et leucocytaire conduit à une expression beaucoup plus importante des molécules adhésives ou à leur activation telles que les intégrines, les sélectines et les ICAM (Inter-Cellular Adhesion Molecule) qui contribuent davantage à l'obstruction de la lumière des vaisseaux (Chies & Nardi, 2001).

De même, dans des conditions physiologiques, l'expression de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) n'est que rarement présente sur les cellules endothéliales non activées et apparaît sous l'influence de stimuli inflammatoires ou métabolique, de cytokines, de produits de glycation avancée et de lipides oxydés. VCAM-1 est souvent considéré comme un marqueur d'une réaction inflammatoire et/ou d'athérosclérose. Une étude de Solovey et collaborateurs (Solovey et al., 1997) démontre une augmentation du taux plasmatique de VCAM-1 chez les patients drépanocytaires, confirmant le phénotype inflammatoire chronique de la maladie.

Plus récemment les travaux de Durpes et collaborateurs ont montré que les chimiokines IL-8 et RANTES favorisent, chez les patients exprimant le récepteur DARC, l'activation de VLA-4 et l'adhérence des globules rouges drépanocytaires sur les ligands fibronectine et VCAM-1 (Durpès et al., 2011).

✓ **Phénotype pro-coagulant**

La drépanocytose est associée à un état d'hypercoagulabilité qui se manifeste sur le plan clinique par un risque augmenté de thromboses artérielles et veineuses. En effet, la maladie génère un état pro-coagulant, pro-thrombogène et anti-fibrinolytique avec une activation et une altération de l'endothélium, une diminution de l'antithrombine III, de la protéine C, protéine inhibitrice de la coagulation, et de son co-facteur, la protéine S (M. P. Westerman et al., 1999), une activation plaquettaire et une augmentation du taux plasmatique du facteur de von Willebrand, élément nécessaire à l'hémostase primaire. Par ailleurs, des études ont montré une augmentation importante de l'expression du facteur tissulaire au niveau des cellules endothéliales des patients drépanocytaires (Solovey, Gui, Key, & Hebbel, 1998).

Enfin, les microparticules (MPs), fragments de membrane plasmique libérés par les cellules activées ou apoptotiques sont retrouvés à des taux élevés chez les patients drépanocytaires (Mahfoudhi et al., 2012) (B. N. Setty, Kulkarni, Rao, & Stuart, 2000) (M. Westerman et al., 2008) (Wun et al., 1997) (Nebor et al., 2014). Les MPs sont maintenant considérées comme de véritables marqueurs pathogènes du risque thrombotique (Morel, Toti, & Freyssinet, 2007).

Cette dimension pro-coagulante de la drépanocytose favorise les occlusions vasculaires et les micro-embolies, impliquées dans les AVC et les accidents pulmonaires par exemple (Stein, Beemath, Meyers, Skaf, & Olson, 2006).

✓ Microparticules: témoins de l'activation cellulaire

Comme décrit précédemment, la drépanocytose est une pathologie présentant un contexte pro-inflammatoire avec une activation anormale de l'endothélium vasculaire et un environnement pro-coagulant. De plus en plus d'études suggèrent l'implication des microparticules, ces microvésicules membranaires de diamètre inférieur à un micron, dans la modulation de ces phénomènes de coagulation, d'inflammation et de vaso-régulation.

La formation, puis la libération de MPs pourrait être induite par un influx calcique important entrainant un dérèglement de la distribution des phospholipides membranaires (R. F. Zwaal & Schroit, 1997). En particulier, la phosphatidylsérine (PS), normalement localisée dans le feuillet cytoplasmique de la membrane cellulaire, est exposée sur le feuillet membranaire externe, ce qui constitue une manifestation précoce de l'activation cellulaire. A ce remaniement membranaire s'ajoutent des perturbations du cytosquelette avec notamment des clivages protéolytiques conduisant à au bourgeonnement et à la libération des MPs portant à leur surface la PS véritable stigmata reconnu par l'annexine V, un anticoagulant physiologique. Cette interaction entre la PS et l'annexine V est utilisée pour détecter et mesurer, principalement par cytométrie en flux, le nombre et la taille des MPs (Thiagarajan & Tait, 1991) (Arraud, Gounou, Linares, & Brisson, 2014) (Grisendi et al., 2014) (Nielsen, Beck-Nielsen, Andersen, & Handberg, 2014).

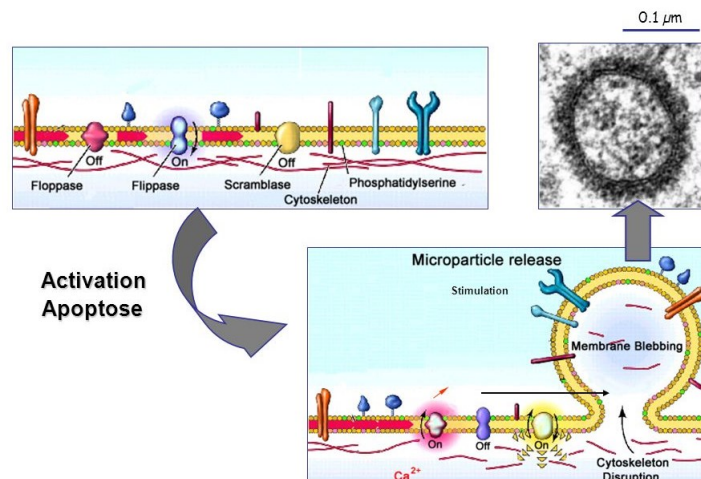


Figure 19 : Génération de microparticules

Schéma adapté de (Hugel, Martínez, Kunzelmann, & Freyssinet, 2005) et (R. F. Zwaal & Schroit, 1997)

Par ailleurs, les MPs portent également à leur surface les marqueurs cellulaires des cellules dont elles sont originaires, permettant ainsi de caractériser l'origine cellulaire de ces microvésicules (Jy et al., 2004).

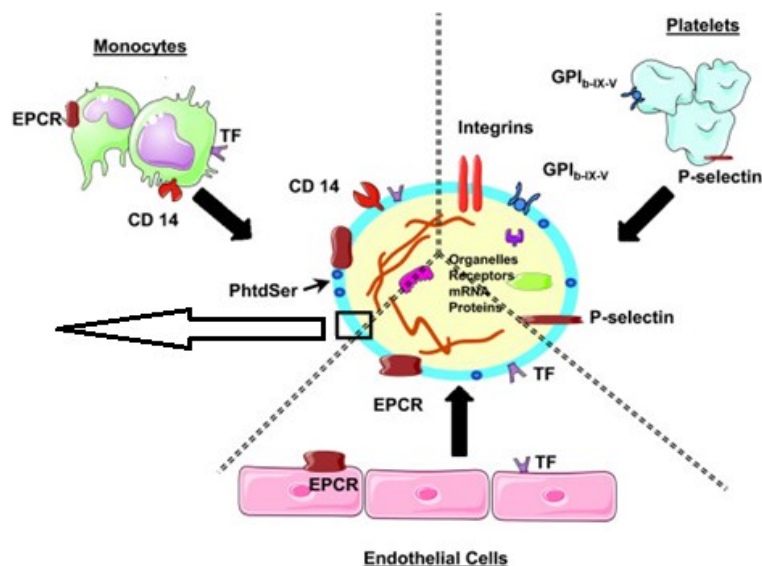


Figure 20 : Microparticules exprimant les antigènes caractéristiques de leur cellule d'origine (Meziani, Delabranche, Asfar, & Toti, 2010)

Les premières microparticules découvertes étaient d'origine plaquettaire (Wolf, 1967) mais très rapidement des travaux de recherche ont mis en évidence des microparticules provenant d'autres types cellulaires tels que les leucocytes, les globules rouges, les cellules endothéliales ou encore les monocytes (Barry & FitzGerald, 1999).

Longtemps considérées comme de simples débris cellulaires (Wolf, 1967), les MPs ont révélé ces dernières années des propriétés inattendues.

L'expression de la phosphatidylsérine par les MPs fournit une surface catalytique permettant la fixation de complexes enzymatiques de la cascade de coagulation (Dominique Helley, 2011). Suivant leurs origines cellulaires, elles peuvent exprimer aussi le facteur tissulaire, principal initiateur de la coagulation.

A l'activité pro-coagulante caractéristique des MPs, nous devons maintenant ajouter une fonction pro-fibrinolytique complémentaire. En effet, Lacroix et collaborateurs (Lacroix et al., 2007) ont récemment attribué une nouvelle fonction aux MPs d'origine endothéliale : leur capacité à générer de la plasmine et à développer une activité fibrinolytique et protéolytique

péricellulaire. D'autres études indiquent que des métalloprotéases matricielles présentes sur des MPs issues de cellules cancéreuses (Graves et al., 2004) ou endothéliales (Taraboletti et al., 2002) pourraient également induire une activité protéolytique.

Les MPs plaquettaires sont décrites comme des effecteurs de l'inflammation, capables d'activer l'endothélium en stimulant la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL8) et d'induire l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 ainsi que l'E-sélectine (Nomura et al., 2001). Cette activation de l'endothélium va favoriser l'adhésion des cellules à l'endothélium.

Dans la pathologie drépanocytaire, comme précédemment indiqué, on retrouve une concentration plasmatique de MPs anormalement élevée (van Tits et al., 2009) (Wun et al., 1998) (Shet et al., 2003) (van Beers et al., 2009) (Nébor et al., 2013). De plus, des études démontrent une augmentation encore exacerbée des MPs circulantes lors des crises douloureuses vaso-occlusives (van Tits et al., 2009) (Shet et al., 2003).

Van Beer ainsi que notre groupe démontrent que les MPs d'origine plaquettaire et érythrocytaire sont majoritairement retrouvées chez les personnes drépanocytaires à l'état de base (van Beers et al., 2009) (Nébor et al., 2013). Cette dernière observation reste néanmoins controversée car selon Shet, la concentration plasmatique de MPs est plus importante à l'état de crise qu'à l'état de base et les MPs dérivant des cellules endothéliales et monocytaires présentent la concentration plasmatique la plus importante et expriment le facteur tissulaire (Shet et al., 2003).

Ces résultats discordants pourraient résulter des méthodes pré – analytiques (purification des MPs, anticorps utilisés,...) qui diffèrent entre ces différentes études.

Nébor et collaborateurs ont comparé l'émission de MPs chez des individus sans hémoglobinopathie et deux groupes de patients drépanocytaires SS, un groupe dit « sévère » présentant plus de trois CVO par an et un groupe « non sévère » n'ayant présenté aucune CVO durant les deux ans précédant l'étude. Les résultats démontrent que bien qu'une augmentation de la concentration de MPs totales était retrouvée chez les patients drépanocytaires de façon générale, le groupe drépanocytaire « non sévère » présentait plutôt une augmentation de MPs érythrocytaires tandis que le groupe drépanocytaire « sévère » exhibait de plus forts taux de MPs plaquettaires. Ces résultats suggèrent que la concentration plasmique de MPs plaquettaires peut être un marqueur de la sévérité du phénoype vaso-occlusif dans la maladie (Nébor et al., 2014).

En plus d'être des biomarqueurs, des données récentes suggèrent que les MPs pourraient être des bio-effecteurs de la pathologie drépanocytaire. Chez des souris transgéniques

drépanocytaires, des travaux ont démontré que la TSP 1, protéine plaquettaire dont la concentration plasmatique est élevée chez les patients drépanocytaires, augmente encore lors des crises (Browne et al., 1996). Camus et collaborateurs suggèrent que la TSP 1 déclenche l'émission de MPs érythrocytaires chez des souris SAD. Cette libération de microvésicules entraîne des lésions endothéliales et participe à la vaso-occlusion. (Stéphane M Camus et al., 2012). Les résultats de ces auteurs révèlent également que les MPs érythrocytaires des souris SAD génèrent deux fois plus d'espèces réactives de l'oxygène que celles des souris contrôles non drépanocytaires, appuyant les données établissant un contexte oxydant dans la drépanocytose.

III. 2. Anomalies du tonus vasculaire

L'endothélium joue un rôle primordial dans la régulation locale de l'activité vasculaire en synthétisant des substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Les principaux acteurs de cette vaso-régulation sont le monoxyde d'azote (NO) et l'endothéline-1 (ET-1). Dans la drépanocytose on assiste à une dérégulation de l'expression de ces deux molécules vasorégulatrices.

A. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule endogène libérée par les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules du foie et les neurones. Il est synthétisé naturellement à partir de la L-arginine et de l'oxygène par une enzyme de type hémoprotéine dite NO synthase (NOS) existant sous différentes isoformes.

Dans l'organisme, le monoxyde d'azote remplit plusieurs fonctions. Ainsi, Le NO produit par les cellules endothéliales agit au niveau des cellules musculaires lisses et entraîne une stimulation de la guanylate cyclase, enzyme responsable de la synthèse de la guanosine monophosphate cyclique GMPc, provoquant ainsi une vasodilatation et un accroissement du débit sanguin (Moncada & Higgs, 1993). Le NO agit également sur les cellules endothéliales en inhibant l'expression des récepteurs d'adhérence et réprime également l'expression de l'endothéline-1 (Boulanger & Lüscher, 1990) (K. C. Wood, Hsu, & Gladwin, 2008). De plus, le NO a un effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire (Mellion et al., 1981) (Radomski & Moncada, 1993). Il améliore aussi la déformabilité des globules rouges (Bor-Kucukatay, Wenby, Meiselman, & Baskurt, 2003) (Grau et al., 2013). Plus récemment, la production de

NO au sein du globule rouge par une NOS de type endothélial a été mise en évidence sans que le lien avec la déformabilité du GR soit bien compris (Kleinbongard, 2006) (Grau et al., 2015) (Mozar et al., 2015).

B. L'endothéline-1

L'endothéline est un neuropeptide sécrété par l'endothélium vasculaire, ayant un effet vasoconstricteur puissant sur les cellules musculaires lisses.

Il existe trois isopeptides d'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3), chacun étant produit par des gènes différents. Identifié en 1985 par son effet vasoconstricteur important et durable, ET-1 est le vasoconstricteur le plus puissant connu. C'est également un stimulant de la prolifération cellulaire, de la fibrose (Hochoer et al., 1997) et de l'inflammation (Finsnes, Christensen, Lyberg, Sejersted, & Skjønberg, 1998).

L'expression des gènes des endothélines peut être stimulée par de nombreux facteurs tels que l'hypoxie, la présence de cytokines pro-inflammatoires, la thrombine, l'hémoglobine, les facteurs de nécrose tumorale TNF α et TGF β et peut être inhibée par le NO et GMPc (Boulanger & Lüscher, 1990) (Rubanyi & Polokoff, 1994).

Les effets des endothélines sont bien définis et passent par l'activation de deux types de récepteurs (ETA et ETB) qui ont une expression cellulaire différente. Le récepteur ETA est exprimé essentiellement dans le muscle lisse et participe à la contraction. Le second récepteur ETB est aussi exprimé par le muscle lisse mais se retrouve également au niveau endothélial. La stimulation de ces deux récepteurs dans la cellule musculaire lisse produit une contraction qui est dépendante de la concentration de calcium extracellulaire et active une protéine kinase C. Cette dernière va diminuer l'activité de la phosphatase des MLCP (Myosin-Light-Chain Phosphatase) favorisant l'état phosphorylé de la myosine et donc la contraction. En revanche, le récepteur ETB présent sur l'endothélium limite la contraction puisque sa stimulation active la NOS endothéliale et par conséquent produit et libère le NO.

Par ailleurs, Rivera et collaborateurs ont démontré que des globules rouges de souris expriment des récepteurs à ET-1 et que l'ET-1 active les canaux Gardos dans ces cellules par le biais des récepteurs de type B (ET_B) (A Rivera, Rotter, & Brugnara, 1999). Ces données ont ensuite été confirmées sur des globules rouges humains (Alicia Rivera, Jarolim, & Brugnara, 2002). Le processus d'activation des canaux Gardos par ET-1 est PKC-dépendant.

C. Anomalies du métabolisme du NO et de l'ET-1 dans la drépanocytose

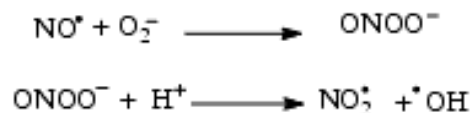
Dans la drépanocytose, la vasorégulation de l'endothélium est altérée en faveur d'un phénotype vaso-constrictif. En effet, de nombreuses études ont démontré que les taux plasmatiques de l'ET-1 sont anormalement élevés chez les patients drépanocytaires à l'état basal, et exacerbés lors de CVO (Lapoumériou et al., 2005) (Graido-Gonzalez et al., 1998). Sabaa et collaborateurs démontrent qu'une inhibition pharmacologique des récepteurs de l'endothéline pouvaient prévenir le déclenchement des CVO et l'atteinte des organes dans un modèle murin drépanocytaire (Sabaa et al., 2008).

De plus, dans la drépanocytose, une réduction de la biodisponibilité du NO, vaso-dilatateur, a été démontrée et pourrait expliquer certaines complications vasculaires liées à la maladie.

Différents facteurs contribuent à la diminution de la biodisponibilité du NO :

- l'hémolyse intravasculaire, phénomène majeur de la pathologie, en conduisant à la libération d'arginase. En effet, l'arginase catalyse la réaction $\text{arginine} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ornithine} + \text{urée}$. La L-arginine étant également le substrat des NOS, en la captant, l'arginase plasmatique diminue la concentration de la L-arginine et diminue de ce fait la synthèse du NO (Pernow & Jung, 2013).
- La destruction chronique des globules rouges qui élève les taux d'hémoglobine libre dans le plasma. Il s'ensuit alors une réaction directe entre l'hémoglobine libérée et le monoxyde d'azote, avec une capture de ce dernier, perturbant ainsi la réponse physiologique vasodilatatrice médiée par celui-ci. La capture du NO par l'hémoglobine libre jouerait ainsi un rôle majeur dans les crises douloureuses de la drépanocytose.
- Les radicaux libres produits par le stress oxydant.

La réaction entre le NO et des radicaux libres tels que l'ion superoxyde O_2^- produit l'anion peroxynitrite ONOO^- qui, en milieu acide H^+ donne deux radicaux :



Ces diminutions de la biodisponibilité du NO participent aux dysfonctionnements de l'endothélium en limitant fortement les dilatations vasculaires nécessaires à l'ajustement de la pression sanguine et en favorisant les constriction via la levée de l'inhibition de l'ET-1.

En plus de favoriser les processus occlusifs des vaisseaux sanguins, la diminution de la biodisponibilité du NO est étroitement associée à l'hémolyse intravasculaire à l'origine d'un relargage excessif d'hémoglobine extracellulaire dans le plasma.

III. 3. Hémolyse intravasculaire

Plusieurs études démontrent une hémolyse bien présente chez les patients drépanocytaires et exacerbée lors des crises vaso-occlusives et des événements hémolytiques aigus (Naumann, Diggs, Barreras, & Williams, 1971) (Reiter et al., 2002) (Zhou et al., 2009).

Lors de sa libération, l'hémoglobine libre forme un complexe avec l'haptoglobine qui se lie sur CD163 à la surface des macrophages et des leucocytes en circulation (Philippidis et al., 2004) (Schaer, Vallelian, Imhof, Schoedon, & Schaer, 2007). Cependant quand la capacité de liaison de l'haptoglobine est saturée, l'hémoglobine libre s'accumule dans le plasma et entraîne de nombreuses dysfonctions endothéliales. Elle piège le NO qui est consommé en excès, ce qui engendre une vaso-constriction (Reiter et al., 2002). La diminution de la biodisponibilité du NO peut également être à l'origine de coagulopathies intravasculaires puisque le NO a été démontré comme interagissant avec les composants de la cascade de la coagulation (tels que le facteur XIII et la fibrine), régulant ainsi négativement la formation de caillots sanguins (Kayanoki et al., 1999) (Shao et al., 2001).

Par ailleurs, l'accumulation d'hémoglobine libre dans le plasma contribue également à l'activation plaquettaire et à la survenue de thrombose (Studt et al., 2005) (Radomski, Palmer, & Moncada, 1987).

De nombreuses études ont démontré que l'hémolyse intravasculaire et la diminution subséquente de la biodisponibilité du NO sont associées à des complications cliniques dans la drépanocytose telles que l'hypertension artérielle pulmonaire, le priapisme, les ulcères de jambes et les AVC (Kato, Gladwin, & Steinberg, 2007) (Nolan et al., 2006) (Champion, Bivalacqua, Takimoto, Kass, & Burnett, 2005).

III. 4. Oxydation tissulaire

Les interactions entre l'endothélium vasculaire et les cellules circulantes, globules rouges, globules blancs et plaquettes, sont favorisées par un contexte oxydatif résultant tout d'abord de l'instabilité inhérente de l'Hb S (Klings & Farber, 2001). De plus, il a déjà été bien démontré que les globules rouges drépanocytaires produisaient plus de radicaux libres que les globules rouges normaux (R P Hebbel et al., 1982) (R P Hebbel, 1990) (Repka & Hebbel, 1991). Par ailleurs, les processus oxydatifs conduisent également à une dénaturation de l'hémoglobine qui précipite et forme des hémichromes et des espèces réactives de l'oxygène (Misra & Fridovich, 1972). Les globules rouges drépanocytaires subissant une lyse exacerbée, l'accumulation de fer dans le plasma favorise également la production de radicaux libres (Dröge, 2002). Une fois exposés au contact du fer, les globules rouges, les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles augmentent leur production d'espèces réactives de l'oxygène (Amer, Goldfarb, & Fibach, 2003) (Amer & Fibach, 2004) (Amer & Fibach, 2005) et sont plus vulnérables aux dommages occasionnés par ceux-ci. Les globules rouges par exemple ont une peroxydation lipidique membranaire augmentée associée à une déficience de la vitamine E anti-oxydante (Aslan, Thornley-Brown, & Freeman, 2000). L'activation des plaquettes est favorisée par le stress oxydant (Blockmans, Deckmyn, & Vermynen, 1995) (Iuliano, Colavita, Leo, Praticò, & Violi, 1997) pouvant expliquer l'état d'hypercoagulabilité observé chez les patients drépanocytaires (Eldor, 1978). Dans un contexte oxydatif, les polynucléaires neutrophiles perdent leur capacité de défense anti-bactérienne (Amer & Fibach, 2005), pouvant favoriser la susceptibilité accrue aux infections des patients drépanocytaires.

Enfin, les processus oxydatifs semblent augmenter l'adhérence anormales des cellules circulantes à l'endothélium vasculaire puisque des taux plus élevés d'espèces réactives de l'oxygène ont été mesurés pendant des épisodes de reperfusion ou quand les polynucléaires sont activés ou adhèrent à l'endothélium (Mohamed, Hashim, Nilsson, & Venge, 1993) (Hofstra et al., 1996). Le stress oxydant favoriserait donc les mécanismes vaso-occlusifs dans la drépanocytose.

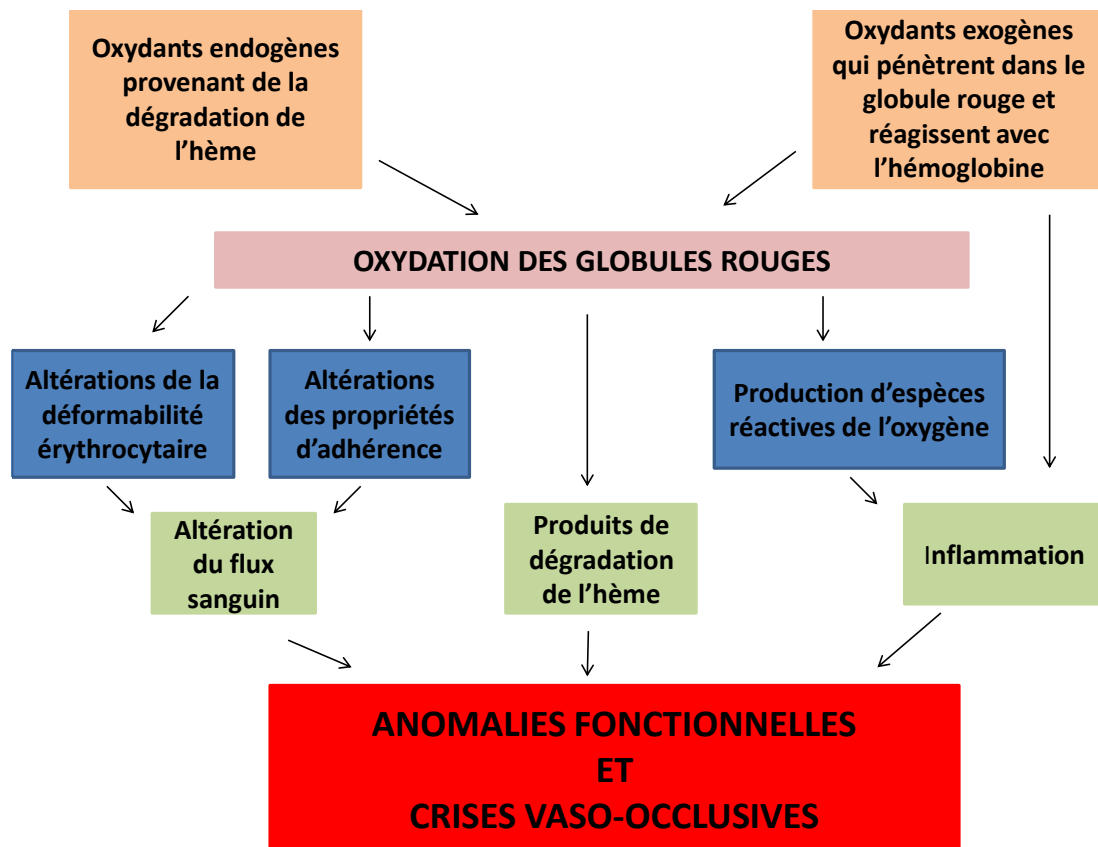


Figure 21: Conséquences de l'oxydation des globules rouges
(Schéma inspiré de Rifkind & Nagababu, 2013)

IV. Le stress oxydant : acteur majeur de la physiopathologie

Le stress oxydant est une caractéristique importante de la pathologie drépanocytaire et joue un grand rôle dans les phénomènes d'hémolyse, de vaso-occlusion et les atteintes des différents organes (Nur et al., 2010) (Nur, Biemond, Otten, Brandjes, & Schnog, 2011). Il se définit comme un déséquilibre de la balance entre les agents pro-oxydants et les anti-oxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. En effet, dans des conditions physiologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites en permanence par l'organisme sont contrecarrées par un système de défense anti-oxydant efficace qui permet de réguler leur production excessive (Halliwell & Gutteridge, 1984). Cependant chez les patients drépanocytaires, un affaiblissement de leur système de défense dû à une production diminuée et/ou une consommation excessive d'anti-oxydants vient rompre cet équilibre.

IV. 1. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène présent dans l'organisme, qui a pour rôle majeur celui d'être l'accepteur final des électrons libérés au cours des divers processus cataboliques, est normalement réduit en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale pour apporter aux cellules l'énergie dont elles ont besoin pour assurer leurs fonctions. Cette réaction de réduction directe est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes localisées dans la membrane interne de la mitochondrie. Ainsi, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Cependant, 2 à 5 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (Cadenas & Davies, 2000). Parmi ces ROS, figurent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle $\cdot OH$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou encore le nitroperoxyde (ONOOH).

Dans des conditions physiologiques, les ROS sont produites en faible quantité et de façon régulée. Autrement, ces métabolites réactifs peuvent induire des dommages cellulaires. Ce sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires sur leur couche externe. Cet électron non apparié confère aux radicaux libres une grande réactivité et une grande instabilité. Cependant, ils peuvent se stabiliser en arrachant des électrons

provenant d'autres sources. Les ROS sont également capables de générer d'autres ROS. C'est le cas de l'anion superoxyde O_2^- qui peut se dismuter en hydrogène peroxyde H_2O_2 et en oxygène O_2 .

H_2O_2 peut également former le radical hydroxyl $OH^\cdot$, qui est le plus nocif, via une cascade de réactions appelées réactions de Fenton et Haber-Weiss (Kohen & Nyska, 2002).

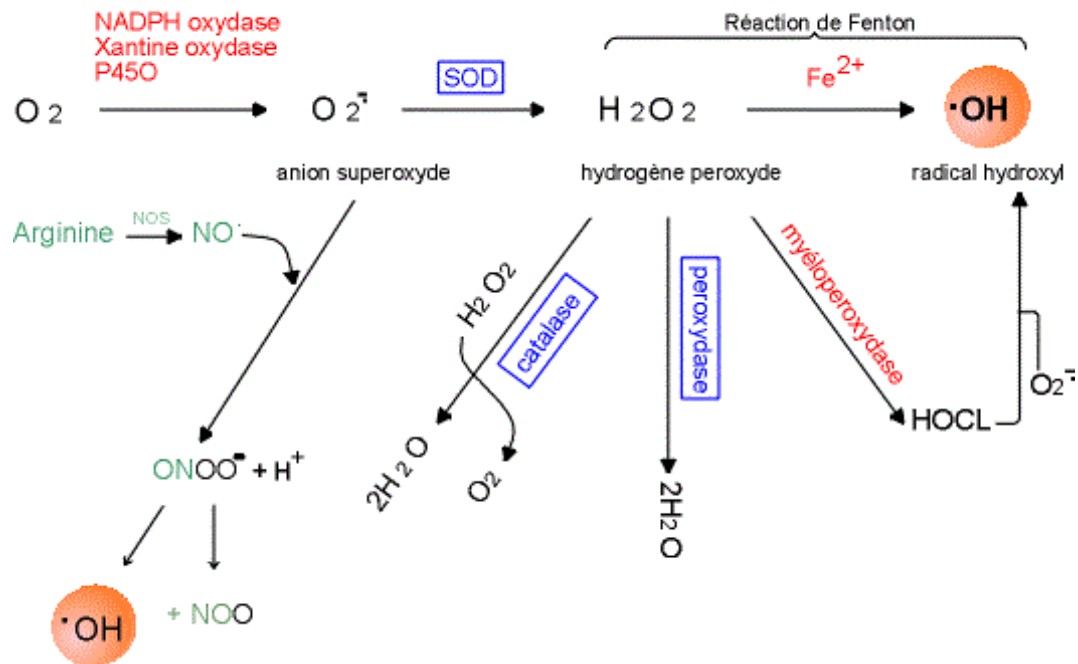


Figure 22 : Voies de formation des radicaux libres de l'oxygène

Le globule rouge est également exposé à l'action du NO et du nitrite. En effet, le NO peut réagir avec l'anion superoxyde pour produire du peroxynitrite. Le nitrite, produit de l'oxydation du NO par l'oxygène ou les métalloprotéines du plasma, peut quant à lui réagir avec l'hémoglobine et produire de la méthémoglobine. Ces réactions mettant en jeu le NO et le nitrite, sont à l'origine de nouvelles réactions oxydatives induisant les espèces réactives du nitrogène (RNS), source supplémentaire de dommages du globule rouge (Rifkind & Nagababu, 2013).

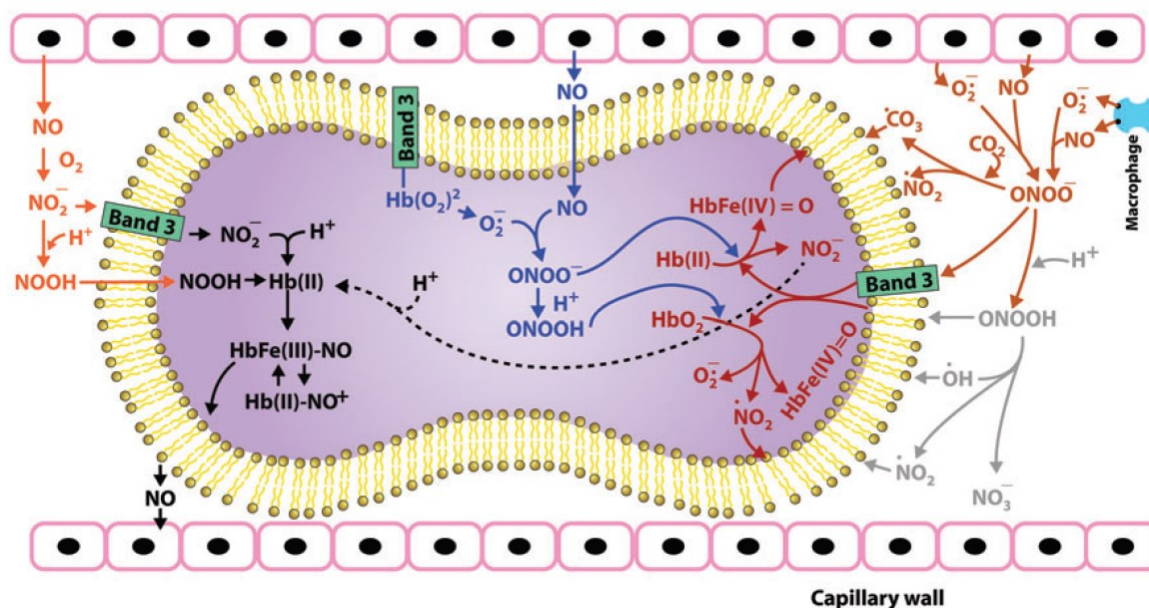


Figure 23 : Réactions du globule rouge impliquant le NO endothélial

(Rifkind & Nagababu, 2013)

La chaîne respiratoire mitochondriale est responsable de la majorité de la production d'anion superoxyde dans les cellules non phagocytaires (Turrens, 2003) (Carrière et al., 2006). De plus, il existe une production cytosolique des ROS au niveau des cellules phagocytiques par les membres de la famille de la NADPH oxydase, enzyme localisée au niveau de la membrane plasmique et interagissant avec le substrat intracellulaire (NADH, H⁺, ou NADPH, H⁺). Ces ROS sont impliqués dans l'activation de l'apoptose, la production de cytokines, les réactions inflammatoire et anti-microbienne.

A côté de ces deux sources majeures de ROS, d'autres sources cytosoliques ou présentes dans divers organites cellulaires peuvent jouer un rôle dans la modulation de la signalisation cellulaire, telles que la xanthine oxydase (Ono et al., 2009), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450) (Jungbluth, 2008) ou encore les NOS (Fang, 1997).

Il est bon de souligner également que les ROS peuvent être exogènes et provenir de l'alimentation ou d'autres intrants (cigarette, pollution...).

Les ROS apparaissent donc comme des molécules produites par divers mécanismes physiologiques. A certaines doses, elles sont utiles à l'organisme, mais leur production peut devenir excessive ou résulter de mécanismes toxiques exogènes à l'organisme. Elles peuvent inactiver des protéines, induire des lésions au niveau de l'ADN (Burrows & Muller, 1998) (Cadet et al., 1999) ce qui peut conduire à une altération du message génétique, oxyder les

protéines (Brot & Weissbach, 2000) (Finkel, 2000) (Armstrong & Swallow, 1969) (Huggins, Wells-Knecht, Detorie, Baynes, & Thorpe, 1993), et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire (Favier, 2003b) (Lenzi, 2011).

IV. 2. Les sources du stress oxydant dans la drépanocytose

A. L'auto-oxydation de l'hémoglobine

En présence d'oxygène, l'hémoglobine est capable de s'auto-oxyder, induisant ainsi la formation de méthémoglobine HbFe^{3+} par l'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} . Cette auto-oxydation de l'hémoglobine génère des radicaux libres parmi lesquels les anions superoxydes O_2^- . Bien que ce phénomène soit retrouvé à la fois pour l'Hb A et l'Hb S, des études ont montré que cette dernière avait la capacité de s'auto-oxyder 1,7 fois plus vite que l'Hb A (R P Hebbel, Morgan, Eaton, & Hedlund, 1988). En effet, l'Hb A est capable de contrecarrer ces réactions, à l'inverse de l'Hb S qui se retrouve rapidement submergée par la production continue de O_2^- , puis par sa dismutation en H_2O_2 , ce dernier pouvant produire alors de OH^- .

Par ailleurs la metHb, en absence de réduction du fer par la méthémoglobine réductase, va se dénaturer en hémichromes. Ces hémichromes, retrouvés à des taux très élevés dans la membrane érythrocytaire des GR drépanocytaires (Asakura, Minakata, Adachi, Russell, & Schwartz, 1977), vont favoriser l'oxydation des constituants membranaires des globules rouges.

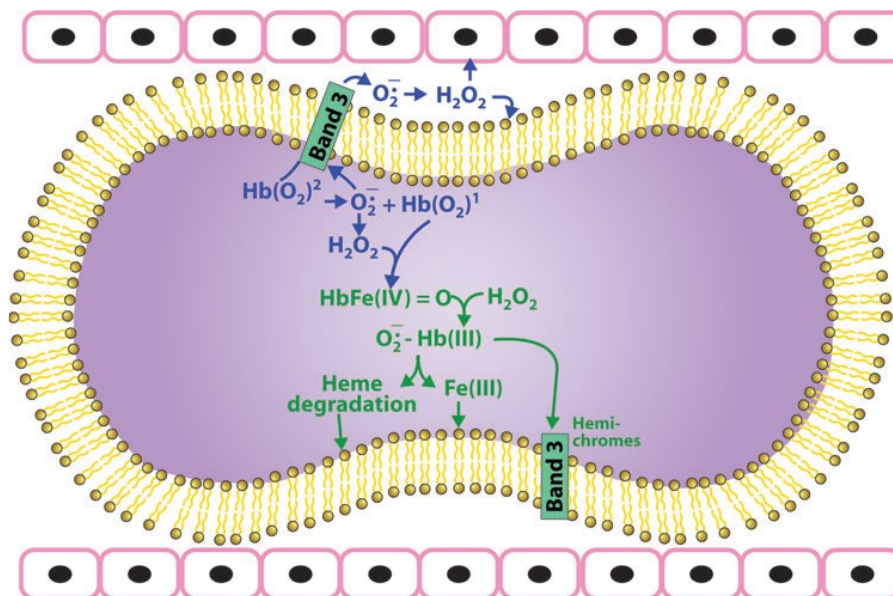


Figure 24 : Réactions d'oxydation associées à une augmentation de l'auto-oxydation de la désoxy-hémoglobine (Rifkind & Nagababu, 2013)

A cause de l'hémolyse intravasculaire constante, des concentrations élevées d'hémoglobine libre (Nagababu et al., 2008) et d'hème plasmatique sont retrouvées chez les patients drépanocytaires à l'état de base (Reiter et al., 2002).

En inactivant le monoxyde d'azote, l'hémoglobine libre réduit sa biodisponibilité, limitant les propriétés vasodilatatives, anti-thrombotiques et anti-inflammatoires du NO (Guzik, Korb, & Adamek-Guzik, 2003) (Reiter et al., 2002).

L'hème hydrophobe libéré dans le plasma s'intercale rapidement dans la membrane plasmique des cellules endothéliales. A ce stade, l'hème libère son fer (Balla et al., 1993) qui va induire l'activation des cellules endothéliales et des dommages liés à la libération non enzymatique des ROS (Jeney et al., 2002).

B. Xanthine oxydase

La restauration du flux sanguin après un épisode prolongé d'hypoxie contribue largement à la production de radicaux libres et aux dommages tissulaires. Les crises vaso-occlusives douloureuses et les épisodes vaso-occlusifs silencieux cliniquement, qui impliquent de façon transitoire le blocage des micro-vaisseaux par les GR rigides, contribuent à ces processus d'ischémie-reperfusion. Des lésions liées à ces processus ont été mises en évidence chez les

souris drépanocytaires soumises à des épisodes d'hypoxie/réoxygénation (Osarogiagbon et al., 2000). Le bas niveau d'oxygène dû à l'interruption de la circulation sanguine provoque la production d'hypoxanthine et de xanthine oxydase à partir de l'adénosine triphosphate et de la xanthine déshydrogénase respectivement (Beetsch, Park, Dugan, Shah, & Gidday, 1998). Lors de la phase de réoxygénation, la xanthine oxydase va produire l'ion superoxyde en catalysant la conversion de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique (Nishino et al., 1997). Parce que les cellules endothéliales de certains tissus exhibent une faible activité de xanthine oxydase (c'est le cas du cerveau) et d'autres une forte activité de l'enzyme (par exemple les intestins), l'importance de cette enzyme comme source de production de ROS reste probablement tissu-dépendante (K. C. Wood & Granger, 2007).

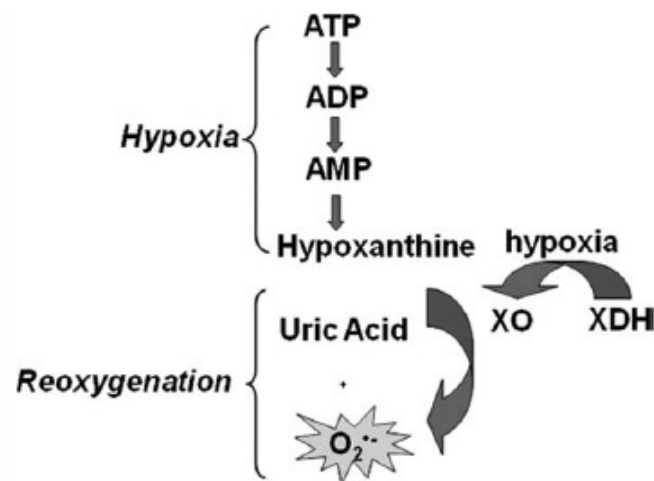
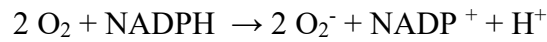


Figure 25 : Production de Xanthine oxydase liée au phénomène d'ischémie / reperfusion

(Chirico & Pialoux, 2012)

C. NADPH oxydase

Les leucocytes et les cellules endothéliales représentent une importante source de ROS dans la drépanocytose via un mécanisme impliquant la NADPH oxydase (K. C. Wood & Granger, 2007). En effet, cette enzyme membranaire des cellules phagocytaires catalyse la réduction de l'oxygène en anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ selon la réaction suivante:



D. Autres sources

- L'hyperhomocystéinémie dans la drépanocytose augmente la production de ROS via un mécanisme impliquant la production de diméthyl-arginine asymétrique qui entre en compétition avec la L-arginine, substrat de l'oxyde nitrique synthase (NOS). En absence de L-arginine, précurseur du NO, la NOS endothéliale (eNOS) se met à produire des ROS au détriment de la production de NO (K. C. Wood & Granger, 2007).

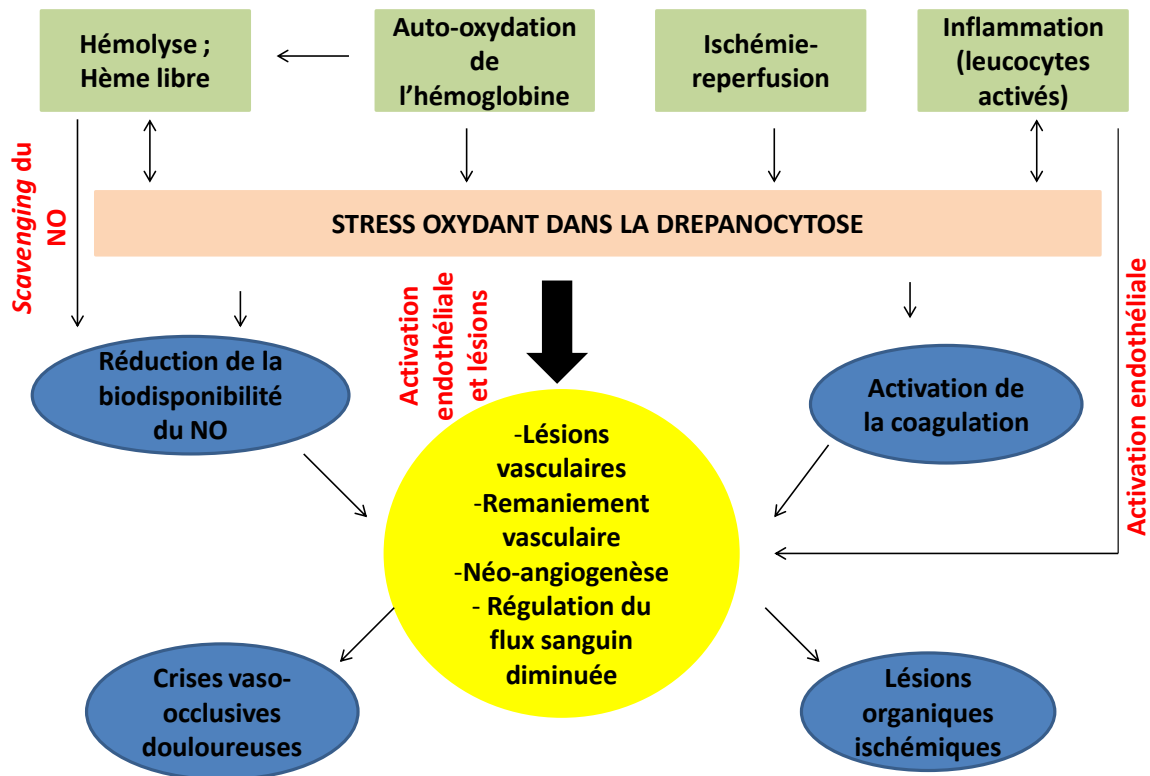


Figure 26 : Sources et rôle physiopathologique du stress oxydant
(Schéma inspiré de Nur et al., 2011)

La production de stress oxydant dans la drépanocytose est multifactorielle et peut s'expliquer par :

- l'hémolyse accrue conduisant à une augmentation de l'hème libre fortement impliquée dans la production de ROS
- l'auto-oxydation de l'hémoglobine S qui engendre une production de ROS 1,7 fois supérieure à celle de l'Hb A
- l'augmentation de l'ischémie-reperfusion, exacerbée par l'adhésion cellulaire à l'endothélium, qui va stimuler la production de ROS via notamment la xanthine oxydase
- le contexte inflammatoire bien caractérisé dans la maladie drépanocytaire. Il est encore aujourd'hui difficile de dire si l'état pro-inflammatoire chronique retrouvé dans la drépanocytose contribue à l'exacerbation du stress oxydant dans la pathologie ou inversement. De plus en plus d'études démontrent une relation plutôt bidirectionnelle entre inflammation et stress oxydant.

Les espèces réactives produites au cours du stress oxydant sont impliquées dans la falciformation des globules rouges, l'adhérence cellulaire à l'endothélium, la modulation du tonus vasculaire et l'inflammation, à l'origine des crises vaso-occlusives douloureuses et des lésions organiques.

IV. 3. Le système de défense anti-oxydant

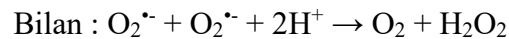
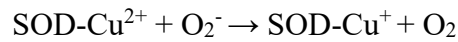
Pour limiter les dommages engendrés par toutes ces réactions oxydatives, le globule rouge est doté d'un ensemble de systèmes de défense anti-oxydants. Ces systèmes sont déficients dans la drépanocytose.

A. Systèmes anti-oxydants enzymatiques

✓ Les Superoxydes Dismutases (SOD)

Elles sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène.

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



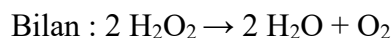
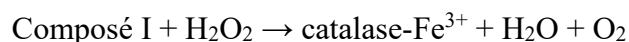
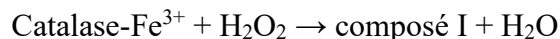
Le peroxyde d'hydrogène formé (H_2O_2) est pris en charge par les catalases (présentes en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques) et les glutathion peroxydases à sélénium.

Gizi et collaborateurs démontrent une augmentation du taux de SOD chez les patients drépanocytaires comparés à des sujets sains et proposent que cette augmentation reflète la tentative de défense des globules rouges drépanocytaires contre le stress oxydant (Gizi et al., 2011). Ces résultats sont en accord avec les observations de Das et Nair (Das & Nair, 1980).

Une étude de Schacter et collaborateurs démontrent que les patients drépanocytaires cliniquement les plus sévères, présentent une réduction de l'activité de la SOD comparés aux patients cliniquement moins sévères, bien que les taux de SOD soient comparables dans les deux groupes (Schacter, Warth, Gordon, Prasad, & Klein, 1988).

✓ La catalase

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



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

Les travaux de Dasgupta et collaborateurs montrent des taux réduits de catalase chez les patients drépanocytaires (Dasgupta, Hebbel, & Kaul, 2006) tandis que ceux de Das et Nair démontrent des taux de catalase plus élevés chez les patients drépanocytaires comparés aux

sujets contrôles (Das & Nair, 1980). L'augmentation de la catalase pourrait être un signal de défense pour capter le maximum d' H_2O_2 tandis que la diminution de la catalase pourrait s'expliquer par la présence écrasante du stress oxydant que le système de défense anti-oxydant défaillant des patients drépanocytaires n'arrive plus à contrecarrer.

✓ Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases constituent sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion, le cytochrome c (cytochrome c peroxydases), le NADH (NADH peroxydases) (Thérond, P., Denis, 2005).

Le glutathion oxydé sera régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH, H^+ , formé principalement par la voie des pentoses phosphates (Bonfont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, 2003) (Thérond, P., Denis, 2005). D'autres enzymes comme la glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases et l'hème oxydase présentent également une activité anti-oxydante relativement importante.

Les travaux de Gizi et collaborateurs démontrent une augmentation de la glutathion peroxydase chez des patients drépanocytaires comparés aux sujets contrôles AA tandis qu'aucune différence relative au taux de glutathion réductase n'était observée entre les deux groupes (Gizi et al., 2011).

Ces résultats sont controversés par les travaux de Cho et collaborateurs qui, eux, démontrent une perte d'activité de 33% de la glutathion peroxydase 1 chez les drépanocytaires comparés à des sujets contrôles, perte corrélée à l'hémolyse retrouvée chez ces patients. Cependant, ils observent chez les patients bénéficiant d'un traitement à l'hydroxyurée une augmentation de 90% de l'activité de la glutathion peroxydase 1 comparés aux patients ne recevant pas d'hydroxyurée (Cho et al., 2010).

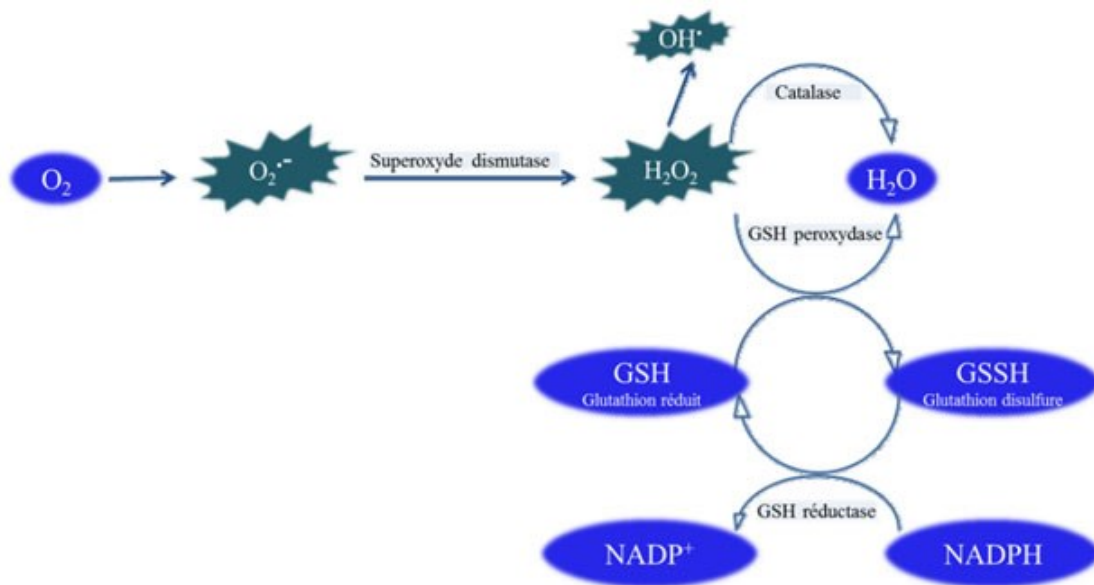


Figure 27 : Mécanismes de défense anti-oxydant

B. Systèmes anti-oxydants non enzymatiques

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles le glutathion, l'acide urique, les vitamines (A, C, E) ou la bilirubine. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le $\bullet NO$ (Favier, 2003a). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger des radicaux peroxydes RO_2 et l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil & Stocker, 1993). Les composés, tels que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes, apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Krinsky, 1989). Des protéines comme l'haptoglobine, la transferrine et l'hémopexine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^+ .

Gizi et collaborateurs observent une diminution de la concentration plasmatique des vitamines A, C et E chez les patients drépanocytaires comparés aux sujets contrôles. De même, cette étude démontre une diminution du taux de glutathion total ainsi qu'une réduction du glutathion réduit chez ces patients comparés aux sujets sains (Gizi et al., 2011).

Cette diminution du glutathion est en accord avec l'étude de Amer et collaborateurs, qui soulignent également la présence d'un stress oxydant exacerbé chez les patients drépanocytaires pouvant être régulé par l'administration de vitamines A, C et E (Amer et al., 2006).

V. Les manifestations de la drépanocytose

La pathologie drépanocytaire est décrite par un panel d'expressions cliniques menaçant au quotidien les patients.

Il semblerait que la nature et la fréquence de ces manifestations soient étroitement liées à l'âge. En effet, la maladie est généralement asymptomatique durant les 3 premiers mois de la vie puisque les cellules contiennent suffisamment d'hémoglobine foétale pour empêcher la polymérisation de l'hémoglobine S. Puis peu à peu, l'Hb F laisse place à l' Hb S et les patients expérimentent plutôt des complications aiguës entre 6 mois et 5 ans telles qu'anémie, infection, CVO et accidents vasculaires cérébraux. Entre 5 et 20 ans, il y a plutôt apparition des crises vaso-occlusives associées ou non à des syndromes thoraciques aigus et des accidents vasculaires cérébraux. A un âge plutôt avancé, ce sont les complications dégénératives telles que les ulcères de jambes, néphropathies et ostéonécroses qui prennent le relais.

Bien que les causes de cette variabilité phénotypique ne sont pas encore totalement comprises, certains facteurs tels que l'environnement, la prise en charge ou encore l'hétérogénéité génétique des patients doivent être pris en compte.

Gladwin et Vichinsky (Gladwin & Vichinsky, 2008) proposent que les manifestations de la maladie soient comprises comme une interaction entre deux sous-phénotypes, conduits par les deux mécanismes majeurs de la maladie : la vaso-occlusion et l'hémolyse.

V. 1. Phénotype hémolytique avec dysfonction endothéliale

Certaines complications telles que l'hypertension artérielle pulmonaire, les ulcères de jambes, le priapisme ou encore les accidents vasculaires cérébraux (AVC) découleraient du phénotype hémolytique, associé à de faibles taux d'hémoglobine découlant de l'hémolyse intravasculaire. Toutes ces complications résulteraient donc d'une diminution de la biodisponibilité du NO causée par l'hémolyse exacerbée (Kato et al., 2007) et menant à une dysfonction endothéliale et une vasculopathie chronique pouvant toucher divers organes (Robert P Hebbel, 2004).

L'anémie hémolytique chronique est une complication majeure de la maladie. Les GR, subissant des cycles répétés de falciformation/défalciformation, sont fragilisés. Il en découle une diminution conséquente du taux d'hémoglobine (entre 6 et 9.5 g/dl versus 12-16 g/dl chez

des individus non drépanocytaires), un hémocrite nettement abaissé (en moyenne 24% contre 40% pour des individus sains) et une augmentation du taux de réticulocytes (supérieur à 200000/mm³).

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est un terme générique regroupant différentes entités cliniques ayant en commun une augmentation progressive des résistances artérielles périphériques et entraînant à terme une défaillance du cœur droit. On en distingue trois grands types : HTAP précapillaire associée à une vasculopathie proliférative, HTAP post capillaire résultant d'un dysfonctionnement diastolique et / ou systolique du cœur gauche et HTAP hyperkinétique en relation avec un hyper débit cardiaque. De nombreux arguments suggèrent la présence non mutuellement exclusive de ces trois types d'HTAP dans le contexte drépanocytaire (Anthi et al., 2007). Cette complication est retrouvée dans 30% de patients drépanocytaires de certaines cohortes Américaines et a été associée à une augmentation du risque de mortalité dans les deux ans qui suivent son diagnostic (Gladwin et al., 2004) (Oswaldo Castro, Hoque, & Brown, 2003) (Ataga et al., 2006) (Machado et al., 2006). Des corrélations positives entre l'anémie mais aussi l'hémolyse intra-vasculaire, signée par les taux plasmatiques de bilirubine, d'hémoglobine plasmatique, de lactate déshydrogénase et la survenue de cette complication ont été amplement documentées, illustrant le lien existant entre la diminution de la biodisponibilité du NO et l'HTAP (Gladwin et al., 2004) (Kato et al., 2006).

L'ulcère de jambe est une perte de substance cutanée chronique sans tendance à la cicatrisation spontanée. Lorsque la cicatrisation se produit, la peau reste fine, atrophique, fragile et la récurrence est fréquente.

Rares chez l'enfant, la fréquence des ulcères de jambe augmente avec l'âge, entre 10 et 20 ans (Adedeji & Ukoli, 1987).

Divers facteurs potentiels altérant la fonction endothéliales seraient mis en jeu tels que : obstruction mécanique par les globules rouges drépanocytaires denses, insuffisance veineuse, infections bactériennes, thrombose *in situ*, anémie, diminution de la biodisponibilité du NO (Mack & Kato, 2006) (J S Mohan, Marshall, Reid, Thomas, & Serjeant, 1997).

Le priapisme est une complication vaso-occlusive fréquente de la drépanocytose, se définissant comme une érection prolongée (plusieurs heures ou jours), survenant de façon involontaire. Cette érection inappropriée devient rapidement douloureuse. On la retrouve chez 2% à 6% des enfants drépanocytaires et chez 38% à 42% des adultes drépanocytaires, 57% des patients présentant plusieurs épisodes (Bachir D, Virag R, Lee K, Bellay M, De

Montalembert M & L, 1997) (Santin, 2003). Chez les drépanocytaires, le priapisme ischémique est le plus courant (Roupret M, Beley S, Traxer O, Kirsh-Noir F, Jouanet P, Jardin A, 2005) (Dekou A., Ouegnin G.A., Konan P.G., Kouame B., 2006) et est associé à une diminution du flux sanguin veineux, une hypoxie, une acidose et une ischémie tissulaire.

L'accident Vasculaire Cérébral (AVC) est une interruption brutale de l'irrigation sanguine du cerveau. Les symptômes cliniques les plus fréquents sont l'hémi-parésie, l'aphasie ou la dysphasie, avec ou sans convulsions.

L'AVC est un risque majeur de mortalité chez les drépanocytaires adultes (Platt et al., 1994) ou enfants (Leikin et al., 1989), touchant préférentiellement les patients homozygotes SS (Ohene-Frempong, 1991). Parmi les facteurs favorisant la survenue d'AVC hémorragiques, sont suggérés des taux faibles d'hémoglobine, des antécédents de STA et une pression artérielle systolique élevée. Les facteurs à l'origine des AVC ischémiques sont plutôt associés à une concentration faible d'hémoglobine et une hyperleucocytose (Ohene-Frempong, 1991).

Les atteintes structurales et fonctionnelles des reins comprennent des anomalies de la fonction tubulaire, des anomalies glomérulaires et une hématurie (Wigfall, Ware, Burchinal, Kinney, & Foreman, 2000).

L'hyperfiltration glomérulaire est directement impliquée dans la pathogenèse de **la glomérulopathie** pouvant conduire à une atteinte rénale plus sévère (Allon, 1990), cause importante de mortalité des patients drépanocytaires (Platt et al., 1994). La protéinurie, présente chez 20 à 30% des patients drépanocytaires (Falk & Jennette, 1994), marque la présence d'une glomérulopathie et est plus fréquemment retrouvée chez les homozygotes SS. Parmi les facteurs favorisant la glomérulopathie, une hémolyse chronique est suggérée (Laurance et al., 2011) et l' α -thalassémie serait au contraire un facteur protecteur (Nebor et al., 2010).

V. 2. Phénotype hyper-visqueux et vaso-occlusif

D'autres complications seraient, elles, le résultat d'un phénotype plutôt hyper-visqueux et vaso-occlusif. C'est le cas des crises douloureuses, du syndrome thoracique aigu et de l'ostéonécrose dans lesquels on retrouve plutôt de forts taux d'hémoglobine et une augmentation du nombre de leucocytes (Gladwin & Vichinsky, 2008).

La douleur est la manifestation principale de la drépanocytose (Ballas, 1998) (Benjamin, Swinson, & Nagel, 2000) (Serjeant, 1992). Elle survient par accès. Ces **crises vaso-occlusives**

(CVO) sont de fréquence, d'intensité et de durée variables (de quelques heures à quelques jours). Ce sont des épisodes douloureux provoqués par des micro-infarctus consécutifs à l'occlusion des vaisseaux sanguins (Ballas, 1998) (Serjeant, 1992) (Steinberg & Rodgers, 2001). Les CVO sont le plus souvent osseuses et touchent le plus souvent les os long, le rachis, le bassin. Elles peuvent également toucher le thorax et l'abdomen. Les CVO sont l'une des complications les plus invalidantes de la maladie (Cnaan & Ryan, 1989). Elles peuvent évoluer vers d'autres complications, notamment les syndromes thoraciques aigus, pouvant engager le pronostic vital des patients drépanocytaires. (Platt et al., 1991) démontre que les patients SS de moins de 20 ans expérimentant le plus de crises douloureuses ont également le risque de décès le plus important.

Les crises peuvent survenir à tout âge et guérissent habituellement sans séquelles. Elles peuvent se manifester très tôt dans l'enfance, mais elles deviennent fréquentes à l'adolescence et à l'âge adulte, surtout entre 15 et 30 ans (Platt et al., 1991) (Gill et al., 1995).

Le mécanisme à l'origine des CVO est la falciformation des globules rouges et l'obstruction des vaisseaux sanguins qui en découle. Mais plusieurs autres facteurs peuvent favoriser le déclenchement des CVO (Embury, 2004) (R P Hebbel, 1991) : l'inflammation, le stress oxydant, l'hémolyse et le contexte pro-adhésif de la maladie. D'autres facteurs tels que le froid, la déshydratation, le stress, les émotions, les infections et d'une manière général tout ce qui augmente les besoins en oxygène sont également suggérés.

Le syndrome thoracique aigu (STA) est caractérisé par une douleur thoracique, de la fièvre, des râles pulmonaires, et un infiltrat sur la radiologie de thorax (E. P. Vichinsky et al., 2000). D'un point de vue physiopathologique, le STA se caractérise par une obstruction de la microcirculation pulmonaire notamment des veinules post-capillaires (Haupt, Moore, Bauer, & Hutchins, 1982) (Oppenheimer & Esterly, 1971) favorisée par les infections virales ou bactériennes, l'embolie graisseuse, l'hypoventilation alvéolaire ou l'infarctus pulmonaire (Gladwin & Vichinsky, 2008). Le STA est une cause fréquente d'hospitalisation des sujets drépanocytaires (O Castro et al., 1994). Chez l'adulte, le STA représente une cause importante de mortalité (O Castro et al., 1994) (Platt et al., 1994) (E. P. Vichinsky et al., 2000). Parmi les facteurs de risque du STA, une hémoglobine élevée, une faible concentration en hémoglobine fœtale et un taux de leucocytes élevé ont été suggérés (O Castro et al., 1994) (Platt et al., 1994) (Johnson, 2005).

L'ostéonécrose est une maladie osseuse consistant en une dégénérescence progressive des cellules corticales et médullaires aboutissant finalement à une trame osseuse vide. Cette pathologie surgit au moment où l'irrigation vasculaire du tissu est interrompue.

Dans la drépanocytose, l'obstruction des micro-vaisseaux par les globules rouges falciformés serait à l'origine de l'ostéonécrose. Certains facteurs tels que le génotype homozygote SS (Powars, Hiti, Ramicone, Johnson, & Chan, 2002) ou un taux d'hémoglobine élevé (Hawker, Neilson, Hayes, & Serjeant, 1982) (Mukisi-Mukaza, Gomez-Brouchet, Donkerwolcke, Hinsenkamp, & Burny, 2011) augmenteraient le risque de survenue d'ostéonécrose. Il semblerait également que l' α -thalassémie et les crises vaso-occlusives fréquentes soient également des facteurs favorisant le développement d'ostéonécrose de la tête fémorale (Milner et al., 1991).

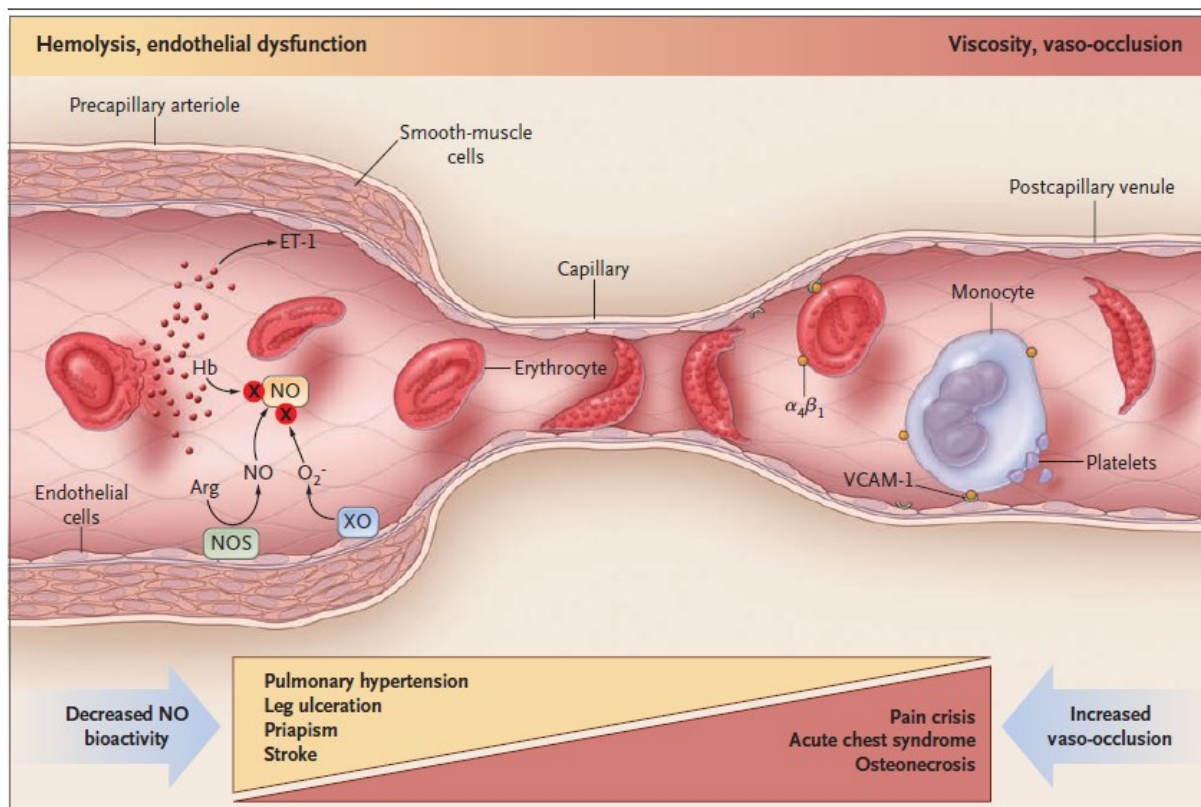


Figure 28 : Mécanismes hypothétiques des sous-phénotypes cliniques de la drépanocytose (Gladwin & Vichinsky, 2008)

Cependant, il semblerait que la physiopathologie de la drépanocytose soit en réalité plus complexe que le modèle proposé par Gladwin. Des processus oxydatifs pourraient intervenir dans l'un et/ou l'autre des sous-phénotypes, influencer les mécanismes impliqués dans les différentes complications de la maladie et apporter aussi un nouvel éclairage sur les mécanismes de la vaso-occlusion.

Par ailleurs, ce modèle peut encore être affiné puisque cette classification en deux sous-phénotypes ne prend pas en compte la contribution de la rhéologie sanguine. En effet, il semblerait que les mêmes anomalies de la rhéologie sanguine puissent être retrouvées dans des complications appartenant à ces deux sous-phénotypes. C'est le cas par exemple, d'un seuil de désagrégation érythrocytaire élevé retrouvé à la fois chez des enfants drépanocytaires SC et les garçons SS présentant un STA (phénotype visqueux vaso-occlusif) et chez des patients drépanocytaires SS présentant une glomérulopathie (phénotype hémolytique). A contrario, d'autres paramètres hémorhéologiques ne présentent pas les mêmes types d'anomalies pour des complications appartenant au même sous-phénotype. C'est le cas de la viscosité sanguine qui semble jouer un rôle central dans le déclenchement des CVO mais pas dans l'ostéonécrose, alors que ces deux complications appartiennent au sous-phénotype visqueux/vaso-occlusif (Y Lamarre, 2013).

De même, ce modèle ne prend pas en compte l'activité du système nerveux autonome (SNA) qui pourrait moduler les mécanismes physiopathologiques à l'origine des diverses complications (Connes & Coates, 2013) (Connes, 2011) (Romero Mestre, Hernández, Agramonte, & Hernández, 1997) (Pearson et al., 2005). Un dysfonctionnement autonome peut aboutir à des anomalies du contrôle vasculaire mais aussi à une exacerbation de l'inflammation (Tracey, 2002) (Olofsson, Rosas-Ballina, Levine, & Tracey, 2012) (Huston & Tracey, 2011), favorisant ainsi des phénotypes inflammatoires et pro-oxydant largement impliqués dans la pathogenèse des crises vaso-occlusives douloureuses. L'analyse de l'activité du système nerveux autonome pourrait donc être une méthode non invasive utile à la caractérisation de la sévérité clinique de la drépanocytose.

En prenant en compte l'évaluation de tous ces paramètres, le modèle proposé par Gladwin et Vichinsky pourrait être précisé, et contribuer à une meilleure compréhension de la variabilité d'expressions des symptômes d'un individu à un autre, caractérisant la drépanocytose.

VI. Crises vaso-occlusives et stress oxydant

Comme précédemment indiqué, les cycles de falciformation / défalciformation du GR génèrent un cercle vicieux avec un phénomène de type ischémie-reperfusion qui induit une réponse inflammatoire caractérisée par une leucocytose et par l'expression au niveau des cellules endothéliales de cytokines inflammatoires et de molécules d'adhésion ainsi que la présence de cellules endothéliales circulantes activées (Kaul & Hebbel, 2000) (Platt, 2000). Cette séquence d'événements est aussi source d'un stress oxydant avec la production de radicaux libres. De plus, la répétition des cycles de falciformation des globules rouges, couplée à l'instabilité inhérente de l'Hb S et la déficience des mécanismes de lutte contre la production de radicaux libres du globule rouge drépanocytaire constituent une seconde source de dommages oxydatifs. Ainsi, le GR, cible des espèces réactives de l'oxygène produites dans cet environnement pro-inflammatoire et pro-oxydant est susceptible de présenter différentes anomalies fonctionnelles. Le stress oxydant pourrait ainsi avoir un rôle majeur dans les troubles circulatoires caractéristiques de la maladie drépanocytaire, et à l'origine de CVO, en participant aux anomalies hémorhéologiques et aux anomalies d'adhérence du GR aux cellules endothéliales.

VI. 1. Adhérence

Les modifications induites par le stress oxydant au sein de la membrane du globule rouge sont susceptibles, pour certaines, de favoriser l'adhérence anormale des globules rouges drépanocytaires aux cellules endothéliales (Corbett & Golan, 1993) (Matarrese et al., 2005) (Thevenin, Crandall, Ballas, Sherman, & Shoheit, 1997).

Différents travaux ont montré que l'oxydation de l'érythrocyte génère au niveau d'une de ses protéines membranaires, la protéine bande 3, des motifs antigéniques qui peuvent être reconnus par des auto-anticorps anti bande 3 de type Ig G. Ces réarrangements de la protéine bande 3, qui permettent l'exposition de séquences peptidiques normalement enfouies dans la bicouche lipidique membranaire, confèrent aux globules rouges un potentiel "pro-adhésif" et la capacité de se lier aux molécules CD36 des cellules endothéliales de la microcirculation (Barshtein, Ben-Ami, & Yedgar, 2007) ainsi qu'à d'autres récepteurs endothéliaux non encore identifiés à ce jour (R P Hebbel, 2008).

Les résultats d'une étude de Thevenin et collaborateurs résultats montrent que des peptides synthétiques de protéine bande 3 inhibent complètement l'adhérence des globules rouges à

une couche de cellules endothéliales (Thevenin et al., 1997). En accord avec cette étude, les résultats de Koshkaryev et collaborateurs montrent que des globules rouges traités avec des agents connus pour induire le clustering de la protéine bande 3, favorisent effectivement ce processus et augmentent l'adhérence des globules rouges (Koshkaryev A., 2004).

Ces données renforcent l'implication de la protéine bande 3 dans les processus d'adhérence du globule rouge à l'endothélium vasculaire et confortent ainsi l'hypothèse du rôle de cette protéine dans l'étiologie de la vaso-occlusion.

Par ailleurs, dans la drépanocytose, l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) est favorisée par le stress oxydant (R P Hebbel, 1984). Une étude a suggéré une diminution de l'activité de la translocase durant le vieillissement naturel et induit des érythrocytes humains, comme conséquence du stress oxydant (Herrmann & Devaux, 1990).

De nombreuses études démontrent que l'externalisation de la PS participe au caractère pro-adhésif des globules rouges, favorisant ainsi la vaso-occlusion.

Setty et collaborateurs proposent que l'activation des cellules endothéliales induit l'externalisation membranaire d'un récepteur à la PS normalement peu exprimé en condition basale, permettant les interactions entre globules rouges et endothélium (B. N. Y. Setty & Betal, 2008).

Une autre étude propose que les globules rouges exprimant la PS à leur surface se lient à la TSP via son domaine de liaison à l'héparine, favorisant l'adhésion des cellules à l'endothélium (Gayen Betal & Setty, 2008).

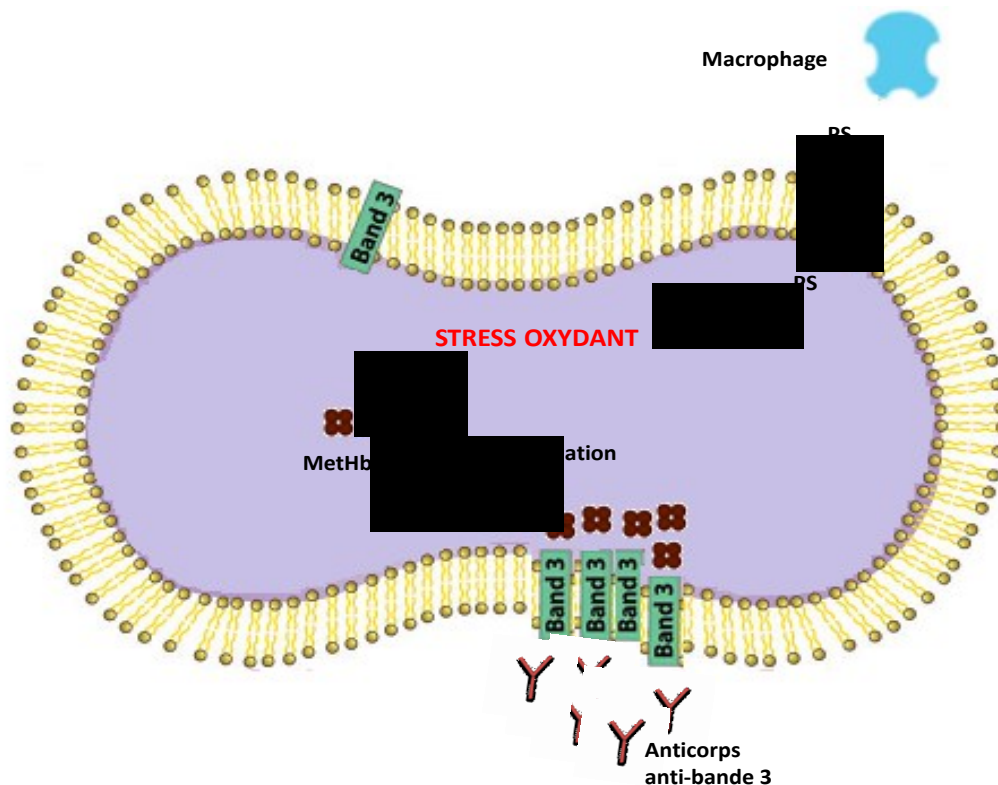


Figure 29 : Oxydation du GR : augmentation adhérence du GR

(Schéma modifié de Rifkind & Nagababu, 2013)

VI. 2. Autres altérations : Déshydratation, anomalies hémorhéologiques, émission de MPs

Le stress oxydant est susceptible d'induire une perturbation de l'homéostasie des cations résultant de l'activation de canaux potassiques Ca^{2+} -dépendants ou "canaux Gardos", qui entraîne une perte d'ions K^+ responsable de la déshydratation des globules rouges et de l'apparition de globules rouges denses et irréversiblement falciformés (Shartava, McIntyre, Shah, & Goodman, 2000).

De même, l'ensemble des anomalies rhéologiques caractéristiques du globule rouge drépanocytaire pourraient avoir un lien avec l'oxydation cellulaire comme l'attestent les études mettant en évidence un impact des espèces réactives de l'oxygène sur les paramètres rhéologiques du globule rouge dans un contexte différent de celui de la drépanocytose (Baskurt, Temiz, & Meiselman, 1998) (Kaul, Koshkaryev, Artmann, Barshtein, & Yedgar, 2008) (Yesilkaya, Ertug, Yegin, Melikoglu, & Baskurt, 1998). Ces études montrent que des

réactifs qui augmentent la peroxydation des lipides membranaires et le cross-linking des protéines du squelette membranaire affectent la déformabilité et/ou l'agrégation des globules rouges.

L'hyper-agrégation érythrocytaire mise en évidence chez le sujet drépanocytaire et la très grande variabilité de la valeur du seuil de désagrégation érythrocytaire d'un patient drépanocytaire à l'autre, pourraient être associés à la présence de dommages oxydatifs exprimés à des degrés divers chez ces sujets. Il reste encore à établir si cette hyper-agrégation érythrocytaire est susceptible de moduler ou non la survenue des CVO.

Le stress oxydant est également à l'origine d'une activation cellulaire et/ou un processus d'apoptose provoquant l'émission de microparticules issues de différents types cellulaires, plaquettes, érythrocytes, granulocytes, monocytes, lymphocytes, cellules endothéliales (Hugel et al., 2005). Il pourrait être ainsi impliqué dans le taux anormalement élevé de microparticules détecté chez le drépanocytaire au cours des crises vaso-occlusives (Shet et al., 2003) (van Beers et al., 2009) (van Tits et al., 2009).

Les MPs sont décrites comme des effecteurs de l'inflammation car capables d'activer l'endothélium en stimulant la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL8) et d'induire l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 ainsi que l'E-sélectine (Nomura et al., 2001). Cette activation de l'endothélium va permettre l'adhésion, créant un contexte favorable à la vaso-occlusion.

Ainsi, au-delà de la polymérisation de l'hémoglobine S, toutes ces anomalies accentuées par le stress oxydant peuvent également conduire à l'obstruction des vaisseaux sanguins d'une part en favorisant la falciformation érythrocytaire et d'autre part en favorisant l'adhérence cellulaire. L'altération du flux sanguin résultante est ainsi susceptible de contribuer au développement des crises vaso-occlusives.

Hemorheological alterations:
Decreased deformability
Enhanced aggregation

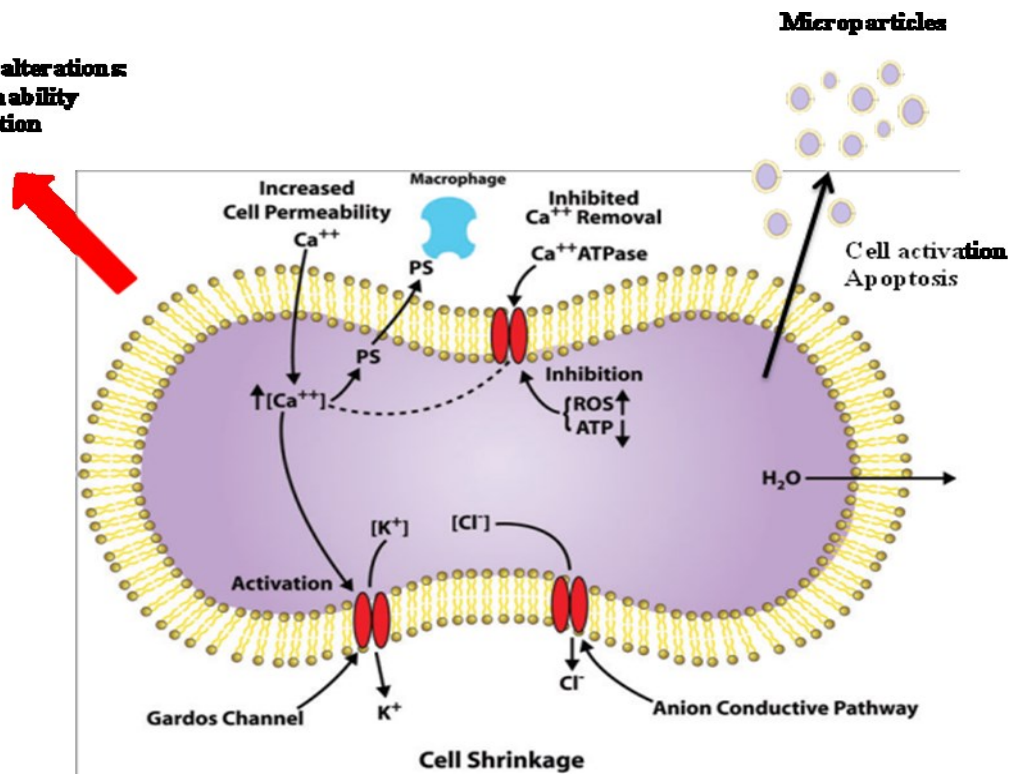


Figure 30 : Anomalies érythrocytaires favorisées par le stress oxydant
 (Schéma modifié de (Rifkind & Nagababu, 2013))

VII. Crises vaso-occlusives et implication du système nerveux autonome dans la drépanocytose

Comme on a pu voir dans les chapitres précédents, les mécanismes physiopathologiques de la vaso-occlusion sont complexes et mettent en jeu des processus intriqués parmi lesquels un dysfonctionnement vasculaire en lien avec la dérégulation des molécules vaso-actives (NO et ET-1) et des processus d'adhérence favorisés par un contexte inflammatoire. Plus récemment, une étude menée par notre groupe (Nebor et al., 2011) a démontré, chez des patients drépanocytaires ayant eu plusieurs CVO, un fort déséquilibre du Système Nerveux Autonome (SNA) en faveur d'une diminution du SN parasympathique.

Puisqu'un lien entre le Système Nerveux Autonome (SNA) et l'inflammation est établi depuis une dizaine d'années (Tracey, 2002), et que l'activité du SNA pourrait être régulé par le NO (Sangkatumvong et al., 2011), il nous apparaît pertinent de poser la question du rôle du SNA dans les mécanismes impliqués dans le déclenchement de la vaso-occlusion.

Le Système Nerveux Autonome (SNA) régule et coordonne les fonctions végétatives (les fonctions viscérales), intervenant dans la plupart des métabolismes, assurant l'homéostasie et les adaptations à l'environnement (systèmes circulatoires, respiratoires, excrétoires, thermiques...). Il participe de fait aux comportements, en particulier les comportements soutenus par les émotions: adaptations cardio-respiratoires, vasodilatation, sudation... (par exemple en cas de peur). Le SNA est donc responsable du maintien des fonctions cardiaques, intestinales, pulmonaires et des fonctions vasculaires périphériques.

Il est appelé système nerveux autonome car la majorité de ses fonctions s'exercent de manière "automatique", indépendamment de tout contrôle volontaire et conscient. Il est en effet en grande partie autorégulé et possède ses propres mécanismes de gestion.

Les systèmes sympathique et parasympathique représentent les deux divisions principales du SNA. Ils ont des fonctions parallèles, mais l'organisation de leurs voies, ainsi que leurs neurotransmetteurs, sont très différents.

L'activité du SNA est établie par la mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque (VFC). Cette méthode est basée sur les analyses mathématiques temps-fréquence d'exploration des variations des suites d'intervalles R-R de l'électrocardiogramme, c'est-à-dire le délai entre deux battements cardiaques. Elle est réalisée à partir d'enregistrements provenant de cardio-fréquencemètres (Suunto Memory Belt ou AmBit).

Alors que dans des conditions physiologiques il existe une balance entre activité du SN parasympathique et activité du SN sympathique, un déséquilibre en faveur de l'activité sympathique est présent chez les drépanocytaires à l'état de base (Inamo et al., 2009) (Romero Mestre et al., 1997) (Sangkatumvong et al., 2011). Par ailleurs, chez les drépanocytaires, le stress et les variations brutales de température sont connus comme étant des facteurs pouvant déclencher les crises vaso-occlusives douloureuses. Ces facteurs sont également connus pour moduler l'activité du SNA (Sangkatumvong et al., 2011) (Connes, 2011) (Connes & Coates, 2013) (Alexy et al., 2010) (Romero Mestre et al., 1997).

De même, le phénotype pro-inflammatoire caractéristique de la drépanocytose pourrait être relié aux anomalies du SNA mis en évidence chez les sujets drépanocytaires. En effet, Tracey et collaborateurs démontrent que, le système nerveux parasympathique est capable d'inhiber la libération de cytokines par les leucocytes (Tracey, 2002). Ainsi les altérations du SNA chez les drépanocytaires pourraient moduler le contexte pro-inflammatoire déjà bien documenté dans la maladie et jouer un rôle dans les processus vaso-occlusifs.

Au-delà de l'étude récemment menée par Nébor (Nebor et al., 2011) démontrant un fort déséquilibre du SNA en faveur d'une diminution du SN parasympathique chez les drépanocytaires ayant eu plusieurs CVO, d'autres complications de la drépanocytose telles que les ulcères de jambes, les priapismes ou les syndromes thoraciques aigus, ont été plus fréquemment retrouvées chez les patients présentant des dysfonctions dans l'activité du SNA (J S Mohan et al., 1997) (Oguanobi et al., 2012) (Knight-Madden et al., 2013).

En regard de tous ces travaux de recherche, le lien entre le déséquilibre du SNA et le développement des CVO mérite d'être approfondi.

VIII. Stratégies thérapeutiques

La drépanocytose, en dépit de son caractère monogénique, s'exprime de façon très variable d'un point de vue clinique. Malgré la grande avancée des travaux de recherche réalisés au cours des dernières décennies, les moyens thérapeutiques utilisés restent très pauvres. La maladie suscite encore de nombreuses interrogations et reste au cœur d'une recherche intense.

VIII.1. Le dépistage néonatal et l'éducation thérapeutique

Etant donné que le pronostic d'un syndrome drépanocytaire majeur est d'autant plus favorable que sa prise en charge est précoce, il est devenu impératif d'en effectuer le diagnostic dès la naissance. Plusieurs programmes de dépistage ont été développés d'abord à titre expérimental aux Antilles à partir de 1981 et en France métropolitaine à partir de 1985 (Girot R, Galactéros F, Lena-Russo D & Bardakdjian-Michau J, 1990). En 1984, le dépistage néonatal systématique est mis en place en Guadeloupe mais ce n'est qu'en 2000, qu'un programme de dépistage néonatal national et ciblé de la drépanocytose est généralisé en France métropolitaine (M. de Montalembert, 2007). Ces stratégies sont efficaces pour réduire morbidité et mortalité.

Parallèlement au dépistage néonatal, l'éducation thérapeutique joue un grand rôle dans l'amélioration de la prise en charge des enfants drépanocytaires. Les parents sont éduqués en particulier pour reconnaître les signes précoces d'une complication menaçant le pronostic vital : fièvre élevée, pâleur, asthénie, augmentation du volume de la rate (ces derniers signes faisant redouter une séquestration splénique aiguë). On leur apprend aussi à augmenter les apports hydriques, à éviter certains facteurs de risque de complication vaso-occlusive tels que le changement brutal de température ou la déshydratation.

VIII. 2. Traitements préventifs des infections, traitements antalgiques et transfusion sanguine

Les infections bactériennes sont la première cause de décès chez l'enfant drépanocytaire (Quinn, Rogers, & Buchanan, 2004) (A. N. Thomas, Pattison, & Serjeant, 1982) (Leikin et al., 1989). Une étude randomisée a montré qu'un traitement quotidien par pénicilline donné 2 fois

par jour réduisait de 84% l'incidence des infections à pneumocoque dans le groupe traité versus le groupe placebo (Gaston et al., 1986).

Etant donné le risque de non-compliance d'une part, et l'augmentation de la fréquence des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline d'autre part, une vaccination anti-pneumococcique doit aussi être systématiquement réalisée chez les enfants drépanocytaires (M. de Montalembert, 2007).

Les crises vaso-occlusives étant les complications les plus fréquentes de la drépanocytose, les antalgiques sont donc les médicaments les plus utilisés par les drépanocytaires pour soulager la douleur. En effet, chaque drépanocytaire est habitué à reconnaître le début de sa crise et selon l'intensité il peut prendre des antalgiques à base de paracétamol ou de codéine. Mais si la crise est très intense ou persistante, une prise en charge plus adaptée par des professionnels de santé s'avère nécessaire et l'administration d'antalgiques plus forts tels que les morphiniques peuvent être utilisés. Les patients en proie à des crises peuvent être hospitalisés ou traités en ambulatoire, selon la gravité de la CVO.

Les programmes d'échanges transfusionnels réguliers visent à remplacer les globules rouges anormaux de la personne drépanocytaire par des globules rouges normaux provenant de donneurs de sang sains.

La thérapeutique transfusionnelle est une des principales approches pour la prise en charge de la drépanocytose (Ataga, 2009) (Buchanan, Vichinsky, Krishnamurti, & Shenoy, 2010). La transfusion est un traitement efficace pour la plupart des complications, car elle permet d'augmenter le taux d'hémoglobine (Hb) et donc la capacité du sang à transporter l'oxygène, tout en diminuant le taux de globules rouges falciformes (Stuart & Nagel, 2004) (E. Vichinsky, 2001).

Un des objectifs de cette thérapie est de ramener la concentration d'hémoglobine S à moins de 30 % du taux total d'Hb, sans toutefois dépasser 11 g/dl (ou hématocrite de 35 %), un niveau au-delà duquel des complications par augmentation de la viscosité sanguine peuvent apparaître (Schmalzer, Lee, Brown, Usami, & Chien, 1987)

On reconnaît de plus en plus le bénéfice des transfusions chroniques dans la réduction des taux d'hospitalisations dues aux crises vaso-occlusives, aux syndromes thoraciques aigus, aux infections et aux AVC (Styles & Vichinsky, 1994). De plus, étant donné que l'espérance de

vie continue d'augmenter, de plus en de plus de patients sont susceptibles de recevoir une thérapeutique transfusionnelle de longue durée (Claster & Vichinsky, 2003).

Toutefois, cette approche n'est pas sans effet secondaire. En effet, la transfusion est réservée à des indications très strictes du fait, d'une part des risques d'allo-immunisation chez les patients polytransfusés dont les phénotypes érythrocytaires peuvent être très différents de ceux des donneurs de sang en majorité d'origine européenne, et d'autre part de la surcharge en fer pouvant entraîner des conséquences néfastes (Anie & Massaglia, 2014) (Marsella & Borgna-Pignatti, 2014).

VIII.3. La greffe de moelle

C'est le seul traitement actuellement disponible qui permet de guérir définitivement la maladie. La moelle osseuse est l'organe qui produit en permanence les globules rouges. La transplantation de moelle osseuse consiste d'abord à détruire la moelle osseuse du sujet drépanocytaire (par de la chimiothérapie) puis à remplacer celle-ci par une moelle saine prélevée chez un donneur HLA compatible. En France, Bernaudin et collaborateurs a colligé 87 greffes entre 1988 et 2004. La survie globale et la survie sans maladie ont été respectivement de 93,1 et 86,1 % (Bernaudin et al., 2007). La greffe est réalisée, en règle générale, à partir d'un frère ou d'une sœur compatible. Dans certains cas, lorsqu'un nouveau-né est attendu dans la famille d'un enfant drépanocytaire, on propose de prélever à la naissance le sang de cordon. Ce sang est riche en « cellules souches hématopoïétiques », cellules qui peuvent être utilisées, tout comme la moelle osseuse pour une greffe, si le nouveau-né est HLA identique et non malade.

VIII. 4. L'hydroxyurée

L'hydroxyurée représente un progrès important dans le traitement de la drépanocytose. En effet, elle est associée à une augmentation du taux d'Hb F chez les patients initialement traités (Charache et al., 1992), interrompant ainsi le processus de polymérisation de l'hémoglobine S en s'intercalant dans les fibres en formation. De plus, de nombreuses études ne cessent de démontrer les effets bénéfiques de l'hydroxyurée tels que la diminution de la fréquence de survenue des CVO et des STA, la diminution du nombre d'hospitalisation et de transfusion des patients drépanocytaires (Charache et al., 1995) (Strouse et al., 2008), une amélioration du développement et de la croissance de l'enfant drépanocytaire (Hankins et al., 2005) (Wang et

al., 2002) ainsi qu'une prévention des dysfonctions spléniques (Hankins et al., 2005) et des AVC (Ware, Zimmerman, & Schultz, 1999). Il est à noter que les effets bénéfiques de l'hydroxyurée ne résulteraient pas uniquement de son action sur le globule rouge mais également sur les autres éléments figurés du sang et sur les cellules endothéliales (Chaar et al., 2014) (Laurance et al., 2010) (M-H Odièvre, Lapoumèroulie, & Elion, 2009).

VIII.5. Les anti-oxydants

En regard du contexte oxydatif bien présent dans la drépanocytose, la question d'un développement thérapeutique basée sur l'administration d'agents réducteurs ou anti-oxydants s'est naturellement posée. Plusieurs travaux de recherche se sont donc orientés sur cette voie, essentiellement sur des modèles animaux. Cependant, il n'y a que peu d'essais cliniques disponibles, principalement au stade 3, ce qui limite l'évaluation réelle de ces thérapies anti-oxydantes dans la maladie drépanocytaire (Silva, Belini Junior, de Almeida, & Bonini-Domingos, 2013).

Ainsi une étude *in vitro* démontre que la N-acétylcystéine, acide aminé non essentiel stimulant la production de glutathion, diminuerait de façon significative la formation des globules rouges falciformés et les ramènerait à leur forme biconcave (Gibson et al., 1998). Nur et collaborateurs rapportent également que la N-acétylcystéine semble réduire le stress oxydant présent chez les patients drépanocytaires (Nur et al., 2012).

Les résultats de Cho et collaborateurs démontrent que l'effet bénéfique de l'hydroxyurée semble passer par un mécanisme en partie lié à l'augmentation de la glutathion peroxydase, anti-oxydant enzymatique puissant, via une voie de signalisation cellulaire mettant en jeu la protéine P53 (Cho et al., 2010). Vinchi et collaborateurs suggèrent des effets anti-oxydants de l'hémopexine, glycoprotéine qui se lie aux molécules d'hèmes issues de la dégradation de l'hémoglobine. Leurs travaux de recherche démontrent que l'hémopexine réduirait les dysfonctions endothéliales induites par l'hème et les lésions oxydatives chez des modèles murins drépanocytaires et β -thalassémiques. (Vinci et al., 2013).

Toutefois malgré ces résultats prometteurs, les études testant les bienfaits des anti-oxydants apportent aussi des résultats mitigés puisque Arruda et collaborateurs démontrent que l'utilisation des vitamines C et E augmentent les marqueurs d'hémolyse (Arruda et al., 2013). Des investigations plus approfondies sont donc nécessaires afin de mieux déterminer les

cibles à atteindre pour la mise en place de stratégies thérapeutiques à visée anti-oxydante chez les patients drépanocytaires.

TRAVAUX DE RECHERCHE

I. Objectif et mise en place de l'étude

L'implication du stress oxydant dans la drépanocytose est déjà bien documentée dans la littérature. L'augmentation des marqueurs oxydatifs (Rusanova et al., 2010) et la diminution des agents anti-oxydants (Fasola, Adedapo, Anetor, & Kuti, 2007) semblent participer de manière active aux mécanismes physiopathologiques de la maladie et jouer un rôle dans la survenue des crises vaso-occlusives. En effet, des travaux récents ont mis en lumière l'impact du stress oxydant sur les propriétés d'adhérence du globule rouge et les paramètres hémorhéologiques, soulignant la contribution potentielle de ce processus aux désordres circulatoires caractérisant la drépanocytose (Barshtein et al., 2007) (Kaul et al., 2008). Face à ces dommages oxydatifs, l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-oxydantes s'est révélée être primordiale et des travaux de recherche suivis d'essais cliniques ont naturellement vus le jour. Bien que l'efficacité des anti-oxydants semble mitigée (Arruda et al., 2013), des données encourageantes telles que les effets bénéfiques de la N-acétylcystéine (Dominique Labie, 1999) (Nur et al., 2012), les propriétés anti-oxydantes de l'hydroxyurée via ses effets sur la glutathion peroxidase (Nur et al., 2012) ou encore celles de l'hémopexine (Vinchi et al., 2013) ont été démontrées. Afin de mettre en place des actions anti-oxydantes efficaces, il est nécessaire d'identifier plus précisément les cibles potentielles du stress oxydant.

Les travaux de cette thèse ont pour objectifs, i) d'explorer le lien entre les dommages oxydatifs du globule rouge et les altérations des paramètres hémorhéologiques chez des patients drépanocytaires SS et SC et des sujets contrôles AA en induisant *in vitro* un stress oxydant sur les globules rouges ; ii) de revisiter l'effet du stress oxydant via l'évaluation de son impact sur le développement des CVO chez des drépanocytaires SS.

Il s'agit, dans le cadre de ce 2^{ème} axe :

1) De tester l'hypothèse selon laquelle la protéine bande 3 est une cible à prendre en compte.

Cette hypothèse est basée sur :

- a) les données montrant que l'oxydation de la protéine bande 3 facilite un processus de clusterisation avec l'apparition de motifs antigéniques qui, d'une part sont reconnus par des auto-anticorps anti bande 3, ce qui induit leur élimination de la circulation d'une part (Low et al., 1985), et qui d'autre part confèrent aux GR un potentiel pro adhésif (Thevenin et al., 1997).

b) les données résultant d'une étude transversale de patients drépanocytaires menée dans le cadre d'une collaboration avec des partenaires cubains, montrant que le taux d'anticorps anti-bande 3 diminue pendant la crise (Villaescusa et al., 2013). Il est donc probable que, dans la maladie drépanocytaire, il existe un équilibre entre les érythrocytes « pro-adhésifs » portant les clusters de bande 3 et le taux plasmatique d'anticorps anti-bande 3, masquant les épitopes à caractère pro-adhésif. Une perturbation de cet équilibre, marquée par la diminution relative du taux d'anticorps anti-bande 3, en raison soit de leur production diminuée soit de leur consommation excessive, pourrait favoriser le développement d'une crise vaso-occlusive douloureuse.

2) D'évaluer l'implication d'autres marqueurs moléculaires et cellulaires du stress oxydant :

- a) en explorant le lien entre le niveau d'oxydation des globules rouges drépanocytaires et les modifications fonctionnelles du globule rouge (anomalies rhéologiques, adhérence du GR) susceptibles de favoriser le développement de CVO
- b) en recherchant des marqueurs de sévérité de la CVO à partir de critères cliniques et biologiques.

3) D'évaluer l'activité du système nerveux autonome (SNA), sur la base d'arguments indiquant un lien entre SNA et inflammation (Psychari et al.) (Singh, Hawkey, McDade, Cacioppo, & Masi, 2009) (Thayer & Fischer, 2009) et un lien entre le niveau d'activité du SNA et la douleur dans la fibromyalgie (Lerma et al., 2011), chez les nouveau nés opérés (Faye et al., 2010) ou encore dans les neuropathies diabétiques douloureuses (Gandhi, Marques, Selvarajah, Emery, & Tesfaye, 2010).

Ainsi, nous avons mis en place une étude longitudinale permettant de suivre différents paramètres au cours de la CVO et à l'état de base :

- Mesure des taux d'anticorps anti-bande 3
- Etude du processus d'oxydation de la protéine bande 3
- Mesure de marqueurs moléculaires du stress oxydant : glutathion réduit, glutathion oxydé, superoxyde dismutase, produits dérivés de l'oxydation des protéines, fer non lié à la transferrine, myeloperoxydase, caspase 3
- Analyse de marqueurs sub-cellulaires : microparticules
- Mesure de paramètres hémorhéologiques (viscosité sanguine, déformabilité érythrocytaire, agrégation érythrocytaire, stabilité érythrocytaire)
- Etude des propriétés d'adhérence du globule rouge
- Mesure de l'activité du système nerveux autonome

II. Matériels et méthodes

Nous avons dû élaborer une méthodologie qui permette de répondre aux enjeux de cette étude longitudinale. Il était donc nécessaire de mettre en place les conditions permettant de recruter les patients au moment de leurs crises douloureuses et à leur retour à l'état de base. Le projet a bénéficié d'un financement dans le cadre d'un PHRC Interrégional (API 2012) et a reçu l'approbation du CPP du Sud – Ouest, avec l'attribution du numéro CPP 2012/47.

• Patients

✓ Recrutement au cours des CVO :

Critère d'inclusion :

- Patients adultes drépanocytaires SS de la file active de l'unité transversale de drépanocytose

Le diagnostic de drépanocytose est réalisé dans les laboratoires de référence pour le diagnostic des hémoglobinopathies, établi par isoelectrofocusing et HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

- au cours d'une CVO osseuse uni ou multi-site

- accord de participation à l'étude par consentement écrit, éclairé et signé du patient.

Quand les patients ne sont pas en mesure de signer un consentement au cours de leur crise, un consentement oral suffit et le consentement écrit est signé lors de la visite à l'état de base quelques mois après, avec une mention manuscrite certifiant l'accord oral donné.

- sujets affiliés ou bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale pour les patients français.

Critères d'exclusion :

- traitement par protocole transfusionnel ou transfusion ou saignée récente (moins de 3 mois avant le début du protocole)

- grossesse, allaitement sur déclaration

- patient déjà engagé dans un protocole thérapeutique

- patients non compliant à la prise en charge habituelle

- patients incapables majeurs.

- insuffisance rénale chronique sévère, insuffisance hépatocellulaire, maladies auto-immunes, hépatites virales, HIV.

✓ **Visite à l'état de base :**

Il s'agit d'une visite de suivi en consultation ou en hôpital de jour, au moins 3 mois après l'hospitalisation et de tout autre événement aigu ou toute transfusion.

• **Déroulement de l'étude**

L'inclusion des patients drépanocytaires SS en proie à une CVO a été réalisée au service des urgences adultes du CHU de Pointe-à-Pitre. Considérant le caractère imprévisible et aléatoire des crises douloureuses, une liaison 7/7 jours et 24/24 heures a été établie à travers des astreintes effectuées par un groupe de 4 membres de notre équipe du Pôle Guadeloupe de l'UMR 1134 Inserm/UAG.

Après confirmation du diagnostic de CVO, des échantillons sanguins (deux tubes EDTA, une tube sec et un tube sodium citrate) ont été prélevés par le personnel médical avant administration médicamenteuse. Enfin, un holter de type ECG a été posé sur le torse du patient, en position allongée pendant environ 15 minutes. Les prélèvements sanguins ont été récupérés et traités dans un délai maximal de 2 heures.

Ces mêmes étapes ont été réalisées lors du retour à l'état de base des patients.

• **Paramètres mesurés**

✓ **Mesure du taux d'anticorps anti-bande 3**

A partir d'échantillons sanguins collectés sur tubes secs.

La mesure a été faite à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique (ELISA) réalisée sur les échantillons de sérums aliquotés et conservés à -80°C. Cette méthode a été développée à partir d'un transfert de technique par nos partenaires cubains du réseau Caribéen CAREST (Caribbean network of REsearchers on Sickle cell disease and Thalassemia) auquel nous appartenons (Pr. Rinaldo Villaescusa, Institut d'Immunologie et d'Hématologie de la Havane, Cuba). Cette méthode regroupe 6 étapes indiquées ci-dessous, incluant le couplage covalent de protéine bande 3 sur des micro- plaques (étapes 1 à 3) :

- 1) isolement de membranes de globules rouges à partir d'une poche de sang provenant de l'EFS de Guadeloupe, après respect des pré-requis réglementaires concernant les produits de cession à visée non thérapeutique

- 2) purification par chromatographie échangeuse d'anion et chromatographie d'affinité de la protéine bande 3
- 3) couplage covalent de la bande 3 sur des groupements amines NH greffés sur des plaques de polystyrène (plaques Covalink Nunk)
- 4) dépôt des échantillons de sérum en vue d'établir la liaison bande 3 / anticorps anti bande 3 suivi de l'addition d'un Ac secondaire (IgG couplé à la phosphatase alcaline)
- 5) révélation par une coloration en présence du substrat de la phosphatase alcaline «p-nitrophényl phosphate »
- 6) Lecture de l'absorbance à 405 nm.

✓ **Evaluation du processus d'oxydation de la protéine bande 3**

A partir d'échantillons sanguins collectés sur tubes EDTA.

Les membranes des globules rouges ont été obtenues à partir de 100µL de culot de globules rouges, lysés dans un tampon hypotonique (phosphate sodium (5mM) / EDTA 1mM, pH= 8).

Afin d'évaluer le processus de clusterisation de la bande 3, une électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée sur gel Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Novex by Life Technologies). Après transfert du gel sur une membrane de nitrocellulose Amersham Protran 0,45 µM NC (GE Healthcare Life Sciences), le western-blot a été réalisé avec un anticorps primaire anti-bande 3 [Monoclonal Anti Human Bande 3 (mouse IgG2a isotype), Sigma B9277] et un anticorps secondaire (polyclonal rabbit anti mouse immuno globulins HRP, Dako). Parallèlement, la quantité de protéines déposées a été contrôlée par un marquage anti-P55 avec un anticorps primaire produit par le Dr. Bailly, Paris, France, (Genetet et al., 2012) et un anticorps secondaire (anti rabbit immuno globulins HRP, Dako).

Ces étapes ont été réalisées en conditions réduites (β-mercaptoéthanol 0,83M) et non-réduites (sans β-mercaptoéthanol). La détection a été faite par un imageur Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

Une étude de la carbonylation des protéines membranaires a également été réalisée à partir d'une électrophorèse SDS-PAGE réalisée sur un gel de polyacrylamide 8%. Le western-blot a été réalisé à l'aide du Kit Oxyblot Protein Oxidation Detection (Millipore). La détection a été faite en utilisant un imageur Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences). Une étape de contrôle de dépôt des protéines a également été réalisée par le marquage anti-P55.

✓ **Marqueurs d'oxydation**

Mesure des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

La production de ROS par les globules rouges a été mesurée par une sonde perméable à la membrane érythrocytaire, le 2,7-Dichlorofluoresceine-diacetate (DCFH-DA, Sigma Aldrich). Une fois qu'elle pénètre à l'intérieur du globule rouge, la sonde est clivée par des estérases cellulaires sous une forme non-fluorescente qui sera ultérieurement oxydée par les ROS présents dans la cellule. Cela produit la molécule fluorescente 2,7-Dichlorofluoresceine (DCF, Sigma Aldrich).

Le protocole est réalisé sur 100 µL de suspension de globules rouges à 2% d'hématocrite.

La fluorescence est lue à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 538 nm.

Les résultats sont calculés à partir d'une courbe standard pré-établie (0,01-10 000 nmol/L) préparée avec du DCF.

Mesure des produits dérivés de l'oxydation des protéines (AOPP)

A partir du plasma issu d'échantillons sanguins collectés sur tubes EDTA.

Les produits issus de l'oxydation avancée des protéines (AOPP) ont été déterminés par la méthode semi-automatique de Witko-Sarsat (Witko-Sarsat et al., 1996) à partir de plasma aliquoté et conservé à -80°C. Les AOPP ont été mesurés par spectrophotométrie par un lecteur de plaque (modèle MR 5000, Dynatech) et une calibration utilisant la chloramine-T qui absorbe à 340 nm en présence d'iodure de potassium.

Mesure de la myeloperoxydase (MPO)

A partir du plasma issu d'échantillons sanguins collectés sur tubes EDTA.

Le dosage de la myeloperoxydase plasmatique a été réalisée par une technique immuno-enzymatique (kit Elisa Enzo-Life), qui utilise un anticorps monoclonal anti MPO humaine.

Mesure du fer non lié à la transferrine (NTBI)

A partir du plasma issu d'échantillons sanguins collectés sur tubes EDTA.

La méthode utilisée pour doser le fer non lié à la transferrine (NTBI) est celle de Prezelj (Prezelj & Knap, 2010), réalisée sur du plasma aliquoté et conservé à -80°C.

Cette méthode est basée sur la liaison du NTBI sérique par l'acide nitrilotriacétique (NTA) et la mesure du complexe fer-NTA par un réactif à base de ferrozine.

Mesure de la caspase 3

A partir de lysats cellulaires issus d'échantillons sanguins collectés sur tubes EDTA.

Après avoir ajusté l'hématocrite à 2%, les étapes ont été réalisées sur des globules rouges frais, à partir de 10^7 cellules selon le protocole fourni avec le kit « ApoAlert Caspase-3 Fluorescent Assay Kit » de Clontech. Après avoir transféré les échantillons dans une plaque nunc noire 96 puits, la lecture a été effectuée grâce à un fluorimètre avec une longueur d'onde d'excitation 400 nm et une longueur d'onde d'émission 505 nm.

Mesure du glutathion réduit (GSH)

A partir d'échantillons sanguins collectés sur tubes EDTA.

Les taux de GSH ont été déterminés suivant la méthode colorimétrique décrite par Ellman (Ellman, 1959) qui correspond au suivi de la réduction de l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB, Sigma Aldrich) par le GSH pour former un composé (TNB) absorbant à 412 nm. Les étapes ont été réalisées à partir d'un lysat cellulaire issu d'un culot de 50 µL de globules rouges traités en présence d'acide trichloroacétique et conservés jusqu'à la mesure à -80°C.

Une deuxième mesure permettant de mesurer le ratio glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG) a été réalisée par une analyse HPLC-MS/MS sur 100µL de globules rouges traités par de l'acide métaphosphorique et conservés à -80°C. Les échantillons ont été dilués, avant l'analyse HPLC, par des colonnes ZIC-HILIC (Merck, kGaA, Allemagne) et une phase mobile contenant de l'ACN (65%), de l'eau (35%) et de l'acide formique (0,1%).

Mesure de la Superoxyde Dismutase (SOD)

A partir d'échantillons sanguins collectés sur tubes EDTA.

Le dosage de la SOD est basé sur le principe de la diminution d'apparition d'ions superoxyde O_2^- – généré par le couple Xantine/Xantine oxydase et couplé à la réduction d'un composé le [nitrobleu tetrazolium (NBT)] donnant naissance à un chromogène (formazan) détectable par colorimétrie : mesure de l'absorbance à 560 nm. LA SOD du globule rouge est une SOD à cuivre et à zinc (Cu, Zn SOD). Le protocole est inspiré de la méthode de Sun (Sun, Oberley,

& Li, 1988) et a été réalisé à partir d'un lysat, issu d'un culot de 100 μ L de globules rouges, conservé à -80°C jusqu'à la mesure.

✓ Paramètres hémorhéologiques

Détermination de l'agrégation érythrocytaire

A partir d'échantillons sanguins collectés sur tubes EDTA.

Les propriétés d'agrégation érythrocytaire ont été déterminées à 37°C en utilisant un LORCA (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser), après un ajustement de l'hématocrite à 40% avec du plasma autologue. Un millilitre de sang a été inséré dans le système couette en verre de l'appareil, selon la méthode utilisée par Baskurt (Baskurt et al., 2009).

Mesure de la déformabilité érythrocytaire par ektacytométrie

Les échantillons sanguins ont été collectés dans un tube EDTA.

La déformabilité érythrocytaire a été déterminée à 37°C à 30 Pa par une analyse de diffraction de laser en utilisant un LORCA, selon la méthode utilisée par Baskurt (Baskurt et al., 2009).

Brièvement, 25 μ L de suspension de sang oxygéné pendant 10 minutes ont été mélangés à 5 ml de polyvinylpyrrolidone (PVP) et insérés dans le système couette en verre de l'appareil. Le schéma de diffraction a été analysé par un ordinateur relié au LORCA et l'index d'élongation a ainsi pu être mesuré. Une augmentation de l'index d'élongation indique une meilleure déformabilité érythrocytaire.

Mesure de la stabilité érythrocytaire

Avec le même mélange PVP/sang utilisé pour la déformabilité, un test de stabilité a pu être réalisé en utilisant le LORCA. Une contrainte de cisaillement de 60 Pa a été appliquée pendant 10 min, et une mesure de la déformabilité érythrocytaire a été effectuée toutes les 60 secondes.

✓ Extraction et analyse des microparticules

Les échantillons sanguins ont été collectés dans un tube sodium citrate.

La méthode décrite par Niewland (Nieuwland et al., 2000) a été utilisée avec les modifications suivantes : les microparticules ont été extraites à partir de plasma appauvri en plaquettes grâce à une centrifugation à 21 000g pendant 20 minutes. Le culot a été lavé deux fois avec un tampon d'extraction Hepes 10 mM pH 7,4 ; NaCl 136 mM ; KCl 5mM ; MgCl 2

Mm). Pour le premier lavage, de l'EDTA 5 mM a été ajouté au tampon. Le culot a ensuite été resuspendu dans le tampon d'extraction sans EDTA, ayant servi au deuxième lavage, et stocké à -80°C jusqu'à son utilisation.

Les microparticules ont été analysées à l'aide d'un cytomètre en flux FC500 (Beckman Coulter). Les MPS ont été incubées avec de la fluoresceïne-isothiocyanate (FITC) couplée à de l'annexine V et de la phycoerythrine (PE) conjuguée à des anticorps monoclonaux spécifiques. Les anticorps monoclonaux spécifiques suivants ont été utilisés : anti-CD15 (Lewis X, clone HI98, IgM), anti-CD41 (GPIIb, clone HI98, IgG1), anti-CD106 (VCAM1, clone 51-10 C9, IgG1), anti-CD14 (GPI, clone M5E2, IgG2a) et anti-CD235a (Glycophorin A, clone 11E4B-7-6, IgG1) permettant de déterminer l'origine cellulaire des MPs (c'est-à-dire l'origine granulocytaire, plaquettaire, endothéliale, monocytaire et érythrocytaire respectivement). Des contrôles isotypiques ont également été utilisés. Des billes magnétiques Flow-count ont été utilisées pour quantifier les MPs. Un kit Megamix a permis de standardiser la fenêtre d'acquisition du signal obtenu sur les paramètres SS et FS à partir des instructions du fournisseur (Biocytex, Marseille, France).

✓ **Activité du système nerveux autonome**

L'activité du SNA a été établie par la mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque (VFC). Cette méthode, basée sur les analyses mathématiques temps-fréquence d'exploration des variations des suites d'intervalles R-R de l'électrocardiogramme, a été réalisée à partir d'enregistrements provenant de cardiofréquencemètres de type Suunto Memory Belt, analysés par le logiciel HRV Analysis 1.1 pour Windows.

Les systèmes nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNP) représentent les deux divisions principales du SNA. Au repos, le SNP prédomine sur le SNS ralentissant la fréquence cardiaque. A l'inverse dans des situations de stress ou pendant un exercice physique, c'est l'influence sympathique qui prend le dessus, augmentant la fréquence cardiaque. Chacune des deux voies du SNA va donc influencer directement sur le délai entre 2 battements cardiaques (intervalles R-R de l'électrocardiogramme). Ces 2 influences antagonistes peuvent être caractérisées par leur fréquence d'action : le SNP, pour maintenir son influence, modifie l'activité cardiaque à haute fréquence (HF) tandis que le SNS aura une influence sur la fréquence cardiaque à basse fréquence (LF). Il est possible en réalisant une analyse fréquentielle de quantifier ces deux types de fréquence (LF et HF) et donc d'avoir une évaluation indirecte de l'activité de chacune des 2 branches du SNA. En réalité, les LF

reflètent également l'activité du SNP. Ainsi pour obtenir une appréciation de l'activité du SNS, on utilise le ratio LF/HF qui donne une appréciation de la balance sympatho-vagale et permet d'identifier lequel du SNS ou du SNP prédomine.

RESULTATS

Article 1. Impact du stress oxydant sur la rhéologie sanguine des patients drépanocytaires

Hierso, R., Waltz, X., Mora, P., Romana, M., Lemonne, N., Connes, P., & Hardy-Dessources, M.-D. (2014). Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. *British Journal of Haematology*, 166(4), 601–606

Il est à présent clairement établi que les patients drépanocytaires SS et SC présentent des altérations rhéologiques sévères parmi lesquelles une déformabilité érythrocytaire réduite, une diminution de l'agrégation érythrocytaire mais aussi une augmentation du seuil de désagrégation (Tripette et al., 2009).

Les altérations hémorhéologiques ont été associées à des complications de la pathologie drépanocytaire. Des travaux de recherche réalisées au sein de notre équipe ont montré par exemple une réduction de la déformabilité du globule rouge chez les patients présentant des ulcères de jambes, des glomérulopathies ou des accidents vasculaires cérébraux (Yann Lamarre et al., 2014) (Connes et al., 2013). De même, des anomalies de l'agrégation érythrocytaire et plus spécifiquement l'augmentation du seuil de désagrégation, sont associées à des syndromes thoraciques aigus et des glomérulopathies chez les patients de génotype SS (Yann Lamarre et al., 2012) (Yann Lamarre et al., 2014). Bien que les altérations rhéologiques jouent un rôle important dans le développement des diverses complications aiguës et chroniques de la drépanocytose, les mécanismes à l'origine de la grande variabilité entre individus restent encore incompris. Si l'implication du stress oxydant a été démontrée dans la physiopathologie de la drépanocytose, le rôle de ce processus dans les anomalies hémorhéologiques est peu documenté.

Cette étude réalisée chez 22 patients drépanocytaires (11 SS et 11 SC) et 12 sujets contrôles AA a pour but d'explorer le lien entre les dommages oxydatifs du globule rouge et les altérations des paramètres hémorhéologiques, à la fois dans des conditions de base et après un traitement *in vitro* avec un agent oxydant : le t-butyl hydroperoxide (TBHP).

Nous avons ainsi mis en place les expérimentations permettant de tester l'hypothèse selon laquelle l'induction *in vitro* de stress oxydant devrait altérer les paramètres rhéologiques des trois populations, mais que ces altérations devraient être plus prononcées chez les patients drépanocytaires SS. Ainsi, nous avons évalué la présence d'un stress oxydant dans les globules rouges chez les trois groupes de sujets en comparant les niveaux d'expression des

espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du glutathion réduit (GSH). Nous avons parallèlement étudié l'impact du stress oxydant sur les propriétés rhéologiques des sujets.

Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients

Régine Hierso,^{1,2,3*} Xavier Waltz,^{1,2,3,4*}
Pierre Mora,^{1,2,3} Marc Romana,^{1,2,3}
Nathalie Lemonne,⁵ Philippe
Connes,^{1,2,3,4,6**} and Marie-Dominique
Hardy-Dessources^{1,2,3**}

¹Inserm U 1134, ²Université des Antilles et de la
Guyane, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, ³Laboratory
of Excellence GR-Ex, Paris, ⁴Laboratoire ACTES,
Université des Antilles et de la Guyane, ⁵Unité
Transversale de la Drépanocytose, CHU de
Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, and
⁶Institut Universitaire de France, Paris, France

Received 5 February 2014; accepted for
publication 20 March 2014

Correspondence: Marie-Dominique Hardy-
Dessources, Inserm UMR 1134, Hôpital Ricou,
CHU de Pointe-à-Pitre, 97159 Pointe-à-Pitre,
Guadeloupe, France.

E-mail: marie-dominique.

hardy-dessources@inserm.fr

*These authors contributed equally to this
work.

**These authors contributed equally to this
work.

Summary

Sickle cell anaemia (SS) and sickle cell-haemoglobin C disease (SC) patients exhibit severe red blood cell (RBC) rheological alterations involved in the development of several complications. The contribution of oxidative stress in these haemorheological abnormalities is still unknown. We compared RBC reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH) content, and the haemorheological profile of SS ($n = 11$), SC ($n = 11$) and healthy subjects ($n = 12$) at baseline and after *in-vitro* treatment with t-butyl hydroperoxide (TBHP). We showed: (i) higher RBC ROS content in SS and SC patients, with the highest level observed in SS patients; (ii) lower RBC GSH content in sickle syndrome patients, especially in SS patients; (iii) TBHP increased RBC ROS production and decreased RBC GSH content in all groups; (iv) TBHP decreased RBC aggregation and increased the strength of RBC aggregates in all groups but the increase in RBC aggregates strength was greater in sickle cell patients; (v) TBHP decreased RBC deformability in the three groups but with a higher magnitude in sickle cell patients. These data suggest that RBCs from sickle cell patients have an exaggerated response to oxidative stress, which is accompanied by a profound abnormal haemorheological profile, with greater alterations in SS than in SC patients.

Keywords: sickle cell disease, oxidative stress, haemorheology.

Patients with sickle cell anaemia (SS) and sickle cell-haemoglobin C disease (SC) present severe red blood cell (RBC) rheological alterations, such as reduced RBC deformability and decreased RBC aggregation but increased RBC aggregates strength (Tripette *et al*, 2009). A reduction in RBC deformability in SS patients is associated with the occurrence of leg ulcers (Connes *et al*, 2013) and glomerulopathy (Lamarre *et al*, 2014) and could also be involved in the development of cerebral vasculopathy (Connes *et al*, 2013). RBC aggregation abnormalities and, more specifically, increased RBC aggregates strength, are associated with an increased risk for acute chest syndrome in both SC and SS patients (Lamarre *et al*, 2012) and glomerulopathy in SS patients (Lamarre *et al*, 2014). Indeed, these RBC rheological alterations play a critical role in the development of various acute and chronic complications but the mechanisms at the origin of the large clinical inter-individual variability have not been addressed. The involvement of oxidative stress has recently been suggested (Connes *et al*, 2014).

Oxygen free radicals have been demonstrated to damage RBCs from healthy donors by decreasing their deformability and aggregability, and by increasing the strength of RBC aggregates (Baskurt *et al*, 1998). RBCs from SS patients have been reported to generate twofold greater amounts of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) than healthy RBCs (Rice-Evans *et al*, 1986; Hebbel *et al*, 1988; Hebbel, 1991; Sheng *et al*, 1998; Aslan *et al*, 2000; Klings & Farber, 2001; Akohoue *et al*, 2007). Haemoglobin S (HbS) auto-oxidation processes and recurrent HbS polymerization/depolymerization events that promote intermittent vaso-occlusive episodes and reperfusion injury are a major source of enhanced reactive oxygen species (ROS) production in sickle cell disease (Sheng *et al*, 1998; Banerjee & Kuypers, 2004). The increased pro-oxidant generation in SS patients results in excessive antioxidant consumption and thus decreased antioxidant capacity (Banerjee & Kuypers, 2004; Reid *et al*, 2006; Chaves *et al*, 2008). A recent study reported a negative correlation between oxidative stress

and sickle RBC membrane damage (Barodka *et al*, 2014). However, the relationship between the increased oxidative stress of sickle RBCs and their abnormal rheological properties is still poorly documented.

The aim of the present study was to test the effects of *t*-butyl hydroperoxide (TBHP), a strong oxidant agent, on the rheological properties of RBCs from SS and SC patients and healthy subjects (AA). We hypothesized that TBHP should impair RBC rheology in the three populations but that the alterations could be greater in sickle cell patients.

Materials and methods

Preparation of blood samples

Blood from 11 SC patients, 11 SS patients and 12 healthy controls (AA) were taken into EDTA tubes. The SS and SC patients recruited are regularly followed by the Sickle Cell Unit of the Academic Hospital of Pointe-à-Pitre (Pointe-à-Pitre, Guadeloupe). All participants were aged ≥ 18 years old. Sickle cell patients were in clinical steady state at the time of the study (i.e., without vaso-occlusive crisis, acute medical complication within the last month or blood transfusion/phlebotomies within the last 3 months). Blood was centrifuged for separation of RBCs and plasma (10 min, 1500 g, 4°C). Plasma was stored at 4°C and the RBC pellet was washed two times with phosphate-buffered saline (PBS)-glucose buffer (5 mmol/l glucose) and then re-suspended in the same buffer at haematocrit 2%. The RBC suspension was either incubated with 0.3 mmol/l TBHP (Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) (TBHP condition) or untreated (CONT condition) for 20 min at 37°C. TBHP was added from a 100 mmol/l stock solution in ethanol. In preliminary experiments, RBCs were exposed to several concentrations of TBHP (up to 3 mmol/l) for various times (up to 30 min). Erythrocytes treatment with TBHP 0.3 mmol/l for 20 min at 37°C was chosen as the condition resulting in increased intracellular ROS production, decreased glutathione (GSH) level and no detectable haemolysis. At the end of the incubation (TBHP and CONT conditions), aliquots of the RBC suspensions were taken for determination of ROS and GSH content. The remaining RBC suspension was washed with PBS-glucose buffer and re-suspended in autologous plasma at haematocrit 40% to perform haemorheological measurements. This study is part of the 'STRESS' project, which was conducted in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud/Ouest Outre Mer III, Bordeaux, France, registration number: 2012-A00701-42).

Measurements of RBC ROS and GSH contents

ROS production was measured in RBCs using the membrane permeable probe 2,7-Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA; Sigma Aldrich). This probe, once entered into the RBC, is

cleaved off by cellular esterases under a non-fluorescent form that is further oxidized by the intracellular ROS, producing the fluorescent 2,7-Dichlorofluorescein molecule (DCF; Sigma Aldrich). Briefly, 1 ml of RBC suspension was washed three times with the PBS-glucose buffer. Then, 100 μ l of suspension at 2% haematocrit was mixed with 1900 μ l of PBS-glucose buffer, and incubated with DCFH-DA (400 μ mol/l) in darkness, for 30 min at 37°C. After incubation, the RBC suspension was washed two times with PBS-glucose buffer, the packed cells were lysed with 1 ml of ice-cold Tris buffer (10 mmol/l Tris/Triton 0.1%, pH 7.4) and then incubated for 30 min in darkness at room temperature. After 30 min incubation, the fluorescence of all samples was read (excitation wavelength: 485 nm and emission wavelength: 538 nm) (Mandal *et al*, 2005). The results were calculated based on a pre-established standard curve (0.01–10 000 nmol/l) prepared with DCF.

GSH levels were determined using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB; Sigma Aldrich) following the method described by Ellman (1959). Briefly, 50 μ l of packed RBC, washed with PBS-glucose buffer, were lysed with 1.25 ml of cold water. Proteins were precipitated by adding 10% trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation, one volume of supernatant was added to four volumes of 0.5 mol/l Tris buffer pH 8.2 and DTNB 0.2 mmol/l. After 30 min of incubation in the dark, the absorbance was read at 412 nm.

Determination of RBC aggregation properties

RBC aggregation properties were determined at 37°C by laser backscatter *versus* time, using the Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyser (LORCA; RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands), after adjustment of the haematocrit to 40% with autologous plasma (Hardeman *et al*, 2001; Baskurt *et al*, 2009). Blood was inserted into the Couette system of the LORCA and, after a short period of high shearing (800/s) to dissociate pre-existing RBC aggregates, shearing was stopped abruptly and the changes in laser backscatter intensity was monitored for 2 min (syllectogram) by a photodiode sensor incorporated in the LORCA. The amplitude and the half-time of the syllectogram are then used to calculate the RBC aggregation index. Then, the RBC disaggregation threshold (i.e., RBC aggregates strength) was determined using a re-iteration procedure (Hardeman *et al*, 2001): seven separate pre-defined shear rates between 7.5/s and 800/s were applied on the RBC suspension, with or without alternating disaggregation shear rate, to locate the minimal shear rate needed to prevent RBC aggregation.

Ektacytometry

RBC deformability was determined at 37°C and 30 Pa by laser diffraction analysis (ektacytometry), using the LORCA. The system has been described elsewhere in detail (Baskurt *et al*, 2009). Briefly, 25 μ l of prepared blood suspension was

mixed with 5 ml polyvinylpyrrolidone (PVP; viscosity = 30 cP; RR Mechatronics) and sheared into the Couette system made of glass. The diffraction pattern is analysed by the computer and the elongation index is calculated. An increase of the elongation index indicates greater RBC deformability.

Statistical analyses

A two-way ANOVA with Newman–Keuls test for *post hoc* comparisons was used to compare the three groups and test the effects of TBHP on RBC ROS and GSH contents, as well RBC rheological properties. Statistical significance was determined by *P* value <0.05. Analyses were conducted using STATISTICA (Version 8.0; StatSoft, Tulsa, OK, USA) and data were reported as mean $\pm$ standard deviation.

Results

RBC ROS and GSH contents

RBC ROS content was lower in the AA group compared to both the SC and SS groups. Although not significant, the SS group tended to have higher ROS levels than SC patients ($P < 0.1$). TBHP increased ROS production in the three groups (Fig 1). RBC GSH level was higher in the AA and SC groups than in SS patients (Fig 2). TBHP treatment induced a decrease in RBC GSH content all three groups.

RBC aggregation properties and deformability

While the RBC aggregation index was not significantly different between the three groups (Fig 3), both SS and SC

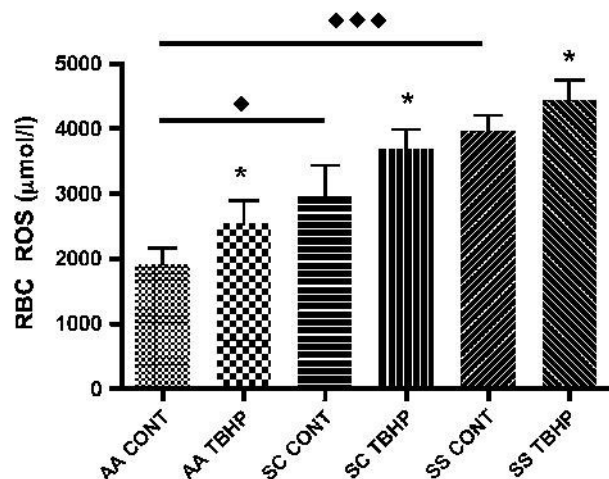


Fig 1. Effects of RBC treatment with 0.3 mmol/l TBHP on RBC ROS content. RBC were treated with TBHP for 20 min at 37°C and the RBC ROS content was measured in healthy individuals (AA, $n = 12$) and the two sickle cell groups (SS, $n = 11$ and SC, $n = 11$). Difference between CONT: untreated RBCs and TBHP condition: RBCs treated with TBHP for a given group ($*P < 0.05$); Difference between groups ($*P < 0.5$; $***P < 0.001$). RBC, red blood cells; ROS, reactive oxygen species; TBHP, t-butyl hydroperoxide.

patients had a higher RBC disaggregation threshold (i.e. RBC aggregates strength; Fig 4) than the AA group. TBHP decreased RBC aggregation and increased the strength of RBC aggregates in the three groups. The percent of increase of RBC disaggregation threshold was 33%, 42% and 48% in the AA, SC and SS group, respectively.

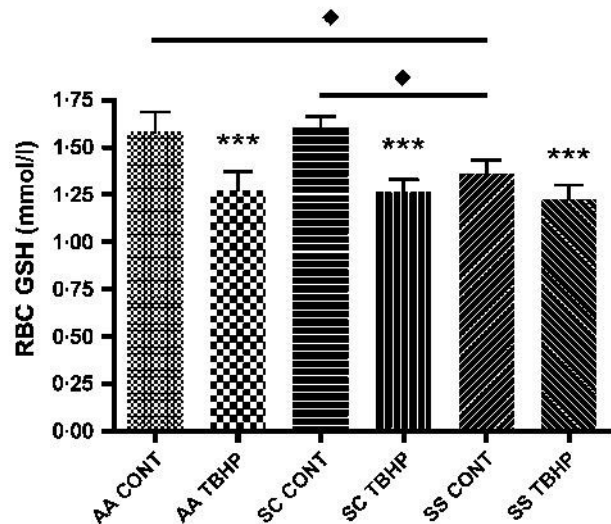


Fig 2. Effects of RBC treatment with 0.3 mmol/l TBHP on RBC GSH content. RBC were treated with 0.3 mmol/l TBHP for 20 min at 37°C and the RBC GSH content was measured in healthy individuals (AA, $n = 12$) and the two sickle cell groups (SS, $n = 11$ and SC, $n = 11$). Difference between CONT: untreated RBCs and TBHP condition: RBCs treated with TBHP for a given group ($***P < 0.001$); Difference between groups ($*P < 0.5$). RBC, red blood cells; GSH, glutathione; TBHP, t-butyl hydroperoxide.

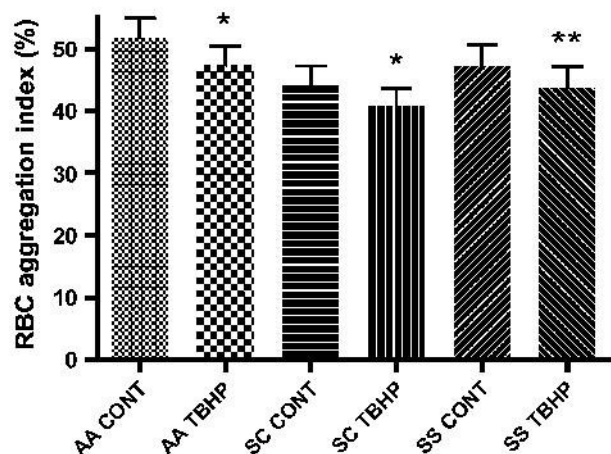


Fig 3. Effects of RBC treatment with 0.3 mmol/l TBHP on the RBC aggregation index. RBC were treated with 0.3 mmol/l (TBHP) for 20 min at 37°C and the RBC aggregation index was measured in healthy individuals (AA, $n = 12$) and the two sickle cell groups (SS, $n = 11$ and SC, $n = 11$). Difference between CONT: untreated RBCs and TBHP condition: RBCs treated with TBHP for a given group ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$). RBC, red blood cells; TBHP, t-butyl hydroperoxide.

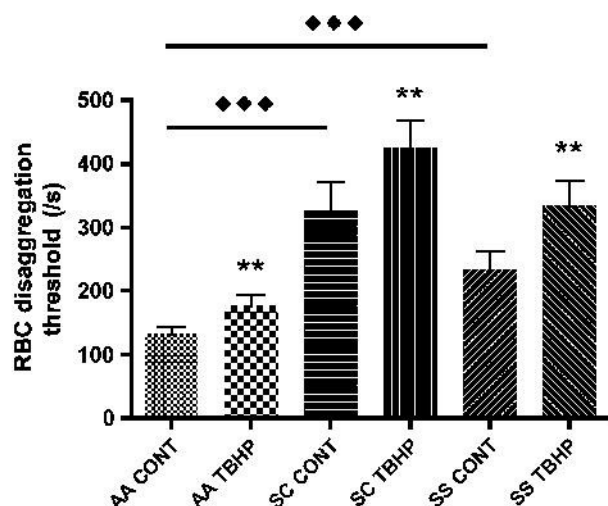


Fig 4. Effects of RBC treatment with 0.3 mmol/l TBHP on the RBC disaggregation threshold. RBC were treated with 3 mmol/l TBHP for 20 min at 37°C and the RBC disaggregation threshold was measured in healthy individuals (AA, $n = 12$) and the two sickle cell groups (SS, $n = 11$ and SC, $n = 11$). Difference between CONT: untreated RBCs and TBHP condition: RBCs treated with TBHP for a given group (** $P < 0.01$); Difference between groups (** $P < 0.001$). RBC, red blood cells; TBHP, t-butyl hydroperoxide.

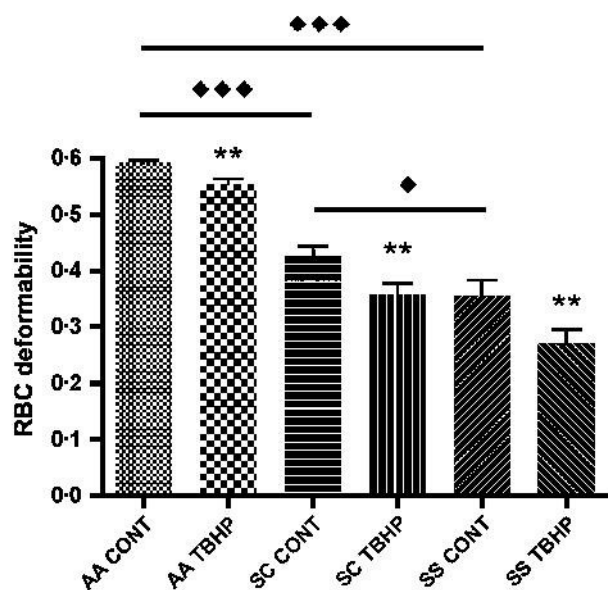


Fig 5. Effects of RBC treatment with 0.3 mmol/l TBHP on RBC deformability. RBC were treated with 0.3 mmol/l TBHP for 20 min at 37°C and RBC deformability was measured in healthy individuals (AA, $n = 12$) and the two sickle cell groups (SS, $n = 11$ and SC, $n = 11$). Difference between CONT: untreated RBCs and TBHP condition: RBCs treated with TBHP for a given group (** $P < 0.01$); Difference between groups (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). RBC, red blood cells; TBHP, t-butyl hydroperoxide.

RBC deformability was decreased in the two sickle cell groups compared with the AA group but the reduction was more severe in the SS than in the SC group (Fig 5). TBHP decreased RBC deformability in the three groups but the

decrease was greater in SS (−21%) and SC (−16%) patients compared to the AA group (−6%).

Discussion

We showed that baseline RBC ROS content was higher in sickle patients compared to healthy subjects, with the highest RBC ROS content observed in SS patients, and that baseline RBC GSH content was lower in sickle cell patients compared to healthy subjects, especially in SS patients. TBHP treatment increased RBC ROS production and decreased RBC GSH content in healthy subjects, SS and SC patients. Concomitantly, TBHP decreased RBC aggregation and increased the strength of RBC aggregates in the three groups but the increase in RBC aggregates strength was greater in sickle cell patients. TBHP also decreased RBC deformability in the three groups but the magnitude of the decrease was higher in sickle cell patients.

TBHP is metabolized by GSH peroxidase and has been demonstrated to be responsible for a reduction in GSH level in healthy RBCs (Rohn *et al*, 1993). In addition, TBHP may cause RBC fragmentation (Chaves *et al*, 2008; Lisovskaya *et al*, 2009) and a reduction in RBC deformability (Chen *et al*, 1991), depending on the concentration used (ranging from 0.1 mmol/l up to 3 mmol/l). In agreement with an earlier study, (Rohn *et al*, 1993) we observed a significant decrease in GSH level and an increase in ROS concentration in normal RBCs as well as in sickle RBCs in the presence of as little as 0.3 mmol/l TBHP. Given that this concentration of TBHP did not cause haemolysis (data not shown), all treatments of the RBCs were performed in the presence of TBHP 0.3 mmol/l.

The present study confirmed previous studies showing differences in RBC rheological properties between AA, SC and SS subjects (Tripette *et al*, 2009; Waltz *et al*, 2012a,b), with SS patients having the greatest alterations. The effects of TBHP observed in healthy subjects (i.e., decreased RBC deformability and RBC aggregation, and increased RBC aggregates strength) are in agreement with previous findings (Chen *et al*, 1991; Baskurt *et al*, 1998). Interestingly, under these oxidative conditions, the rheological profile of RBCs from healthy subjects mimics that of untreated sickle RBCs. These data suggest that the abnormal RBC rheological profiles observed in SS and SC individuals could be partly related to the increased oxidative stress as demonstrated by the increased RBC ROS content and decreased RBC GSH level at baseline conditions.

The additional effects of oxidative treatment on the RBC rheology of sickle cell patients were unknown until now. Although treatment of RBCs with TBHP induced a significant oxidative stress in the three groups, this oxidative stimulus caused a haemorheological response of different magnitude between sickle cell patients and healthy subjects. Indeed, the SS group, and to a lesser extent the SC group, exhibited a greater decrease of RBC deformability and a

higher increase of RBC aggregate strength compared to healthy individuals. This observation could be explained by the higher ROS content and the lower anti-oxidant capacity observed in baseline condition in RBCs from sickle cell patients compared to RBCs from healthy subjects. These abnormal sickle RBC rheological properties might result from the well-known damaging processes induced by ROS which affect RBC membrane lipids and proteins (George *et al*, 2010). It has been previously shown that oxidative stress causes the generation of methaemoglobin and its denaturation that promotes cytoskeleton rearrangement and band 3 clustering as well as lipid peroxidation and loss of lipid asymmetry (Ferru *et al*, 2011).

These RBC rheological abnormalities may impair vascular function and microcirculation. For example, Baskurt *et al* (2004) demonstrated that a decrease of RBC deformability in the muscle microcirculation resulted in a significant rise of vascular resistance. In addition, increased RBC aggregates strength is highly suspected to increase vascular resistance into the microcirculation, particularly at the pre-capillary level where RBC aggregates need to be fully dispersed before entering into the capillaries (Lamarre *et al*, 2014; Tripette *et al*, 2009). Consequently, these alterations in RBC rheology could contribute to the development of several acute and chronic sickle cell anaemia complications, as suggested by Connes *et al* (2014).

References

- Akhoue, S.A., Shankar, S., Milne, G.L., Morrow, J., Chen, K.Y., Ajayi, W.U. & Buchowski, M.S. (2007) Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatric Research*, **61**, 233–238.
- Aslan, M., Thornley-Brown, D. & Freeman, B.A. (2000) Reactive species in sickle cell disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **899**, 375–391.
- Banerjee, T. & Kuypers, F.A. (2004) Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *British Journal of Haematology*, **124**, 391–402.
- Barodka, V.M., Nagababu, E., Mohanty, J.G., Nyhan, D., Berkowitz, D.E., Rifkind, J.M. & Strouse, J.J. (2014) New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, & Diseases*, **52**, 230–235.
- Baskurt, O.K., Temiz, A. & Meiselman, H.J. (1998) Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radical Biology & Medicine*, **24**, 102–110.
- Baskurt, O.K., Yalcin, O. & Meiselman, H.J. (2004) Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **30**, 169–178.
- Baskurt, O.K., Boynard, M., Cokelet, G.C., Connes, P., Cooke, B.M., Forconi, S., Liao, F., Hardeman, M.R., Jung, F., Meiselman, H.J., Nash, G., Nemeth, N., Neu, B., Sandhagen, B., Shin, S., Thurston, G. & Wautier, J.L. (2009) New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **42**, 75–97.
- Chaves, M.A., Leonart, M.S. & do Nascimento, A.J. (2008) Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology*, **13**, 187–192.
- Chen, M.J., Sorette, M.P., Chiu, D.T. & Clark, M.R. (1991) Prehemolytic effects of hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide on selected red cell properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1066**, 193–200.
- Connes, P., Lamarre, Y., Hardy-Dessources, M.D., Lemonne, N., Waltz, X., Mouguel, D., Mukisi-Mukaza, M., Lalanne-Mistrih, M.L., Tarer, V., Tressieres, B., Etienne-Julan, M. & Romana, M. (2013) Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. *PLoS One*, **8**, e79680.
- Connes, P., Lamarre, Y., Waltz, X., Ballas, S.K., Lemonne, N., Etienne-Julan, M., Hue, O., Hardy-Dessources, M.D. & Romana, M. (2014) Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, doi: 10.1111/bjh.12786.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **82**, 70–77.
- Ferru, E., Giger, K., Pantaleo, A., Campanella, E., Grey, J., Ritchie, K., Vono, R., Turrini, F. & Low, P.S. (2011) Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood*, **117**, 5998–6006.
- George, A., Pushkaran, S., Li, L., An, X., Zheng, Y., Mohandas, N., Joiner, C.H. & Kalfa, T.A. (2010) Altered phosphorylation of cytoskeleton proteins in sickle red blood cells: the role of protein kinase C, Rac GTPases, and reactive oxygen species. *Blood Cells, Molecules, & Diseases*, **45**, 41–45.
- Hardeman, M.R., Dobbe, J.G. & Ince, C. (2001) The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **25**, 1–11.
- Hebbel, R.P. (1991) Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*, **77**, 214–237.
- Hebbel, R.P., Morgan, W.T., Eaton, J.W. & Hedlund, B.E. (1988) Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 237–241.
- Klings, E.S. & Farber, H.W. (2001) Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respiratory Research*, **2**, 280–285.
- Lamarre, Y., Romana, M., Waltz, X., Lalanne-Mistrih, M.L., Tressieres, B., Divialle-Doumdo,

In summary, the present study demonstrated that RBCs from sickle cell patients have an exaggerated response to oxidative stress compared to RBCs from healthy subjects because of the presence of a deficient anti-oxidant system. The profound RBC rheological changes observed in sickle cell patients (i.e., decreased RBC deformability and increased RBC aggregates robustness) may play a major role in sickle cell disease pathophysiology.

Acknowledgement

Funding for PhD students (RH and XW) was provided by the Regional Council of Guadeloupe.

Authorship

PC, XW, RH, MR, NL and MDHD designed the research study; XW, RH, PM performed the experiments; PC, XW, RH, PM, MDHD analysed the data; PC, XW, RH, MR and MDHD wrote the paper, RH, XW, PM, MR, NL, PC and MDHD read and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest

No conflict of interest.

- L., Hardy-Dessources, M.D., Vent-Schmidt, J., Petras, M., Broquere, C., Maillard, F., Tarer, V., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2012) Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica*, **97**, 1641–1647.
- Lamarre, Y., Romana, M., Lemonne, N., Hardy-Dessources, M.D., Tarer, V., Mougenel, D., Waltz, X., Tressieres, B., Lalanne-Mistrih, M.L., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2014) Alpha thalassemia protects sickle cell anemia patients from macro-albuminuria through its effects on red blood cell rheological properties. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, doi: 10.3233/CH-131772.
- Lisovskaya, I.L., Shcherbachenko, I.M., Volkova, R.I. & Ataulakhanov, F.I. (2009) Clotrimazole enhances lysis of human erythrocytes induced by t-BHP. *Chemico-Biological Interactions*, **180**, 433–439.
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M. & Basu, J. (2005) Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 39460–39467.
- Reid, M., Badaloo, A., Forrester, T. & Jahoor, F. (2006) In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **291**, E73–E79.
- Rice-Evans, C., Omorphos, S.C. & Baysal, E. (1986) Sickle cell membranes and oxidative damage. *The Biochemical Journal*, **237**, 265–269.
- Rohn, T.T., Hinds, T.R. & Vincenzi, F.F. (1993) Inhibition of the Ca pump of intact red blood cells by t-butyl hydroperoxide: importance of glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1153**, 67–76.
- Sheng, K., Shariff, M. & Hebbel, R.P. (1998) Comparative oxidation of hemoglobins A and S. *Blood*, **91**, 3467–3470.
- Tripette, J., Alexy, T., Hardy-Dessources, M.D., Mougenel, D., Beltan, E., Chalabi, T., Chout, R., Etienne-Julan, M., Hue, O., Meiselman, H.J. & Connes, P. (2009) Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. *Haematologica*, **94**, 1060–1065.
- Waltz, X., Hedreville, M., Sinnapah, S., Lamarre, Y., Soter, V., Lemonne, N., Etienne-Julan, M., Beltan, E., Chalabi, T., Chout, R., Hue, O., Mougenel, D., Hardy-Dessources, M.D. & Connes, P. (2012a) Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **52**, 15–26.
- Waltz, X., Pichon, A., Mougenel, D., Lemonne, N., Lalanne-Mistrih, M.L., Sinnapah, S., Tarer, V., Tressieres, B., Lamarre, Y., Etienne-Julan, M., Hue, O., Hardy-Dessources, M.D. & Connes, P. (2012b) Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients. *American Journal of Hematology*, **87**, 1070–1073.

Dans cette étude, nous avons démontré que :

- 1) Le taux de base des ROS était supérieur chez les patients SS et les SC comparés aux sujets AA, les patients SS atteignant le taux de ROS le plus élevé.
- 2) Le taux de base de GSH, reflet du potentiel antioxydant, était plus faible chez les patients drépanocytaires, surtout chez les SS.
- 3) Le TBHP augmentait la production de ROS et diminuait le taux de GSH érythrocytaire de la même façon dans les trois groupes.
- 4) Le TBHP diminuait l'agrégation érythrocytaire et augmentait le seuil de désagrégation érythrocytaire dans les trois groupes. Cependant, le seuil de désagrégation érythrocytaire augmentait plus chez les patients drépanocytaires.
- 5) Le TBHP diminuait la déformabilité érythrocytaire dans les trois groupes, mais cette diminution était plus prononcée chez les patients drépanocytaires.

Ces résultats suggèrent que les patients drépanocytaires ont une réponse exacerbée à un stress oxydant comparés aux sujets contrôles non drépanocytaires. Cette réponse amplifiée, associée à la défaillance de leur système de défense antioxydant, est accompagnée d'un profil hémorhéologique anormal, avec des altérations plus importantes chez les patients drépanocytaires de génotype SS. Chez le sujet AA, le TBHP entraîne des anomalies hémorhéologiques du même type que celles retrouvées chez le sujet drépanocytaire en conditions basales (*i.e.*, déformabilité diminuée, diminution de l'indice d'agrégation, augmentation du seuil de désagrégation). Nos résultats suggèrent également que le stress oxydant en modulant les anomalies hémorhéologiques associées à la drépanocytose pourrait être l'un des facteurs favorisant la survenue des complications drépanocytaires.

Article 2. Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la drépanocytose : crises vaso-occlusives, taux d'anticorps anti-bande 3 et oxydation du globule rouge

Les crises vaso-occlusives, complication la plus fréquente de la drépanocytose, représentent la première cause d'hospitalisation des patients atteints de la maladie (Field, Knight-Perry, & Debaun, 2009) (Jakubik & Thompson). Elles semblent être le résultat d'interactions complexes entre cellules circulantes mais aussi entre cellules circulantes et endothélium vasculaire, provoquant le ralentissement du flux sanguin et augmentant le temps de transit des globules rouges dans les vaisseaux, favorisant ainsi la polymérisation de l'hémoglobine S, la falciformation des globules rouges et l'occlusion des micro-vaisseaux (Chiang & Frenette, 2005).

Les cycles répétés de falciformation / défalciformation des globules rouges couplés à l'instabilité de l'Hb S entraînent des dommages oxydatifs (R P Hebbel et al., 1982) (Coletta, Hofrichter, Ferrone, & Eaton, 1982) à l'origine de sévères défauts de la membrane érythrocytaire, parmi lesquels des modifications de la conformation de la protéine bande 3 et une exposition anormale de la phosphatidylsérine associée à une vésiculation de la membrane érythrocytaire (Corbett & Golan, 1993) (Matarrese et al., 2005). En effet, en réponse au stress oxydant, l'hémoglobine subit une dénaturation plus importante provoquant la liaison des hémichromes d'hémoglobine à la protéine bande 3. S'ensuit alors une dissociation de la protéine au cytosquelette érythrocytaire et son regroupement sous forme d'agrégats membranaires. Ces clusters de bande 3 permettent l'exposition de séquences peptidiques normalement enfouies dans la bicouche lipidique membranaire, conférant aux globules rouges un potentiel «pro-adhésif» et la capacité de se lier aux molécules CD36 des cellules endothéliales de la microcirculation (Barshtein et al., 2007) ainsi qu'à d'autres récepteurs endothéliaux non encore identifiés à ce jour (R P Hebbel, 2008). Par ailleurs, le processus de clusterisation de la protéine bande 3 entraîne l'exposition d'antigènes cryptiques reconnus par des anticorps anti-bande 3 naturels (Crandall & Sherman, 1994).

Puisque les peptides de bande 3, synthétisés de façon à reproduire les séquences des épitopes produits du fait de la clusterisation de la bande 3, inhibent l'adhérence des globules rouges à l'endothélium vasculaire (Thevenin et al., 1997) (Rogers, Targett, & Hall, 1996), nous nous sommes demandés si une déficience du taux d'anticorps anti-bande 3, résultant soit de leur production diminuée soit d'une consommation accrue liée à l'excès de clusters de bande 3, pourrait favoriser la vaso-occlusion.

Nous avons donc évalué le niveau de ces anticorps dans le suivi longitudinal de 32 patients drépanocytaires SS (12 femmes et 20 hommes), à la fois à l'état stationnaire et pendant leur crise vaso-occlusive douloureuse. Nous avons également comparé, entre ces deux conditions cliniques, les niveaux de marqueurs caractéristiques du stress oxydant (AOPP, MPO, NTBI, caspase 3, GSH/GSSG, SOD) et les taux plasmatiques de microparticules (MPS).

Exacerbation of oxidative stress, decreased auto anti-band 3 antibodies and increased red blood cell-derived microparticles during sickle vaso-occlusive crisis: a prospective study

Régine Hierso^{1,2,3}, Nathalie Lemonne⁴, Rinaldo Villaescusa⁵, Marie-Laure Lalanne-Mistrih⁶, Keyne Charlot^{1,2,3}, Maryse Etienne-Julan⁴, Benoit Tressières⁶, Yann Lamarre^{1,2,3}, Vanessa Tarer⁴, Yohann Garnier^{1,2,3}, Ada Arce Hernandez⁵, Serge Ferracci⁸, Philippe Connes^{1,2,3,7}, Marc Romana^{1,2,3*} and Marie-Dominique Hardy-Dessources^{1,2,3*}

1 Inserm U 1134, CHU de Pointe-à-Pitre, Guadeloupe ; 2 Université des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe ; 3 Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris ; 4 Unité Transversale de la Drépanocytose, CHU de Pointe-à-Pitre, Guadeloupe ; 5 Instituto de Hematología e Inmunología, Apartado Postal 8070, 10800 CO, La Habana, Cuba ; 6 Inserm, CIC-EC 802, Pôle Guadeloupe, CHU de Pointe-à-Pitre, , Guadeloupe ; 7 Institut Universitaire de France, Paris, France; 8 Service d'accueil des Urgences, CHU de Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

*contributed equally to this work

Corresponding author:

Marie-Dominique Hardy-Dessources,
Inserm UMR 1134, Hopital Ricou, CHU de Pointe-à-Pitre,
97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.
E-mail: marie-dominique.hardy-dessources@inserm.fr

Abstract word count: Text word count: 3743; Figure/Table count: 1 figure and 5 tables;

Reference count: 53

ABSTRACT

Painful vaso-occlusive crisis (VOC), the hallmark of sickle cell anemia (SCA), results from complex, not fully understood, cellular and molecular mechanisms. Red blood cell (RBC) damages caused by continuous endogenous and exogenous oxidative stress may precipitate the occurrence of VOC.

In order to gain insight into the relevance of oxidative stress in VOC occurrence, this study prospectively investigated the changes in various molecular and cellular oxidative and inflammatory markers in 32 SCA adults during VOC and steady-state conditions.

Compared to clinical steady-state condition, advanced oxidation protein products (AOPP) and myeloperoxidase (MPO) plasma levels as well as RBC caspase 3 activity, total, neutrophil- and RBC-derived microparticles concentrations were found to be increased during VOC, whereas RBC's reduced glutathione (GSH) content was decreased. We also showed a decrease in natural anti-band 3 autoantibodies (anti-band 3 Nab) level, which correlated with the rise in plasma AOPP and RBC caspase-3 activity.

Our data provide proofs of an exacerbated oxidative stress during VOC in SCA patients and suggest that plasma AOPP and MPO should be relevant pro-oxidant markers, and RBC GSH, an indicative marker of the unbalanced antioxidant system. The VOC related oxidative stress is associated with higher concentration of harmful RBC-derived MPs. Our data also suggest a link between anti-band 3 Nab levels and oxidative stress.

Key words: sickle cell anemia, oxidative stress, painful vaso-occlusive crisis, microparticles, natural anti-band 3 antibodies

INTRODUCTION

Sickle cell anemia (SCA) is caused by a single nucleotide mutation that substitutes glutamic acid with valine at the 6th position of the β -globin gene, leading to the production of the abnormal hemoglobin S (HbS). The polymerization of deoxygenated HbS results in the formation of rigid and fragile sickle red blood cells (RBC) responsible of vascular occlusion and anemia, respectively. In addition, sickle RBCs have increased adhesiveness to white blood cells (Frenette PS et al, 2004; Belcher JD et al., 2000), platelets (Antonucci R. et al., 1990; Wun T et al., 1997) and endothelial cells (Hoover R et al., 1979; Hebbel RP et al., 1980), which may participate to the initiation of vaso-occlusive like events.

Painful vaso-occlusive crisis (VOC) is the most frequent acute SCA complication, manifesting early in life and accounting for the majority of hospitalization of patients (Field JJ et al., 2009; Jakubik LD et al., 2000). This acute complication can evolve to severe complications such as acute chest syndrome (ACS) or death (Vichinsky EP et al., 1997), while recurrent episodes may cause permanent organ damage. Painful VOC results from complex, not fully understood, cellular and molecular mechanisms (Chiang EY et al., 2005, Vercellotti GM, et al., 2014). The episodic occlusions and ischemia, followed by restoration of blood flow, promote tissue injury by increasing oxidative stress, raising the expression of endothelial cell-adhesion molecules and inflammatory cytokines (Platt OS et al., 2000; Kaul DK et al., 2000). Several sources of oxidative stress have been documented in SCA, including NADPH-oxidase-derived superoxide from endothelial cells and activated white blood cells, mainly polymorphonuclear neutrophils (Wood KC et al., 2005, Nur E et al., 2011). In addition, the accumulation of free hemoglobin and heme into plasma promotes the generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RSN), which decrease nitric oxide (NO) bio-availability (Reiter CD et al., 2002). Finally, HbS auto-oxidation inside sickle

RBCs and repetition of sickling/unsickling cycles are also a source of ROS and RSN (Rifkind JM et al., 2013).

The resulting RBC oxidative damages (Hebbel RP et al., 1982; Coletta M et al., 1982) cause severe defects to the RBC membrane (Corbett JD et al., 1997; Matarrese P et al., 2005) and accelerated hemoglobin denaturation favors the interaction of band 3 with hemichromes (Schlüter K et al., 1986). This binding, by disrupting the interaction of band 3 with ankyrin and the linkage of band 3 to the skeleton, triggers the clustering of band 3 (Pantaleo A et al., 2009 ; Arashiki N et al., 2013) and provides novel RBC adhesive sites for endothelial cells (Thevenin BJM et al., 1997; Rogers NJ et al., 1996). Furthermore, band 3 clustering leads to the exposure of cryptic antigens recognized by natural anti-band 3 autoantibodies (anti-band 3 Nabs) (Crandall I et al., 1994, Lutz HA, 2012). Since band 3 peptides (comprising the aging antigenic site recognized by anti-band 3 Nabs) inhibit the adhesion of SS RBC to endothelium (Thevenin BJM et al., 1997), we hypothesize that a relative anti-band 3 Nabs deficiency arising from either an excess of band 3 clustering or a decrease in anti-band 3 Nabs production could participate to vaso-occlusive process in SCA. In addition, because oxidative stress alters RBC cytoskeleton and promotes the abnormal exposure of phosphatidylserine (PS) at the outer cells membrane (Corbett JD et al., 1993; Matarrese P et al., 2005), we suspected increased RBC membrane vesiculation and thus enhanced plasma RBC-derived MP levels in SCA patients under situation with increased oxidative stress.

In this report, we tested the putative regulation of sickle cell VOC by anti-band 3 Nabs by assessing the level of these antibodies in prospectively followed up SCA patients both at steady-state and during painful VOC. We also compared the levels and nature of oxidative stress markers and circulating microparticles (MPs) between VOC and steady-state, to gain further insight into the role of these biomarkers into vaso-occlusive events.

PATIENTS AND METHODS

Patients

This prospective monocentric non-interventional study was performed in the university hospital of Guadeloupe. From March 2013 to March 2015, 32 consecutive adult SCA patients regularly follow-up by the Sickle cell Center of Guadeloupe and admitted to the emergency department for painful VOC were included. Patients under transfusion therapy or which have received blood transfusion within the three months prior to the present study were excluded. The SCA diagnosis for these patients has been previously established at the referent laboratory of the university hospital of Pointe-à-Pitre by isoelectrofocusing electrophoresis (Multiphor IITM System, GE HEALTH CARE, Buck, UK), high performance liquid chromatography (VARIANTTM, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and blood count analysis using a hematology analyzer (Max M-Retic, Coulter, USA). Blood samples were collected within the first hour of the emergency department admission and before administration of medications at the hospital. All patients received hydration treatment, oral analgesic treatments (acetaminophen, ibuprofen and/or parenteral morphine) at the emergency department. Patients whose VOC resolved within 6 hours were discharged home while the others were hospitalized. For all patients, a visit to the Sickle cell Center was scheduled at least 2 months after the emergency department admission to collect blood samples at steady-state and determine the hematological and biological parameters.

A painful VOC was defined as the occurrence of musculo-skeletal and/or visceral pain that could not be explained except by SCA, recognized as such by the patient and leading to an emergency department visit. At admission, the following data were recorded: analgesic treatment, temperature, blood pressure (BP), complete blood count including reticulocyte (RET) counts, serum lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (ASAT) and total bilirubin. A pain score was also determined by the patient on a 10-point ordinal number

scale. For the patients hospitalized, information related to subsequent complications was collected from the medical records. Fever was defined as body temperature higher than 38°C. For patients whose VOC evolves through acute chest syndrome (ACS), ACS was defined as the appearance of a new infiltrate on chest X-ray, associated with one or more clinical symptoms such as chest pain, respiratory distress, fever and cough (Ballas SK et al., 2010).

Steady state condition was defined as a period free of blood transfusion in the previous three months and without any acute SCA complications (infection, painful VOC, ACS, stroke, priapism) in the previous two months (Lamarre Y et al., 2012).

All included patients were informed about the purpose and procedures of the study and gave their written consent. The study was conducted in accordance with the guideline set by the declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud/Ouest Outre Mer III, Bordeaux, France, registration number: 2012-A00701-42).

Determination of the hematological and biochemical parameters

In addition to hemoglobin (Hb) level, white blood cell (WBC), platelet (PLT) and reticulocyte (RET) counts, were determined with an automated cell counter, and fetal hemoglobin (Hb F) level obtained by cation-exchange high performance liquid chromatography, as indicated above. Serum LDH, ASAT, total bilirubin and C reactive protein (CRP) levels were determined using standard methodologies.

Determination of oxidative stress marker levels

Venous blood samples were collected in EDTA tubes and treated in a delay of less than 2 hours after blood collection. For the assays conducted on plasma, blood samples were centrifuged (20 min at 1550 x g at 4°C) and plasma aliquots were stored at -80°C until analysis.

Pro-oxidative markers. Plasma levels of advanced oxidation protein products (AOPP) were determined using the semi-automated method developed by Witko-Sarsat V et al. Briefly, AOPP, expressed as micromoles per liter of chloramine-T equivalents, were measured by spectrometry on a microplate reader (model MR 500, Dynatech, Paris, France) and were calibrated with a chloramine-T solution absorbing at 340 nm in the presence of potassium iodide.

Plasma myeloperoxidase (MPO) protein levels were assessed by ELISA according to the manufacturer's instructions (Enzo-Life Sciences, Villeurbanne, France).

Plasma levels of non-transferrin bound iron (NTBI) was determined according to the method described by Prezli M. et al. based on the binding of serum NTBI by the chelator nitrilotriacetic acid (NTA) and colorimetric measurement of the ultrafiltrated Fe-NTA complex using the Hitachi Modular Analyser (Roche Diagnostics Mannheim, Germany).

RBC caspase 3 activity was assessed using the commercially available ApoAlert®Caspase-3 Fluorescent assay kit (Clontech, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and according to the manufacturer's instructions. Briefly the activity was detected in RBC lysates made from 1 µl of RBC's pellet (50 µl RBCs at hematocrit 2%) by following fluorescent detection of 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) after cleavage from the peptide substrate DEVD-AFC. A negative control is performed using the peptide inhibitor DEVD-CHO to verify that the signal detected is due to protease activity. Fluorometric detection is performed using a 400-nm excitation filter and 505-nm emission filter.

Antioxidant defense. Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) RBC Glutathione were measured using HPLC-MS/MS analysis. Blood samples were treated with an aqueous solution containing 5% of Metaphosphoric acid (MPA) and the lysates obtained from 100µl of RBCs were stored at -80°C until analysis.

RBC superoxide dismutase (SOD) activity was determined on the basis of inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) conversion to NBT-diformazan (formazan dye) via superoxide radicals generated by a xanthine-xanthine oxidase system, as described previously (Sun Y et al., 1988). For the assay, 100 µl of packed red cells were treated with a solution containing 900 µl of H₂O, 300 µl of chloroforme and 500 µl of ethanol.

Quantification of anti – band 3 auto-antibodies

Venous blood was collected into serum separation tubes and sera were isolated by centrifugation (20 min at 1550 x g at 4°C) within less than 2 hours after collection. Sera aliquots of 250 µl were immediately stored at –80°C until used. Natural band 3 antibodies in sera of the patients were measured by an enzyme immunoassay as previously described (Villaescusa R et al., 2013) using band 3 covalently bond to NUNC™ Covalink NH plates (Fisher Scientific, France).

Quantification and characterization of circulating microparticles

Venous blood was collected into 3.2 % trisodium citrate tubes. MPs were isolated from plasma by ultracentrifugation as previously described (Nieuwland R et al., 2000; Nebor D et al., 2013) in a delay of less than 2 hours after blood collection to avoid abnormal *in vitro* MP shedding and were stored at -80°C until used. MP analysis by flow cytometry was performed as previously described using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, CA, USA) (Nebor D et al., 2013; Nebor D et al., 2014). Briefly, MPs were incubated with fluorochrome-conjugated probes, consisting of fluorescein isothiocyanate (FITC)-annexin-V (Beckman Coulter) and phycoerythrin (PE)-conjugated specific monoclonal antibodies (MoAbs). The following monoclonal antibodies have been used: anti-CD15 (Lewis X, clone HI98, IgM), anti-CD41 (GPIIb, clone HI98, IgG1), anti-CD106 (VCAM1, clone 51-10 C9, IgG1), anti-

CD14 (GPI, clone M5E2, IgG2a), anti-CD71 (transferrin receptor, clone M-A712, IgG1), anti-CD233 (band 3, clone BRIC-6, IgG3) anti-CD235a (Glycophorin A, clone 11E4B-7-6, IgG1). These monoclonal antibodies allowed the identification of the cellular origin of MPs (i.e., granulocytes, platelets, endothelial cells, monocytes, reticulocytes and red blood cells, respectively). We also used monoclonal antibodies directed against CD142 (tissue factor, clone HTF-1, IgG1) as well as the appropriate isotypic controls. All MoAbs used in the present study were obtained from Beckman Coulter, Becton Dickinson (NJ, USA) and NHS Blood and Transplant (Bristol, UK). Flow-Count™ fluorospheres (Beckman Coulter) were used for absolute MPs quantification. The acquisition gate for MPs was standardized using the Megamix kit, a blend of size-calibrated fluorescent microbeads (0.5, 0.9 and 3 μ m; Biocytex, Marseille, France), according to the supplier's instructions.

Statistical analysis

Quantitative variables were summarized as means $\pm$ standard deviation or as the median with the interquartile range (IQR). Following a Shapiro-Wilk test (normality test), a paired Student's t-test or Wilcoxon's signed rank test was used to compare the steady-state and VOC conditions. Pearson or Spearman correlations were performed to test the associations between the different parameters measured. The significance level was defined as $p < 0.05$. Analyses were conducted using SPSS (v. 21, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL).

RESULTS

Clinical data and standard biochemistry

This study included thirty-two SCA patients: twelve women and twenty men (median age of 27.3 years; IQR: 18.2 – 37.8 years). Twelve of these patients were under hydroxycarbamide treatment for more than 6 months (average dose: 16.2 ± 5.4 mg/kg/d). At the emergency arrival, 18 patients (56.25%) exhibited pain scores ranging from 7 to 10, 11 patients (34.3%) pain scores ranging from 3 to 6, while the data were not available for 3 patients. Twenty-three patients (71.8%) received intravenous morphine at 0.1 mg/kg while the others received non-steroidal anti-inflammatory drug such as acetaminophen, ibuprofen alone or associated with codeine. Seventeen of the patients (53.1%) included in the study were hospitalized following the emergency department visit; ten in the day unit, six in the internal medicine department and one in the intensive care unit. These patients exhibited a higher pain score than those which were not hospitalized (9 (IQR: 7 - 10) vs. 6 (IQR: 5 - 7.5), $p = 0.0064$, respectively). The median hospitalization duration was 5 days (IQR: 1.75 – 6.75 days). Among the 17 hospitalized patients, three of them developed subsequently an ACS episode.

As shown in Table 1, higher heart rate, systolic and diastolic blood pressure values, white blood cell counts, C reactive protein, LDH and ASAT levels were detected during painful VOC compared to steady-state condition. No significant difference was observed for the other variables analyzed.

Antioxidant and pro-oxidant markers - Anti-band 3 antibodies

Pro-oxidant and antioxidant parameters are presented in Table 2. Higher plasma levels of MPO and AOPP as well as RBC caspase 3 activity were observed during VOC, but no significant difference in NTBI levels was observed between VOC and steady state condition. Significant lower levels of GSH was observed during VOC compared to steady state, but the

GSH/GSSG ratio remains unchanged between the two situations. No significant difference was observed for SOD activity too. Significant lower plasma levels of anti-band 3 Nabs were noted during VOC compared to steady state (Table 2). Anti-band 3 Nabs levels correlated with caspase 3 activity ($r = -0.82$, $p = 0,0003$) and plasma AOPP levels ($r = -0.40$, $p = 0.035$).

Quantification and characterization of circulating microparticles

Higher plasma concentration of total MPs was detected in VOC (Table 3). This raise results mainly from an increase of RBC-derived MPs and to a much less extent to that of neutrophil-derived MPs (Table 3). The concentration of the other cell-type specific MPs and tissue factor positive MPs were not different between steady-state condition and VOC, although endothelial and reticulocytes-derived MPs tended to slightly increase ($p < 0.1$). We confirmed the higher concentration of RBC-derived MPs using monoclonal antibody directed against band 3 (Figure 1) in VOC compared to steady-state: 2,293 MPs/ μ l (IQR: 1,352-2,873 MPs/ μ l) v.s. 967 MPs/ μ l (IQR: 627-1,618 MPs/ μ l), $p = 0.0013$. No difference of the mean fluorescence intensity was observed for any of the monoclonal antibodies used (data not shown) between VOC and steady-state condition. In contrast, we detected an increase of the mean fluorescence intensity (MFI) of Annexin V-FITC for the RBC- and platelet-derived MPs in VOC without any detectable increase of the size (forward scatter values) of these sub-cellular elements (Table 4).

DISCUSSION

This study prospectively investigated the changes in various molecular and cellular oxidative and inflammatory markers in 32 adult SCA patients during VOC and at steady-state. Compared to clinical steady-state condition, VOC was characterized by: 1) increased AOPP and MPO plasma levels as well as increased RBC caspase 3 activity, total, neutrophil- and RBC-derived MP concentrations; 2) a decrease in RBC's GSH content, contributing to the increased oxidative stress; 3) a decrease in anti-band 3 Nabs level which correlated with the rise in plasma AOPP level and RBC caspase-3 activation.

The fact that plasma AOPP levels are already at higher levels in steady-state condition than those usually detected in healthy individuals (Fathi Driss, personal communication - data not shown) reflects the chronic oxidative stress of SCA. Similarly, as previously described by Zhang et al (Zhang H et al., 2013), the high MPO plasma level found in steady state confirms the presence of chronic inflammation and the hyper-activation of neutrophils already documented in SCA (Vercellotti GM et al., 2014).

During VOC, oxidative stress was greatly enhanced in our patients in comparison to steady-state and the associations between the decrease of anti-band 3 Nabs level and the rise in plasma AOPP or RBC caspase 3 activity strongly suggest that oxidative damages of the RBCs would have favored an excessive consumption of the anti-band 3 Nabs. The reduced rate of anti-band 3 Nabs in SCA patients during VOC observed in our longitudinal study is in agreement with the results obtained in a previous transversal study (Villaescusa R et al., 2013). It has been shown that exacerbated oxidative stress could induce modifications of the RBC surface topography, such as band 3 clustering (Pantaleo A et al., 2009; Arashiki N et al., 2013). The cross-linking of band 3 provides not only the exposure of cryptic antigens

recognized by 1 anti-band 3 Nabs (Crandall I et al., 1994; Lutz HA, 2012) but also provides novel adhesive sites for endothelium (Thevenin BJM et al., 1997, Rogers NJ et al., 1996).

In agreement with previous studies, VOC is accompanied by an increase in circulating MPs originated mainly from RBCs (Kasar M et al., 2014; Shet AS et al., 2003). The mechanisms involved in MP shedding remain not fully characterized and differ from a cell-type to another one (Montoro-García S et al., 2011). Upon oxidative damage in various conditions such as aging RBC and thalassemia, band 3 protein interaction with the cytoskeleton is weakened by a P72^{syk} - dependent tyrosine phosphorylation of the N-terminal portion of band 3 induced by the binding of hemichrome to the band 3 cytoplasmic domain, promoting its clustering (Kannan R et al., 1988; Mannu F et al., 1995). Indeed, tyrosine phosphorylation of band 3 protein lowers the affinity of ankyrin for band 3 and would favor the shedding of MPs from RBCs (Ferru E et al., 2011). Although not addressed in the present study, our results support a role of band 3 oxidative damage in RBC membrane vesiculation. Oxidation-induced clustering of band 3 has also been described as a process elicited by RBC caspase 3 activation which cleaves band 3 glycoprotein (Miki Y et al., 2007, Mandal D et al., 2003). The resulting decreased band 3 interaction with the N-terminal domain of protein 4.2 promotes a loss of band 3-anchoring to the spectrin-based cytoskeletal network. This process has been considered to be involved in the band 3 clustering and macrophage recognition observed in RBCs exposed to hydrogen peroxide by Miki et al (Miki Y et al., 2007). The RBC caspase 3 activation during VOC, the association between RBC caspase-3 activation and the decreased rate of the anti-band 3 antibodies and the VOC induced rise of RBC-derived MPs demonstrated in the present study, suggest that oxidative damage might facilitate band 3 clustering and RBC membrane vesiculation.

In this study, we also detected a slight but significant increase of neutrophil-derived MPs at VOC presentation, a sub-population of MPs which has not been investigated previously during VOC. In contrast to our results, Shet *et al* reported higher plasma concentration of monocyte-derived MPs and tissue factor positive MPs in VOC compared to steady-state (Shet AS *et al.*, 2003). These discrepancies may be related to differences in patient sickle cell genotypes and to differences in both purification and analytic procedures of MPs, the latter two conditions being well known to affect the quantitative and qualitative MP analysis (Hind E *et al.*, 2010). However, this higher plasma concentration of neutrophil-derived MPs during VOC is in agreement with the increased plasma MPO levels, reflecting neutrophils activation during acute vaso-occlusive events.

Several pathophysiological functions of MPs have been described in SCA highlighting the significant impact of RBC-derived MPs on the major functional alteration in coagulation in SCA (van Beers EJ *et al.*, 2009; Gerotziafas GT *et al.*, 2012). Furthermore, it has been recently shown that externalized phosphatidylserine in RBC-derived MPs may be involved in the binding of heme to the MP membrane, responsible of various toxic effect such as exacerbation of the oxidative stress and apoptosis in endothelial monolayers *in vitro* and alteration of flow-mediated vasodilation in sickle mice (Camus SM *et al.*, 2015).

Moreover, our data, showing higher MFI values of Annexin-V FITC for RBC-derived MPs isolated during VOC compared to those obtained at steady state, and thus higher externalized phosphatidylserine density for the former, suggested that these MPs shed during VOC episodes could have more pronounced harmful effects. This issue remains to be confirmed in larger cohort of patients and specifically addressed in further studies.

In summary, our findings provide proofs of an exacerbated oxidative stress during VOC in SCA patients. Plasma AOPP and MPO appear as relevant pro-oxidant markers, and RBC GSH, an indicative marker of the unbalanced antioxidant system. Our data also suggests a link between anti-band 3 Nab levels and oxidative stress. The reduced rate of these Nabs during VOC in regard to their putative anti-adhesive properties suggest that sustaining these antibodies at high levels could be a promising therapeutic strategy. A possible link between the decreased anti-band 3 Nab level and the emission of harmful RBC-derived MPs deserves further studies.

Acknowledgements: We gratefully thank the sickle cell patients who participated in this study and the medical staff of the Emergency Unit of the University hospital of Guadeloupe. We are grateful to Dr. Patrick Portecop for his support to the development of this project. We also acknowledge Dr. Fathi Driss, Inserm U 773, Paris, for helpful discussion.

Part of this study was supported by the "CPER / Région Guadeloupe", grant nr. J-2-1-J210002, by the PHRC-API 2012, by APL 2010-Recherche Clinique CHU Pointe-à-Pitre, and by the "Conseil Régional de la Guadeloupe", fellowship to R. H., who also received supports from the association "Guadeloupe - Espoir - Drépanocytose", Club Soroptimist de Pointe-à-Pitre, Semsamar Guadeloupe and Fondation Semsamar Solidarités Saint-Martin.

This study benefited of the Caribbean cooperation set up by the network CAREST.

REFERENCES

- Antonucci R, Walker R, Herion J, Orringer E. Enhancement of sickle erythrocyte adherence to endothelium by autologous platelets. *Am J Hematol*. 1990 ;34(1):44-8.
- Arashiki N, Kimata N, Manno S, Mohandas N, Takakuwa Y. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry*. 2013 ;52(34):5760-9.
- Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, Johnson CS, Rogers ZR, Smith-Whitley K, Wang WC, Telen MJ; Investigators, Comprehensive Sickle Cell Centers. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2010 ;85(1):6-13.
- Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood*. 2000 1;96(7):2451-9.
- Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, Loufrani L, Grimaud L, Lambry JC, Charue D, Kiger L, Renard JM, Larroque C, Le Clésiau H, Tedgui A, Bruneval P, Barja-Fidalgo C, Alexandrou A, Tharaux PL, Boulanger CM, Blanc-Brude OP. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vaso-occlusions in sickle cell disease. *Blood*. 2015. pii: blood-2014-07-589283.
- Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005 ;19(5):771-84.
- Coletta M, Hofrichter J, Ferrone FA, Eaton WA. Kinetics of sickle haemoglobin polymerization in single red cells. *Nature*. 1982 ;300(5888):194-7.
- Corbett JD, Golan DE. Band 3 and glycophorin are progressively aggregated in density-fractionated sickle and normal red blood cells. Evidence from rotational and lateral mobility studies. *J Clin Invest*. 1993 ;91(1):208-17.

Crandall I, Sherman IW. Cytoadherence-related neoantigens on *Plasmodium falciparum* (human malaria)-infected human erythrocytes result from the exposure of normally cryptic regions of the band 3 protein. *Parasitology*. 1994 ;108 (Pt 3):257-67.

Ferru E, Giger K, Pantaleo A, Campanella E, Grey J, Ritchie K, Vono R, Turrini F, Low PS. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood*. 2011 ;117(22):5998-6006.

Field JJ, Knight-Perry JE, Debaun MR. Acute pain in children and adults with sickle cell disease: management in the absence of evidence-based guidelines. *Curr Opin Hematol*. 2009 ;16(3):173-8.

Frenette PS. Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation*. 2004 ;11(2):167-77.

Gerotziafas GT, Van Dreden P, Chaari M, Galea V, Khaterchi A, Lionnet F, Stankovic-Stojanovic K, Blanc-Brude O, Woodhams B, Maier-Redelsperger M, Girot R, Hatmi M, Elalamy I. The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles. *Thromb Haemost*. 2012 ;107(6):1044-52.

Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *J Clin Invest*. 1980 ;65(1):154-60.

Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest*. 1982 ;70(6):1253-9.

Hind E, Heugh S, Ansa-Addo EA, Antwi-Baffour S, Lange S, Inal J. Red cell PMVs, plasma membrane-derived vesicles calling out for standards. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 ;399(4):465-9.

Hoover R, Rubin R, Wise G, Warren R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. *Blood*. 1979 ;54(4):872-6.

Jakubik LD, Thompson M. Care of the child with sickle cell disease: acute complications. *Pediatr Nurs*. 2000 ;26(4):373-9.

Kasar M, Boğa C, Yeral M, Asma S, Kozanoglu I, Ozdogu H. Clinical significance of circulating blood and endothelial cell microparticles in sickle-cell disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2014 ;38(2):167-75.

Kannan R, Labotka R, Low PS. Isolation and characterization of the hemichrome-stabilized membrane protein aggregates from sickle erythrocytes. Major site of autologous antibody binding. *J Biol Chem*. 1988 ;263(27):13766-73.

Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*. 2000 ;106(3):411-20.

Lamarre Y, Romana M, Waltz X, Lalanne-Mistrih ML, Tressières B, Divialle-Doumbo L, Hardy-Dessources MD, Vent-Schmidt J, Petras M, Broquere C, Maillard F, Tarer V, Etienne-Julan M, Connes P. Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica*. 2012 ;97(11):1641-7.

Lutz HU. Naturally Occurring Anti-band 3 Antibodies in Clearance of Senescent and Oxidatively Stressed Human Red Blood Cells. *Transfus Med Hemother*. 2012 ;39:321-7.

Mandal D, Baudin-Creuz V, Bhattacharyya A, Pathak S, Delaunay J, Kundu M, Basu J. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem*. 2003 ;278(52):52551-8.

Mannu F, Arese P, Cappellini MD, Fiorelli G, Cappadoro M, Giribaldi G, Turrini F. Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood*. 1995 ;86(5):2014-20.

Matarrese P, Straface E, Pietraforte D, Gambardella L, Vona R, Maccaglia A, Minetti M, Malorni W. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J.* 2005 ;19(3):416-8.

Miki Y, Tazawa T, Hirano K, Matsushima H, Kumamoto S, Hamasaki N, Yamaguchi T, Beppu M. Clearance of oxidized erythrocytes by macrophages: involvement of caspases in the generation of clearance signal at band 3 glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 ;363(1):57-62.

Montoro-García S, Shantsila E, Marín F, Blann A, Lip GY. Circulating microparticles: new insights into the biochemical basis of microparticle release and activity. *Basic Res Cardiol.* 2011 ;106(6):911-23.

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood.* 2000 ;95(3):930-5.

Nebor D, Romana M, Santiago R, Vachiery N, Picot J, Broquere C, Chaar V, Doumou L, Odièvre MH, Benkerrou M, Elion J. Fetal hemoglobin and hydroxycarbamide modulate both plasma concentration and cellular origin of circulating microparticles in sickle cell anemia children. *Haematologica.* 2013 ;98(6):862-7.

Nebor D, Bowers A, Connes P, Hardy-Dessources MD, Knight-Madden J, Cumming V, Reid M, Romana M. Plasma concentration of platelet-derived microparticles is related to painful vaso-occlusive phenotype severity in sickle cell anemia. *PLoS One.* 2014 ;9(1):e87243.

Nur, E., Biemond, B. J., Otten, H.-M., Brandjes, D. P., & Schnog, J.-J. B. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *American Journal of Hematology.* 2011; 86(6), 484–9.

Pantaleo A, Ferru E, Giribaldi G, Mannu F, Carta F, Matte A, de Franceschi L, Turrini F. Oxidized and poorly glycosylated band 3 is selectively phosphorylated by Syk kinase to form

large membrane clusters in normal and G6PD-deficient red blood cells. *Biochem J.* 2009 ;418(2):359-67.

Platt OS. Sick cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest.* 2000 ;106(3):337-8.

Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, Kinney TR. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med.* 1991 ;325(1):11-6.

Prezelj, M., & Knap, B. Automated assay for non-transferrin-bound iron in serum samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2010 ;48(10): 1427–32.

Reiter, C. D., Wang, X., Tanus-Santos, J. E., Hogg, N., Cannon, R. O., Schechter, A. N., & Gladwin, M. T. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine.* 2002 ;8(12), 1383–9.

Rifkind, J. M., & Nagababu, E. . Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013 ;18(17), 2274–83.

Rogers NJ, Targett GA, Hall BS. *Plasmodium falciparum* gametocyte adhesion to C32 cells via CD36 is inhibited by antibodies to modified band 3. *Infect Immun.* 1996 ;64(10):4261-8.

Schlüter K, Drenckhahn D. Co-clustering of denatured hemoglobin with band 3: its role in binding of autoantibodies against band 3 to abnormal and aged erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 ;83(16):6137-41.

Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood.* 2003 ;102(7):2678-83.

Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry.* 1988 ;34(3):497–500.

Thevenin BJ, Crandall I, Ballas SK, Sherman IW, Shohet SB. Band 3 peptides block the adherence of sickle cells to endothelial cells in vitro. *Blood*. 1997 ;90(10):4172-9.

van Beers EJ, Schaap MC, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, Meijers JC, Biemond BJ; CURAMA study group. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*. 2009 ;94(11):1513-9.

van Tits LJ, van Heerde WL, Landburg PP, Boderie MJ, Muskiet FA, Jacobs N, Duits AJ, Schnog JB. Plasma annexin A5 and microparticle phosphatidylserine levels are elevated in sickle cell disease and increase further during painful crisis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 ;390(1):161-4.

Vercellotti GM, Belcher JD. Not simply misshapen red cells: multicellular and cellular events in sickle vaso-occlusion. *J Clin Invest*. 2014 ;124(4):1462-65.

Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1997 ;89(5):1787-92.

Villaescusa R, Arce AA, Lalanne-Mistrih ML, Lamarre Y, Hierso R, Hernández C, Hardy-Dessources MD. Natural antiband 3 antibodies in patients with sickle cell disease. *C R Biol*. 2013 ;336(3):173-6.

Willekens FL, Werre JM, Groenen-Döpp YA, Roerdinkholder-Stoelwinder B, de Pauw B, Bosman GJ. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol*. 2008 ;141(4):549-56.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Descamps-Latscha, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*. 1996 ;49(5):1304–13.

Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J Lab Clin Med.* 1997 ;129(5):507-16.

Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *FASEB J.* 2005 ;19(8):989-91.

Zhang H, Xu H, Weihrauch D, Jones DW, Jing X, Shi Y, Gourlay D, Oldham KT, Hillery CA, Pritchard KA Jr. Inhibition of myeloperoxidase decreases vascular oxidative stress and increases vasodilatation in sickle cell disease mice. *J Lipid Res.* 2013 ;54(11):3009-15.

Table 1: Clinical and biological characteristics at emergency department admission and at steady –state of the SCA patients

	Steady - state	VOC	<i>p</i> values
Heart rate (bpm)	72 (65 - 83)	84 (73.5 - 97)	0.001
Systolic BP (mm Hg)	115 (106 - 125)	130 (120 - 141)	0.005
Diastolic BP (mm Hg)	64 (59 - 70)	73.5 (62 - 81.25)	0.037
Hb (g/dL)	8.9 (7.9 - 9.7)	8.6 (7.8 - 9.8)	0.475
Reticulocytes (10 ⁹ /L)	236 (186 - 262)	198.5 (160 - 296)	0.937
WBC (10 ⁹ /L)	9.2 (6.7 - 10.575)	12.3 (10.1 - 16.2)	<10⁻³
Platelets (10 ⁹ /L)	374 (312.5 - 467)	369 (298 - 447)	0.436
LDH (IU/L)	418 (351 - 564)	437 (370 - 727)	0.03
ASAT (IU/L)	25 (30 - 41)	37 (30 - 57)	0.015
Bilirubin (μM)	39 (32 - 49.5)	42 (30.75 - 58)	0.36
CRP (mg/L)	3.7 (3.25 - 5.98)	7.05 (3.25 - 17.5)	0.04

Results are expressed as median with interquartile range. Comparisons of the related samples were performed using the Wilcoxon's signed rank test. Significant differences are in bold. BP: blood pressure; bpm: beats per minute.

Table 2: Anti-band 3 antibodies and oxidative markers at steady-state and during VOC

Conditions	Steady-state	VOC	<i>p</i> (n)
Anti band 3 antibodies ($\mu\text{g/ml} \times 10^{-2}$)*	5.050 1.948-9.175	3.845. 1.708-7.920	0.0017 * (30)
GSH (mM)	1.85	1.69	0.0437 §
Guadeloupe	$\pm$ 0.39	$\pm$ 0.29	(28)
GSH ($\mu\text{moles/L}$)	450	301	0.0001 *
Paris	302-531	231-412	(23)
GSH/GSSG	10.10 7.53-12.89	9.37 4.37-12.91	0.14 * (23)
MPO (ng/ml)	39.10 30.19-87.04	102.50 68.66-154.2	< 0.0001 * (30)
AOPP ($\mu\text{mol equiv CHT}$)	49.48. $\pm$ 15.59	57.68 $\pm$ 14.30	0.0016 § (31)
Caspase Fluorescence	11533 2725-19699	14798 11264-25196	0.0479 * (15)
NTBI μM	0.35 0.17-0.47	0.38 0.21-0.60	0.6 * (31)
SOD $\mu\text{g/mL}$	110.6 95.41-180.1	108.6 85.43-126.3	0.44 * (28)

- * Wilcoxon test. Data presented are medians , 25% and 75 % percentile
- § Paired t test. Data presented are means $\pm$ SD

Table 3: Paired test comparison of MP concentrations between steady-state and VOC conditions

	Steady - state	VOC	<i>p</i> values
Total MP cc (MPs/ μ l)	15,210 (8,449 - 23,830)	20,279 (12,220 - 26,525)	0.04
PLT-derived MP cc (MPs/ μ l)	11,012 (6,690 - 17,001)	14,251 (8,987 - 20,297)	0.14
RBC-derived MP cc (MPs/ μ l)	1,188 (810 - 1,895°)	2,488 (1,570 - 4,024)	0.0004
RET-derived MP cc (MPs/ μ l)	241 (68 - 668)	516 (205 - 857)	0.08
Neutro-derived MP cc (MPs/ μ l)	161 (32.5 - 508)	359 (218 - 838)	0.03
Endo-derived MP cc (MPs/ μ l)	19.1 (0 - 61)	41;5 (0 - 119)	0.07
Mono-derived MP cc (MPs/ μ l)	0 (0 - 39)	0 (0 - 74)	0.86
TF ⁺ MP cc (MPs/ μ l)	77.8 (35.5 - 254)	77 (54 - 185)	0.89

Results were expressed as median, 25th and 75th percentiles were indicated in brackets. MP concentrations were compared using Wilcoxon signed rank test. Significant differences are in bold. Mono: monocyte, Endo: endothelial cell; Neutro: neutrophil, TF: tissue factor; cc: concentration.

Figure 1: Paired analysis of band 3 positive MP concentration at steady-state and during VOC

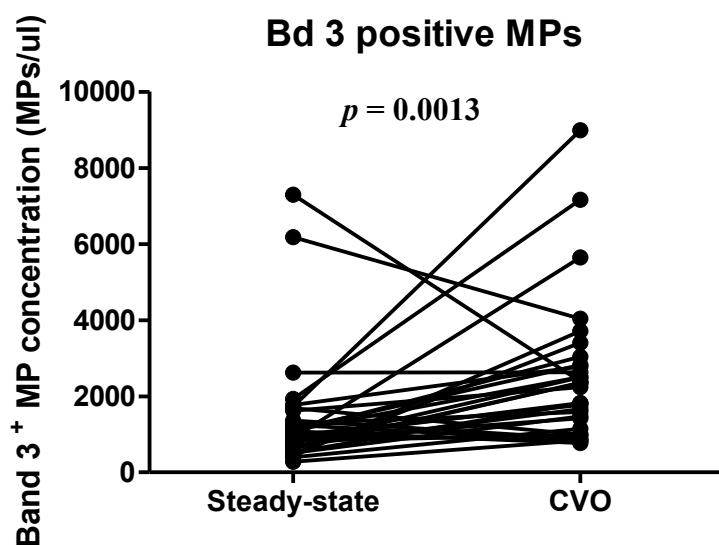


Table 4: Characteristics of RBC- and platelet-derived MPs during VOC and at steady-state

	Steady - state	VOC	<i>p</i> values
RBC-derived MP Annexin V MFI	63 (35.6 - 102.5)	90 (49.8 - 166.5)	0.0086
PLT-derived MP Annexin V MFI	41.6 (28.3 - 77.9)	64.9 (33.7 - 126)	0.034
Forward scatter RBC-derived MP	7.4 (6.89 - 8.19)	7.63 (6.88 - 8.39)	0.367
Forward scatter PLT-derived MP	6.7 (6.11 - 7.82)	7.04 (6.08 - 7.6)	0.93

Results were expressed as median, 25th and 75th percentiles were indicated in brackets. MFI and forward scatter values were compared using Wilcoxon signed rank test. MFI: mean fluorescence intensity

A travers cette étude qui avait pour but d'explorer si le stress oxydant associé à une diminution du taux d'anticorps anti-bande 3 pouvait favoriser le déclenchement des crises vaso-occlusives, nous avons démontré :

- Un taux élevé des marqueurs du stress oxydant AOPP, MPO et caspase 3 chez les patients drépanocytaires SS à l'état de base inclus dans l'étude. Ces marqueurs pro-oxydants atteignaient des valeurs encore plus élevées durant leurs crises.
- Une défaillance du système de défense anti-oxydant chez ces patients à l'état de base. Cette déficience anti-oxydante était accentuée au cours des CVO, comme nous le montre la diminution du taux de GSH, bien qu'aucune différence ne fût décelée concernant le ratio GSH/GSSG.
- Une diminution considérable du taux d'anticorps anti-bande 3 au cours des crises comparés à l'état de base. Cette diminution du taux d'auto anticorps est corrélée avec l'activité de la caspase 3 et les taux d'AOPP plasmatiques.
- Une augmentation du taux de microparticules totales chez les sujets au cours de leurs crises, résultant principalement d'une augmentation du taux de microparticules érythrocytaires, et dans une moindre mesure des microparticules dérivées des neutrophiles.

Ces travaux, qui confirment la diminution du taux d'anticorps anti-bande 3 associée à l'exacerbation du stress oxydatif et, qui ont mis en évidence une augmentation de la concentration de microparticules érythrocytaires au cours des CVO, suggèrent que ces deux processus sont liés au phénomène de clusterisation de la protéine bande 3 déclenché par le stress oxydant. Nous montrons également que les marqueurs pro-oxydants AOPP, MPO, et caspase 3, et le GSH, marqueur anti-oxydant, pourraient constituer des marqueurs pertinents du stress oxydatif amplifié au cours des CVO et favoriser la mise en œuvre de nouvelles pistes thérapeutiques anti-oxydantes pour mieux appréhender les crises vaso-occlusives des sujets drépanocytaires.

RESULTATS ADDITIONNELS

Etude des paramètres hémorhéologiques chez les patients drépanocytaires SS

Les résultats de l'étude 1 intitulé « impact du stress oxydant sur la rhéologie sanguine des patients drépanocytaires » démontrent que les patients drépanocytaires ont une réponse exacerbée à un stress oxydant comparés aux sujets contrôles non drépanocytaires. Cette réponse amplifiée, associée à la défaillance de leur système de défense antioxydant, est accompagnée d'un profil hémorhéologique anormal, avec des altérations plus importantes chez les patients drépanocytaires de génotype SS.

Considérant que le stress oxydant fait partie des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les processus vaso-occlusifs et en regard de l'étude 1 établissant *in vitro* l'influence du stress oxydant sur les anomalies hémorhéologiques associées à la drépanocytose, nous avons tenté de déterminer si le stress oxydant pouvait également moduler, *in vivo*, les altérations hémorhéologiques observées pendant la crise vaso-occlusive chez les drépanocytaires SS.

Nous avons donc mesuré différents paramètres hémorhéologiques chez 27 patients drépanocytaires de génotype SS en proie à des crises douloureuses : viscosité sanguine, déformabilité érythrocytaire, agrégation / désagrégation érythrocytaire et stabilité érythrocytaire. Les mêmes paramètres ont été mesurés chez ces 27 patients quelques mois après la CVO, lors de leur retour à un état stationnaire.

Nos résultats montrent que la déformabilité érythrocytaire déjà réduite chez les patients drépanocytaires SS à l'état stationnaire, est nettement diminuée chez ces patients au cours des crises vaso-occlusives ($0,345 \pm 0,100$ en CVO versus $0,379 \pm 0,116$, $p=0,023$) (**Figure 1**). Par ailleurs, comme illustré par la **Figure 2**, les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation de l'agrégation érythrocytaire chez les patients drépanocytaires SS au cours de leurs CVO ($54,88 \pm 8,55$ en CVO versus $51,14 \pm 8,19$ à l'état de base, $p=0,0455$). Le seuil de désagrégation érythrocytaire est également nettement augmenté lors des crises : 350 s^{-1} (281-375) en CVO contre 275 s^{-1} (183-388) lors de l'état stationnaire ($p=0,0592$) (**Figure 3**).

Figure 1 : Analyse de la déformabilité érythrocytaire à 30 Pa chez des drépanocytaires SS, en CVO et à l'état de base

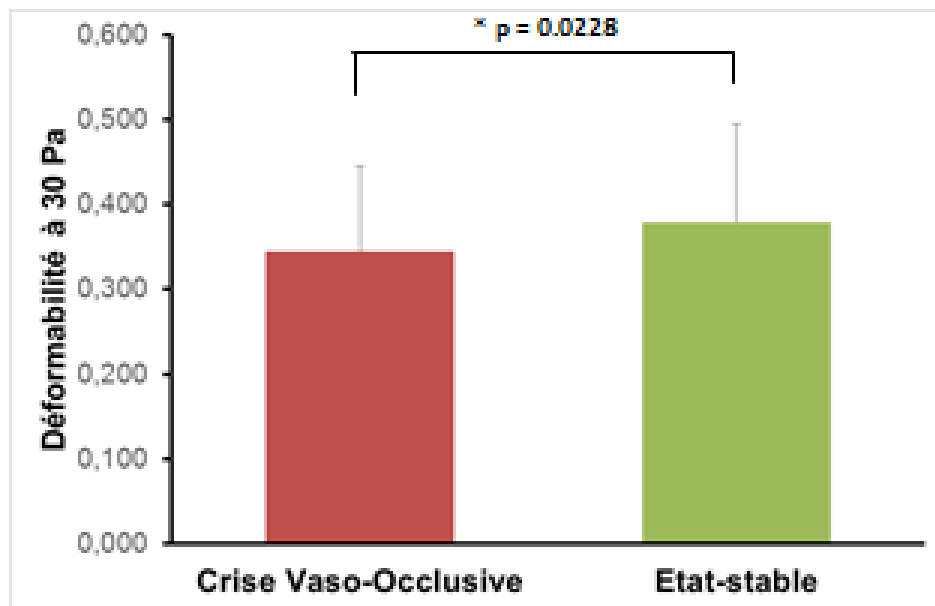


Figure 2 : Analyse de l'agrégation érythrocytaire chez des drépanocytaires SS, en CVO et à l'état de base

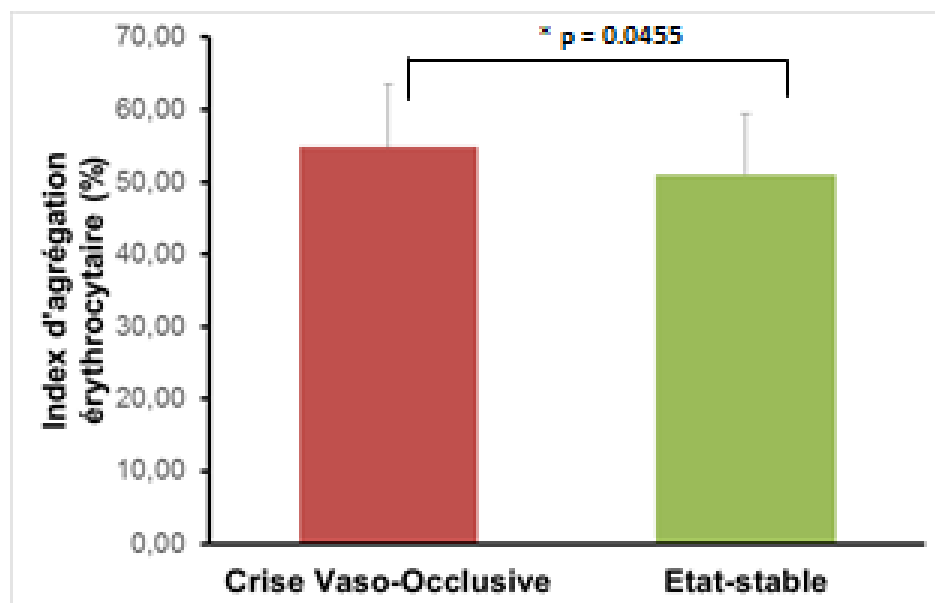
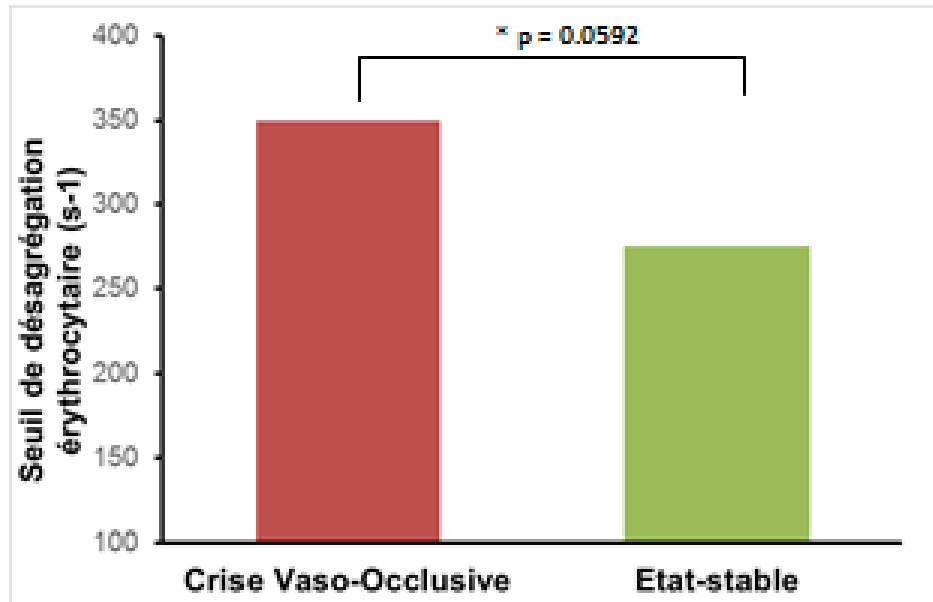


Figure 3 : Analyse du seuil de désagrégation érythrocytaire chez des drépanocytaires SS, en CVO et à l'état de base



Ainsi, nous montrons que, bien que les patients drépanocytaires présentent des altérations rhéologiques sévères lorsqu'ils sont dans un état cliniquement asymptomatique, ces anomalies sont nettement plus accentuées lors des crises vaso-occlusives.

Ces résultats, couplés à ceux de l'article 1, confortent l'hypothèse d'un lien entre anomalies hémorhéologiques, stress oxydant et vaso-occlusion.

Etude de l'activité du système nerveux autonome (SNA) chez les patients drépanocytaires SS

Les altérations de l'activité du système nerveux autonome chez les patients drépanocytaires sont déjà bien documentées dans la littérature. En effet, des travaux de recherche indiquent que des dysfonctions de l'activité du SNA sont plus fréquemment retrouvées chez les patients drépanocytaires présentant des complications telles que les ulcères de jambes, les priapismes ou les syndromes thoraciques aigus (J S Mohan et al., 1997) (Oguanobi et al., 2012) (Knight-Madden et al., 2013). De même, une étude menée par notre équipe (Nébor et al., 2011) a démontré, chez des patients drépanocytaires ayant eu plusieurs CVO, un fort déséquilibre du SNA en faveur d'une diminution du système nerveux parasympathique.

Par ailleurs, les travaux de Tracey et collaborateurs ont établi un lien entre le SNA et l'inflammation (Tracey, 2002). Ceux de Sangkatumvong et collaborateurs ont suggéré que l'activité du SNA pourrait être régulé par le NO (Sangkatumvong et al., 2011).

Au regard des résultats obtenus par Nébor et collaborateurs, et sachant que l'inflammation et la diminution de la biodisponibilité du NO font partie des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les processus vaso-occlusifs, nous avons évalué le rôle du SNA dans la vaso-occlusion.

Pour ce faire, un holter de type ECG a été posé pendant 10 à 20 minutes sur le torse nu de 27 patients drépanocytaires adultes SS en proie à une crise douloureuse, avant toute administration médicamenteuse. Nous avons également réalisé un enregistrement contrôle sur ces mêmes patients lors de leur retour à un état stationnaire.

Résultats

Chez les 27 patients, la fréquence cardiaque des patients, *i.e.* nombre de battements du cœur par minute (bpm), est plus élevée en CVO comparée à l'état de base (79 ± 14 versus 71 ± 8 respectivement, $p = 0,0049$).

Comme indiqué précédemment, les systèmes nerveux sympathique et parasympathique représentent les deux divisions principales du SNA. Les basses fréquences (LF) reflètent à la fois l'activité du système sympathique et du système parasympathique. Les hautes fréquences (HF), elles, reflètent l'activité du parasympathique. Selon nos résultats, la somme des LF +

HF de l'activité cardiaque ne diffère pas entre la CVO et l'état stable de façon significative (respectivement $1036 \pm 1594 \text{ ms}^2$ versus $1794 \pm 2818 \text{ ms}^2$, $p=0,25$) (figure non représentée).

L'analyse des LF seules ne montre également pas de différence significative entre CVO et état de base ($619 \pm 926 \text{ ms}^2$ en CVO versus $821 \pm 1066 \text{ ms}^2$ à l'état de base, $p=0,47$) (figure non représentée). Bien qu'il en soit de même pour l'analyse des HF seules, les résultats semblent cependant révéler un retrait du système parasympathique lors des CVO considérant la valeur deux fois plus élevée des HF à l'état de base ($417 \pm 688 \text{ ms}^2$ en CVO versus $989 \pm 1808 \text{ ms}^2$ à l'état de base, $p=0,15$) (**Figure 2**).

Nous avons donc exploré de façon plus précise les HF en analysant le pourcentage qu'elles représentent dans l'activité globale du SNA ($\text{HF}(\text{nu}) = \text{HF}(\text{ms}^2) / \text{LF} + \text{HF}$). Plus le pourcentage de HF(nu) se rapproche de 100%, plus l'activité du système parasympathique domine celle du système sympathique. Nos résultats confirment un retrait de l'activité parasympathique plus important pendant les CVO : ($36 \pm 17 \text{ nu}$ versus $47 \pm 18 \text{ nu}$ à l'état de base, $p=0,031$) (**Figure 3**).

De même, le rapport LF/HF conforte de nouveau que c'est l'activité sympathique qui domine lors des CVO (3.41 ± 4.49 versus 1.52 ± 1.13 à l'état de base, $p=0,053$) (**Figure 4**).

Figure 1 : Analyse de la fréquence cardiaque chez des drépanocytaires SS, en CVO et à l'état de base

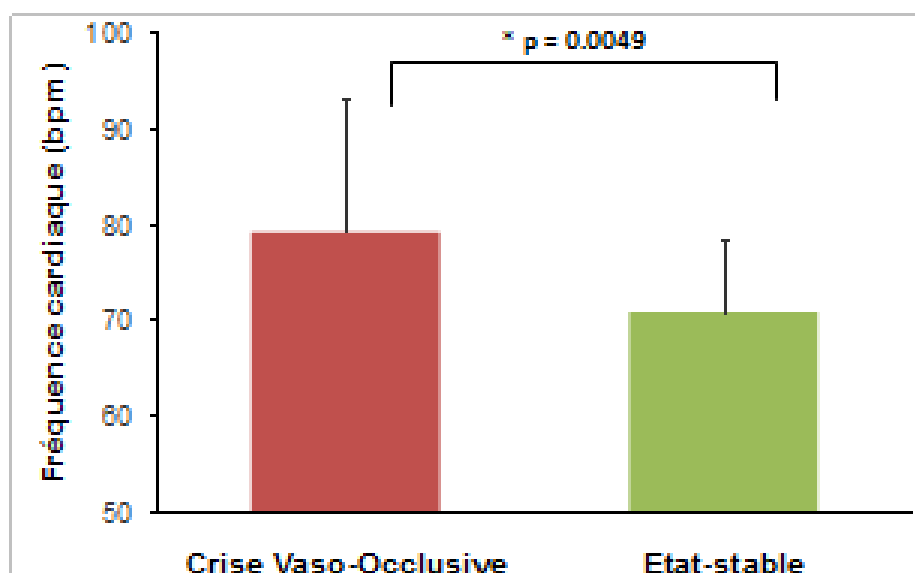


Figure 2 : Analyse des HF (ms²) chez des drépanocytaires SS, en CVO et à l'état de base

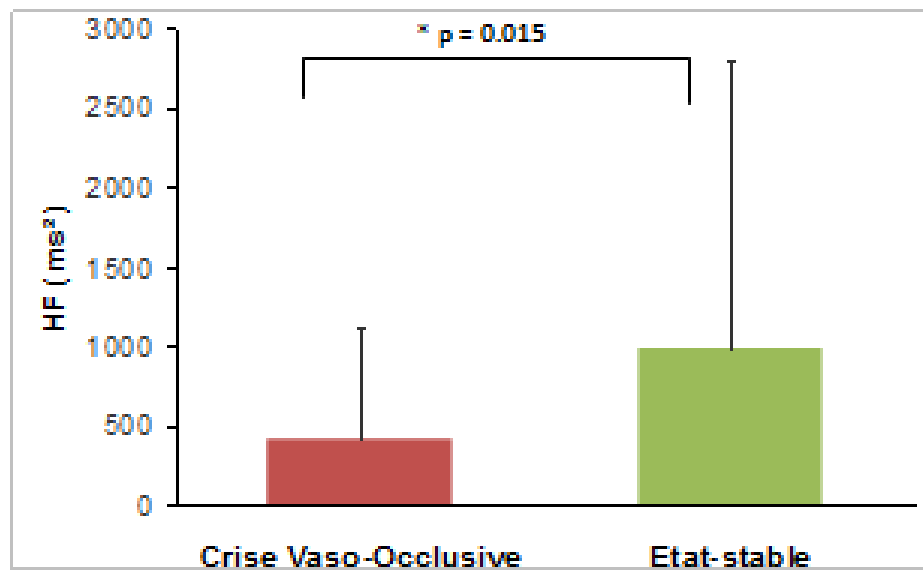


Figure 3 : Analyse des HF (nu) chez des drépanocytaires SS, en CVO et à l'état de base

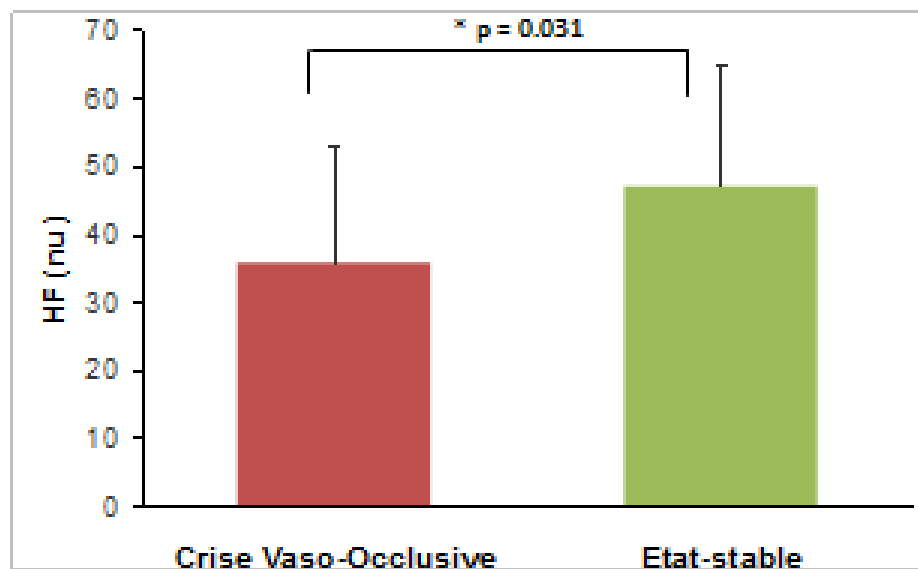
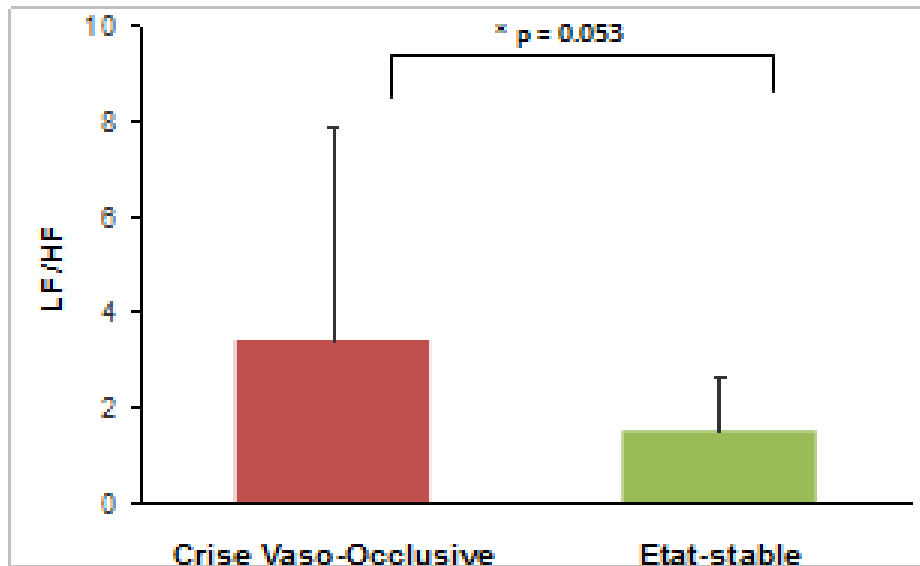


Figure 4 : Analyse du rapport LF/HF chez des drépanocytaires SS, en CVO et à l'état de base



Nos résultats suggèrent que le déséquilibre du SNA, déjà documenté chez les drépanocytaires à l'état de base marqué par un retrait du système nerveux parasympathique (Inamo et al., 2009) (Romero Mestre et al., 1997) (Sangkatumvong et al., 2011), est accentué chez les patients au cours de leur crise douloureuse.

Evaluation du processus d'oxydation de la protéine bande 3 chez les patients drépanocytaires SS

Des travaux précédents ont montré que l'oxydation du globule rouge, induite par des agents oxydants ou liée à des conditions pathologiques, entraînent des modifications de la protéine bande 3 membranaire consécutives à la formation de méthémoglobine puis d'hémichromes qui vont entraîner son oxydation (Pantaleo et al., 2009) (Arashiki, Kimata, Manno, Mohandas, & Takakuwa, 2013). Selon Pantaleo et collaborateurs, cette oxydation de la protéine bande 3 favorise sa phosphorylation par la tyrosine kinase P72 Syk. Il en résulte alors une dissociation de la bande 3 du cytosquelette érythrocytaire et la formation de clusters de bande 3. Ces clusters de protéine bande 3 pourraient aussi résulter d'un autre processus décrit par Arashiki et collaborateurs. Ces auteurs préconisent, pour la formation des agrégats de bande 3, l'effet combiné de la méthémoglobine et de la peroxydation membranaire : 1) la peroxydation membranaire, se traduisant notamment par la carbonylation de la protéine bande 3, favoriserait la dissociation de la bande 3 du cytosquelette érythrocytaire. ; 2) la fixation de la méthémoglobine au niveau du domaine cytoplasmique de la protéine bande 3, libérée de son interaction avec le cytosquelette via l'ankyrine, favoriserait le lien entre plusieurs dimères de bande 3 et la formation des agrégats de bande 3.

Puisque le stress oxydant semble exacerbé au cours des CVO, nous avons cherché à évaluer dans un premier temps, la présence d'un processus de carbonylation des protéines membranaires chez 6 patients drépanocytaires SS, à la fois à l'état stationnaire et au cours de leur CVO. Puis nous nous sommes intéressés plus précisément à la carbonylation de la protéine bande 3.

Nous avons ensuite étudié l'existence de clusters de bande 3 chez ces patients. Sachant que, en absence de clusterisation, la protéine bande 3 est révélée en électrophorèse des protéines (SDS PAGE) sous forme de monomère migrant à un niveau correspondant à un poids moléculaire de l'ordre de 100 kDa, la révélation de la protéine bande 3 à des poids moléculaires supérieurs à 200 kDa indique l'oligomérisation de la bande 3. Nous avons recherché, la présence ou non de ces différentes conformations de la protéine par Western-blot.

Résultats

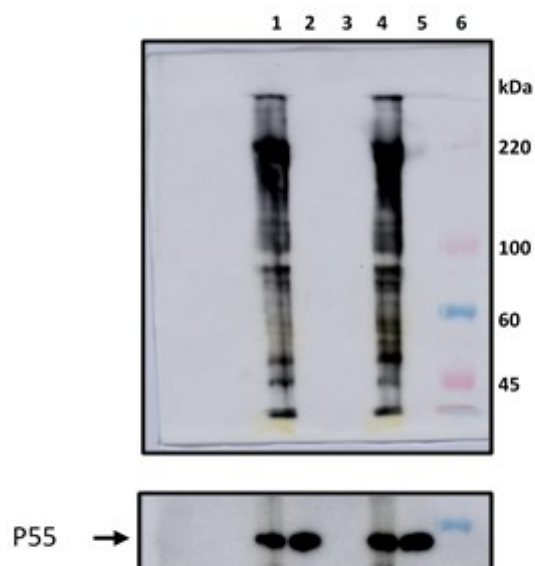
La **figure 1** nous montre un exemple des données issues de l'étude de la carbonylation des protéines membranaires par western-blot sur gel de polyacrylamide 8%.

Les résultats du **tableau 1** indiquent que chez 4 patients sur 6, le taux de protéines membranaires carbonylées est plus important au cours de la CVO comparé à l'état de base.

Pour approfondir ces résultats qui semblent indiquer une oxydation de la membrane des globules rouges plus importante en CVO, nous nous sommes attachés plus spécifiquement à l'analyse de la carbonylation de la protéine bande 3. Les résultats du **tableau 1** indiquent que chez 5 patients sur 6, la protéine bande 3 subit une carbonylation exacerbée en CVO comparé à l'état de base.

Nous avons ensuite étudié la présence de la protéine bande 3 sous ses différentes conformations. Pour 4 patients sur 6, la protéine bande 3 n'est présente que sous sa forme monomérique que ce soit en CVO ou à l'état de base, en conditions réduites et non réduites (**Figure 2 n°1**). Pour 2 patients sur 6, la protéine bande 3 est présente non seulement sous sa forme monomérique (en CVO et à l'état de base), mais aussi sous la forme de bandes de plus hauts poids moléculaires présentes uniquement au cours de leurs CVO. Ces bandes de haut poids moléculaire, présentes même en conditions réduites (avec β -mercaptoéthanol), suggèrent la présence d'agrégats moléculaires et donc un processus de clusterisation de la bande 3 au cours de leurs crises (**Figure 2 n°2**).

Figure 1 : Etude de la carbonylation des protéines membranaires par western Blot sur gel de polyacrylamide 8%

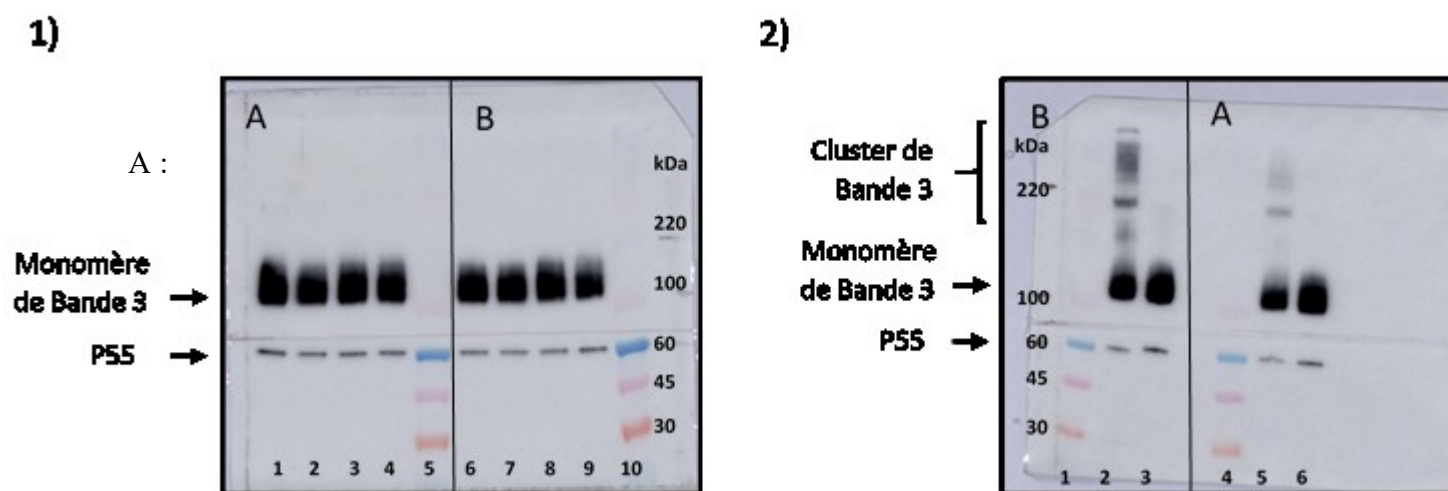


Patient en CVO (puit 1) et son contrôle négatif de carbonylation (puit 2)
 Patient à l'état de base (puit 4) et son contrôle négatif de carbonylation (puit 5)

Tableau 1 : Analyse densitométrique de la carbonylation des protéines membranaires, normalisée par rapport à la protéine contrôle P55

Patients	Carbonylation des protéines membranaires			
	CVO		base	
	globale	bande 3	globale	bande 3
1	175	58	98	49
2	365	67	346	58
3	239	41	269	40
4	313	68	261	33
5	81	16	93	23
6	342	126	100	30

Figure 2 : Détection des différentes conformations de la protéine bande 3 par western blots sur gel de polyacrylamide de concentration 4-12%



A : Echantillons en conditions réduites (0,83 M de β -mercaptoéthanol)

B : Echantillons en conditions non réduites (sans β -mercaptoéthanol).

1) western blot de deux patients ne présentant que des monomères de bande 3, que ce soit en CVO (puits 2,7 pour le 1er patient et puits 4,9 pour le 2ème patient) ou à l'état de base (puits 1,6 pour le 1er patient et puits 3,8 pour le 2ème patient)

2) western blot d'un patient présentant uniquement des monomères de bande 3 à l'état de base (puits 3, 6) avec apparition de clusters de bande 3 en CVO (puits 2,5)

Les anticorps primaire et secondaire anti-bande 3 sont respectivement dilués au 1/50000^e et au 1/10000^e. Les anticorps primaire anti-p55 et secondaire sont respectivement dilués au 1/10000^e et au 1/1000^e.

Ces résultats préliminaires suggèrent, chez la majorité des patients drépanocytaires testés, une exacerbation de la carbonylation des protéines membranaires, dont la protéine bande 3, au cours des CVO. Il semblerait également qu'un processus de clusterisation de la bande 3 se produise au cours des CVO.

Cette étude de l'oxydation de la protéine bande 3 nécessite d'être menée sur une plus grande cohorte et poursuivie avec l'utilisation de l'anticorps spécifique des clusters de bande 3 produit par Arashiki.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Drépanocytose, stress oxydant, protéine bande 3 et microparticules

Nous avons, dans un premier temps confirmé la présence d'un stress oxydant chez les sujets drépanocytaires à l'état de base. En effet, nous avons démontré un taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) plus élevé, alors que le taux de glutathion réduit (GSH), reflet du système de défense anti-oxydant, est plus diminué chez les patients drépanocytaires SS et SC comparés aux individus contrôles non drépanocytaires.

Une étude antérieure de Rohn et collaborateurs (Rohn, Hinds, & Vincenzi, 1993) démontre que l'induction *in vitro* d'un stress oxydant par un agent à fort potentiel oxydant, le TBHP, diminue le taux de GSH chez des individus AA. Nos résultats en accord avec ces travaux, indiquent également que le TBHP augmente les taux de ROS et diminue le taux de GSH à la fois chez les sujets contrôles AA et les patients SS et SC.

Par ailleurs, nous avons poursuivi ces travaux par l'étude longitudinale de patients drépanocytaires SS, visant à évaluer l'impact du stress oxydant produit *in vivo* au cours de leurs crises douloureuses.

Les données obtenues confirment la présence d'un stress oxydant chez les drépanocytaires SS à l'état de base. Ils démontrent également que ce stress oxydant est exacerbé au cours des crises. En effet, cette étude révèle :

- des taux élevés des produits dérivés de l'oxydation des protéines (AOPP) et leur augmentation lors de la crise vaso-occlusive, confirmant l'état de peroxydation chronique présente chez les patients drépanocytaires ;
- des taux de MPO élevés lors de l'état de base des patients drépanocytaires et exacerbés au cours des CVO, confirmant également la présence d'une forte inflammation dans la pathologie drépanocytaire, provoquant une hyper activation des polynucléaires neutrophiles, et leur dégranulation (MPO libérée) qui amplifie le stress oxydant existant.

Alors que nous avons précédemment mis en évidence des taux très bas de GSH, (reflet du système de défense anti-oxydant déficient), chez les drépanocytaires à l'état de base par rapport à ceux de sujets indemnes de toute affection, nous montrons, que ces taux de GSH sont encore diminués au cours des CVO. Cependant, aucune différence n'était décelée concernant le ratio GSH/GSSG au cours de la crise comparé à l'état de base. .

Nos résultats montrent également une diminution du taux d'anticorps anti-bande 3 au cours des crises comparés à l'état de base pouvant découler de la clusterisation de la protéine bande 3. Considérant les travaux qui montrent que cette modification de la protéine bande 3 permet non seulement l'exposition de motifs antigéniques normalement enfouis dans la bicouche lipidique et reconnus par les auto anticorps anti-bande 3 (Crandall & Sherman, 1994), mais aussi l'exposition de nouveaux sites adhésifs pour l'endothélium (Thevenin et al., 1997), la diminution du taux d'anticorps anti-bande 3 durant les CVO conforterait l'hypothèse du rôle anti-adhésif de ces IgG.

Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de conclure si cette diminution d'anticorps anti-bande 3 est due à une diminution de leur production ou à augmentation du nombre de clusters de bande 3.

Pour mieux évaluer le niveau d'oxydation de la protéine bande 3, nous avons mis en place l'étude basée sur l'analyse par western-blot de la carbonylation de la protéine et du processus de clusterisation chez 7 patients drépanocytaires SS à l'état de base et au cours de leur CVO. Les résultats de cette étude suggèrent un processus de clusterisation favorisé chez 2 patients drépanocytaires au cours de leur CVO. Les résultats de cette étude indiquent également une carbonylation globale des protéines membranaires du globule rouge plus importante chez 4 patients en CVO comparé à l'état de base. Cette carbonylation exacerbée des protéines membranaires est corrélée à l'augmentation de la carbonylation de la protéine bande 3 au cours des CVO.

Ces résultats tendent à confirmer que le stress oxydant induit une carbonylation à l'origine de remaniements de la membrane érythrocytaire et que le regroupement de la bande 3 sous forme de clusters semblent favorisé au cours des CVO.

En accord avec les études de Shet (Shet et al., 2003), nos résultats démontrent une augmentation du taux de microparticules (MPs) circulantes principalement d'origine érythrocytaire lors des CVO.

Sous l'effet du stress oxydant, les processus de phosphorylation et/ou de carbonylation de la protéine bande 3 pourraient altérer son affinité pour l'ankyrine et pourrait également favoriser l'émission de MPs érythrocytaires (Ferru et al., 2011).

Les travaux de Miki et collaborateurs (Miki et al., 2007) ont également suggéré que le processus de clusterisation de la protéine bande 3 pourrait être initié par l'activation de la caspase 3, qui cliverait la protéine bande 3 et diminuerait son affinité avec la protéine 4.2 ,

altérant ainsi l'ancrage de la protéine bande 3 au cytosquelette érythrocytaire et favorisant son regroupement sous forme d'agrégats. La corrélation entre la diminution du taux d'auto anticorps anti-bande 3 et l'augmentation de l'activité de la caspase 3 retrouvée que nous observé semble conforter le fait que l'activation de la caspase 3 durant les CVO pourrait favoriser le clusterisation de la protéine bande 3 et la libération de MPs de la membrane érythrocytaire.

Plusieurs effets potentiellement délétères ont été associés aux MPs d'origine érythrocytaire. Les travaux de Van Beers (van Beers et al., 2009) et Gerotziafas (Gerotziafas et al., 2012) montrent que ces MPs sont des acteurs majeurs des altérations de la coagulation retrouvées dans la drépanocytose. De plus, l'externalisation de la phosphatidylsérine semble favoriser la liaison de l'hème à la membrane des MPs érythrocytaires et engendrer une cascade de processus néfastes tels que exacerbation du stress oxydant et de l'apoptose des cellules endothéliales en culture, et une altération de la vasodilatation endothéliale chez un modèle de souris drépanocytaires (S. M. Camus et al., 2015).

Nos résultats démontrent également une libération légèrement augmentée des MPs dérivées des neutrophiles durant les CVO. Bien que ces résultats n'aient jamais été documentés, ils sont en accord avec l'augmentation de la MPO plasmatique durant les crises, et confortent l'activation des neutrophiles conférant à la drépanocytose une composante inflammatoire.

En revanche, les travaux de Shet et collaborateurs indiquent également une libération de MPs monocytaires et de MPs exprimant le facteur tissulaire au cours des CVO non retrouvée dans notre étude. Cela peut provenir des différences de génotype des patients inclus dans ces travaux ainsi que les différences relatives aux procédures de purification et d'analyse des MPs utilisées.



Altérations hémorhéologiques

Nous avons dans un premier temps évalué l'effet *in vitro* d'un stress oxydant induit par le TBHP sur les paramètres hémorhéologiques de patients drépanocytaires à l'état de base. Nous avons mis en évidence, en absence de cet agent oxydant chez les sujets drépanocytaires à l'état de base des altérations hémorhéologiques en accord avec les données déjà publiées par notre équipe (Tripette et al., 2009) et de Waltz (Waltz, Hedreville, et al., 2012) (Waltz, Pichon, et al., 2012). En effet, comparés aux sujets contrôles, les patients drépanocytaires

présentent une déformabilité et une agrégation érythrocytaire réduites, mais une augmentation du seuil de désagrégation érythrocytaire.

Avec l'induction du stress oxydant par le TBHP, on observe une diminution de la déformabilité et de l'agrégation et une augmentation du seuil de désagrégation érythrocytaire, à la fois chez les sujets contrôles AA et chez les drépanocytaires, l'effet étant majoré chez ces derniers. Ainsi, en présence de TBHP, les globules rouges normaux adoptent un profil hémorhéologique proche de celui des globules rouges des drépanocytaires à l'état de base.

Ces différentes données suggèrent que les altérations hémorhéologiques retrouvées dans la drépanocytose sont en partie liées au contexte oxydatif bien caractérisé dans la maladie.

Nous avons par ailleurs, dans le cadre du suivi longitudinal des patients drépanocytaires SS au cours de leurs CVO et retour à l'état de base, montré que les altérations rhéologiques sont nettement plus accentuées lors des crises vaso-occlusives. En effet, les résultats indiquent que la déformabilité érythrocytaire déjà réduite chez les patients drépanocytaires SS à l'état stationnaire, est nettement diminuée chez ces patients au cours des crises vaso-occlusives. Par ailleurs, nous retrouvons une augmentation de l'agrégation érythrocytaire et du seuil de désagrégation érythrocytaire chez ces patients au cours de leurs crises douloureuses comparés à leurs états de base.

Les résultats concernant la diminution de la déformabilité et l'augmentation du seuil de désagrégation au cours des CVO correspondent aux effets que nous avons détectés dans le cadre du stress oxydant induit *in vitro*. Cependant, alors que nous retrouvons une agrégation diminuée chez les drépanocytaires SS dans sous l'effet de ce stress oxydant provoqué par le TBHP, nous observons au cours de la CVO une augmentation de l'agrégation érythrocytaire.

La diminution de l'indice d'agrégation mise en évidence dans le cadre du stress oxydant induit *in vitro* pourrait s'expliquer par le fait que, dans ce contexte, les GR moins déformables établissent entre eux moins de contact. Dans le cas des CVO, au-delà du stress oxydant, d'autres paramètres tels que l'inflammation favorisent la vaso-occlusion et participent à l'altération de la rhéologie sanguine. En effet, le fibrinogène, protéine plasmatique marqueur de l'inflammation (Davalos & Akassoglou, 2012) qui est retrouvé à des taux élevés dans la drépanocytose (Emokpae, Uadia, & Gadzama) possède des propriétés pro-agrégantes et pourrait influencer l'agrégabilité des GR pendant les CVO.



Dysfonctions de l'activité du SNA

Alors que des travaux précédemment menés au sein de notre équipe ont montré que l'activité du SNA était très réduite chez les patients drépanocytaires les plus exposés aux CVO (Nébor D et al), l'activité du SNA, n'avait jamais encore été évaluée lors d'épisodes aigus de CVO.

Nos résultats suggèrent que ce déséquilibre marqué par un retrait du système nerveux parasympathique, est accentué chez les patients au cours de leurs crises douloureuses. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer si le déséquilibre est dû à une domination de l'activité sympathique ou s'il est dû à une défaillance du système parasympathique.

Considérant les travaux de Connes (Connes et al., 2008) suggérant que l'équilibre de l'activité du SNA serait affecté par les altérations hémorhéologiques chez des sujets porteurs du trait drépanocytaires (AS) et des sujets contrôles non drépanocytaires (AA), les analyses de corrélations entre les anomalies rhéologiques détectées au cours de ce suivi des patients en CVO et à l'état de base seront réalisées.



Perspectives

Si l'implication du stress oxydant est déjà bien établie dans la drépanocytose, il n'y a en revanche que très peu de données relatives à l'analyse de corrélations entre l'expression des marqueurs pro- ou anti-oxydants et les complications, notamment les crises vaso-occlusives.

Ces corrélations permettraient de préciser d'éventuelles cibles du stress oxydant. De telles études, qui nécessitent l'inclusion de grandes cohortes de patients drépanocytaires suivies longitudinalement, restent à être menées.

L'une des conséquences de l'exacerbation du stress oxydatif au cours des crises vaso-occlusives est l'émission accrue de microparticules érythrocytaires. Nos données suggèrent que la densité membranaire de la phosphatidylsérine est supérieure à celle observée à l'état de base. Considérant le fait que les effets délétères des MPs d'origine érythrocytaire résultent en partie de l'externalisation de la PS, il serait intéressant d'analyser, sur les cellules endothéliales, les effets de ces microvésicules potentiellement plus toxiques.

En regard, des données encourageantes suggérant les effets bénéfiques de la N-acétylcystéine (Dominique Labie, 1999) (Nur et al., 2012), les propriétés anti-oxydantes de l'hydroxyurée via ses effets sur la glutathion peroxidase (Nur et al., 2012) ou encore celles de l'hémopexine (Vinchi et al., 2013)] , des perspectives thérapeutiques axées sur les traitement anti-oxydants seraient à envisager.

De tels traitements antioxydants pourraient diminuer le processus de clusterisation de la bande 3 et de ce fait, une consommation excessive des anticorps anti bande 3. Si il est confirmé que la bande 3 clusterisée est un acteur majeur de l'adhérence des globules rouges drépanocytaires aux cellules endothéliales, l'administration d'anticorps anti-bande 3 visant à réduire l'intensité et la sévérité des crises vaso-occlusives pourrait être une piste à envisager.

Bien que nos travaux soient axés sur les crises vaso-occlusives, nous pouvons également nous interroger quant à l'impact du stress oxydant sur d'autres complications appartenant au même sous- phénotype hyper-visqueux et vaso-occlusif tel que le syndrome thoracique aigu. Il serait également judicieux d'étendre ces travaux aux complications appartenant à l'autre sous-phénotype décrit par Gladwin, le phénotype hémolytique, pour lesquelles le stress oxydatif est probablement très important en raison de l'hémolyse intravasculaire.

Références

- Adedeji, M. O., & Ukoli, F. A. (1987). Haematological factors associated with leg ulcer in sickle cell disease. *Tropical and Geographical Medicine*, 39(4), 354–6.
- Aidoo, M., Terlouw, D. J., Kolczak, M. S., McElroy, P. D., ter Kuile, F. O., Kariuki, S., ... Udhayakumar, V. (2002). Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*, 359(9314), 1311–2.
- Alexy, T., Sangkatumvong, S., Connes, P., Pais, E., Tripette, J., Barthelemy, J. C., ... Coates, T. D. (2010). Sickle cell disease: selected aspects of pathophysiology. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 44(3), 155–66.
- Allon, M. (1990). Renal abnormalities in sickle cell disease. *Archives of Internal Medicine*, 150(3), 501–4.
- Amer, J., & Fibach, E. (2004). Oxidative status of platelets in normal and thalassemic blood. *Thrombosis and Haemostasis*, 92(5), 1052–9.
- Amer, J., & Fibach, E. (2005). Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta-thalassaemia patients. *British Journal of Haematology*, 129(3), 435–41.
- Amer, J., Ghoti, H., Rachmilewitz, E., Koren, A., Levin, C., & Fibach, E. (2006). Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *British Journal of Haematology*, 132(1), 108–13. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05834.x>
- Amer, J., Goldfarb, A., & Fibach, E. (2003). Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. *European Journal of Haematology*, 70(2), 84–90.
- An, X., & Mohandas, N. (2008). Disorders of red cell membrane. *British Journal of Haematology*, 141(3), 367–75. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07091.x>
- Anie, K. A., & Massaglia, P. (2014). Psychological therapies for thalassaemia. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3, CD002890.
- Anthi, A., Machado, R. F., Jison, M. L., Taveira-Dasilva, A. M., Rubin, L. J., Hunter, L., ... Gladwin, M. T. (2007). Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(12), 1272–9. <http://doi.org/10.1164/rccm.200610-1498OC>
- Antonucci, R., Walker, R., Herion, J., & Orringer, E. (1990). Enhancement of sickle erythrocyte adherence to endothelium by autologous platelets. *American Journal of Hematology*, 34(1), 44–8.

Apovo, M., Beuzard, Y., Galacteros, F., Bachir, D., & Giraud, F. (1994). The involvement of the Ca-dependent K channel and of the KCl co-transport in sickle cell dehydration during cyclic deoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1225(3), 255–8.

Arashiki, N., Kimata, N., Manno, S., Mohandas, N., & Takakuwa, Y. (2013). Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry*, 52(34), 5760–9.

Armstrong, R. C., & Swallow, A. J. (1969). Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan. *Radiation Research*, 40(3), 563–79.

Arraud, N., Gounou, C., Linares, R., & Brisson, A. R. (2014). A Simple Flow Cytometry Method Improves the Detection of Phosphatidylserine-Exposing Extracellular Vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*.

Arruda, M. M., Mecabo, G., Rodrigues, C. A., Matsuda, S. S., Rabelo, I. B., & Figueiredo, M. S. (2013). Antioxidant vitamins C and E supplementation increases markers of haemolysis in sickle cell anaemia patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Haematology*, 160(5), 688–700.

Asakura, T., Minakata, K., Adachi, K., Russell, M. O., & Schwartz, E. (1977). Denatured hemoglobin in sickle erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 59(4), 633–40.

Aslan, M., Thornley-Brown, D., & Freeman, B. A. (2000). Reactive species in sickle cell disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 375–91.

Ataga, K. I. (2009). Novel therapies in sickle cell disease. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 54–61.

Ataga, K. I., Moore, C. G., Jones, S., Olajide, O., Strayhorn, D., Hinderliter, A., & Orringer, E. P. (2006). Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study. *British Journal of Haematology*, 134(1), 109–15.

Bachir D, Virag R, Lee K, Bellay M, De Montalembert M, D., & L, et al. (1997). Prévention et traitement des troubles érectiles de la drépanocytose.

Balla, J., Jacob, H. S., Balla, G., Nath, K., Eaton, J. W., & Vercellotti, G. M. (1993). Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20), 9285–9.

Ballas, S. K. (1998). Sickle cell disease: clinical management. *Baillière's Clinical Haematology*, 11(1), 185–214.

Barabino, G. A., McIntire, L. V, Eskin, S. G., Sears, D. A., & Udden, M. (1987). Rheological studies of erythrocyte-endothelial cell interactions in sickle cell disease. *Progress in Clinical and Biological Research*, 240, 113–27.

Barabino, G. A., Platt, M. O., & Kaul, D. K. (2010). Sick cell biomechanics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12, 345–67.

Barry, O. P., & FitzGerald, G. A. (1999). Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thrombosis and Haemostasis*, 82(2), 794–800.

Barshtein, G., Ben-Ami, R., & Yedgar, S. (2007). Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 5(4), 743–52.

Baskurt, O. K., Boynard, M., Cokelet, G. C., Connes, P., Cooke, B. M., Forconi, S., ... Wautier, J. L. (2009). New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 42(2), 75–97.

Baskurt, O. K., & Meiselman, H. J. (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 29(5), 435–50.

Baskurt, O. K., Temiz, A., & Meiselman, H. J. (1998). Effect of Superoxide Anions on Red Blood Cell Rheologic Properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(1), 102–110.

Beetsch, J. W., Park, T. S., Dugan, L. L., Shah, A. R., & Gidday, J. M. (1998). Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Research*, 786(1-2), 89–95.

Belcher, J. D., Marker, P. H., Weber, J. P., Hebbel, R. P., & Vercellotti, G. M. (2000). Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood*, 96(7), 2451–9.

Benjamin, L. J., Swinson, G. I., & Nagel, R. L. (2000). Sick cell anemia day hospital: an approach for the management of uncomplicated painful crises. *Blood*, 95(4), 1130–6.

Benkerrou, M., Delarche, C., Brahimi, L., Fay, M., Vilmer, E., Elion, J., ... Elbim, C. (2002). Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*, 99(7), 2297–303.

Bernaudin, F., Socie, G., Kuentz, M., Chevret, S., Duval, M., Bertrand, Y., ... Gluckman, E. (2007). Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood*, 110(7), 2749–56.

Bhagat, S., Patra, P. K., & Thakur, A. S. (2012). Association of Inflammatory Biomarker C-Reactive Protein, Lipid Peroxidation and Antioxidant Capacity Marker with HbF Level in Sick Cell Disease Patients from Chattisgarh. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 27(4), 394–9.

Blockmans, D., Deckmyn, H., & Vermynen, J. (1995). Platelet activation. *Blood Reviews*, 9(3), 143–56.

Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. *Biochimie Pathologique: Aspects Moléculaires et Cellulaires*.

- Bor-Kucukatay, M., Wenby, R. B., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2003). Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284(5), H1577–84.
- Boulanger, C., & Lüscher, T. F. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *The Journal of Clinical Investigation*, 85(2), 587–90.
- Brandão, M. M., Fontes, A., Barjas-Castro, M. L., Barbosa, L. C., Costa, F. F., Cesar, C. L., & Saad, S. T. O. (2003). Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, 70(4), 207–11.
- Brittain, H. A., Eckman, J. R., Swerlick, R. A., Howard, R. J., & Wick, T. M. (1993). Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. *Blood*, 81(8), 2137–43.
- Brittain, J. E., Han, J., Ataga, K. I., Orringer, E. P., & Parise, L. V. (2004). Mechanism of CD47-induced $\alpha 4 \beta 1$ integrin activation and adhesion in sickle reticulocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42393–402.
- Brittain, J. E., Mlinar, K. J., Anderson, C. S., Orringer, E. P., & Parise, L. V. (2001). Activation of sickle red blood cell adhesion via integrin-associated protein/CD47-induced signal transduction. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(12), 1555–62.
- Brittain, J. E., & Parise, L. V. (2008). The $\alpha 4 \beta 1$ integrin in sickle cell disease. *Transfusion Clinique et Biologique : Journal de La Société Française de Transfusion Sanguine*, 15(1-2), 19–22.
- Brot, N., & Weissbach, H. (2000). Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers*, 55(4), 288–96.
- Browne, P. V., Mosher, D. F., Steinberg, M. H., & Hebbel, R. P. (1996). Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 51(4), 296–301.
- Brugnara, C., & Tosteson, D. C. (1987). Inhibition of K transport by divalent cations in sickle erythrocytes. *Blood*, 70(6), 1810–5.
- Buchanan, G., Vichinsky, E., Krishnamurti, L., & Shenoy, S. (2010). Severe sickle cell disease--pathophysiology and therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 16(1 Suppl), S64–7.
- Burrows, C. J., & Muller, J. G. (1998). Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chemical Reviews*, 98(3), 1109–1152.
- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(3-4), 222–30.

- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L., & Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research*, 424(1-2), 9–21.
- Callahan, M. K., Williamson, P., & Schlegel, R. A. (2000). Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death and Differentiation*, 7(7), 645–53.
- Campanella, M. E., Chu, H., Wandersee, N. J., Peters, L. L., Mohandas, N., Gilligan, D. M., & Low, P. S. (2008). Characterization of glycolytic enzyme interactions with murine erythrocyte membranes in wild-type and membrane protein knockout mice. *Blood*, 112(9), 3900–6.
- Camus, S. M., De Moraes, J. A., Bonnin, P., Abbyad, P., Le Jeune, S., Lionnet, F., ... Blanc-Brude, O. P. (2015). Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vaso-occlusions in sickle cell disease. *Blood*.
- Camus, S. M., Gausserès, B., Bonnin, P., Loufrani, L., Grimaud, L., Charue, D., ... Blanc-Brude, O. P. (2012). Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. *Blood*, 120(25), 5050–8.
- Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M.-C., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2006). [Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]. *Médecine Sciences : M/S*, 22(1), 47–53.
- Cassoly, R. (1983). Quantitative analysis of the association of human hemoglobin with the cytoplasmic fragment of band 3 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(6), 3859–64.
- Castro, O., Brambilla, D. J., Thorington, B., Reindorf, C. A., Scott, R. B., Gillette, P., ... Levy, P. S. (1994). The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*, 84(2), 643–9.
- Castro, O., Hoque, M., & Brown, B. D. (2003). Pulmonary hypertension in sickle cell disease: cardiac catheterization results and survival. *Blood*, 101(4), 1257–61.
- Chaar, V., Laurance, S., Lapoumeroulie, C., Cochet, S., De Grandis, M., Colin, Y., ... El Nemer, W. (2014). Hydroxycarbamide decreases sickle reticulocyte adhesion to resting endothelium by inhibiting endothelial lutheran/basal cell adhesion molecule (Lu/BCAM) through phosphodiesterase 4A activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(16), 11512–21.
- Chaar, V., Picot, J., Renaud, O., Bartolucci, P., Nzouakou, R., Bachir, D., ... El Nemer, W. (2010). Aggregation of mononuclear and red blood cells through an $\alpha_4\beta_1$ -Lu/basal cell adhesion molecule interaction in sickle cell disease. *Haematologica*, 95(11), 1841–8.
- Champion, H. C., Bivalacqua, T. J., Takimoto, E., Kass, D. A., & Burnett, A. L. (2005). Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(5), 1661–6.

Chang, J., Shi, P. A., Chiang, E. Y., & Frenette, P. S. (2008). Intravenous immunoglobulins reverse acute vaso-occlusive crises in sickle cell mice through rapid inhibition of neutrophil adhesion. *Blood*, 111(2), 915–23.

Chang, Y. C., Smith, K. D., Moore, R. D., Serjeant, G. R., & Dover, G. J. (1995). An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. *Blood*, 85(4), 1111–7.

Charache, S., Dover, G. J., Moore, R. D., Eckert, S., Ballas, S. K., Koshy, M., ... Platt, O. S. (1992). Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*, 79(10), 2555–65.

Charache, S., Terrin, M. L., Moore, R. D., Dover, G. J., Barton, F. B., Eckert, S. V., ... Bonds, D. R. (1995). Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *The New England Journal of Medicine*, 332(20), 1317–22.

Chiang, E. Y., & Frenette, P. S. (2005). Sickle cell vaso-occlusion. *Hematology/oncology Clinics of North America*, 19(5), 771–84, v.

Chiang, E. Y., Hidalgo, A., Chang, J., & Frenette, P. S. (2007). Imaging receptor microdomains on leukocyte subsets in live mice. *Nature Methods*, 4(3), 219–22.

Chien, S., Usami, S., & Bertles, J. F. (1970). Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 49(4), 623–34.

Chies, J. A., & Nardi, N. B. (2001). Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Medical Hypotheses*, 57(1), 46–50.

Chirico, E. N., & Pialoux, V. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*, 64(1), 72–80.

Chiu, D., Lubin, B., Roelofsen, B., & van Deenen, L. L. (1981). Sickled erythrocytes accelerate clotting in vitro: an effect of abnormal membrane lipid asymmetry. *Blood*, 58(2), 398–401.

Cho, C.-S., Kato, G. J., Yang, S. H., Bae, S. W., Lee, J. S., Gladwin, M. T., & Rhee, S. G. (2010). Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(1), 1–11.

Chu, H., Breite, A., Ciruolo, P., Franco, R. S., & Low, P. S. (2008). Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties. *Blood*, 111(2), 932–8.

- Claster, S., & Vichinsky, E. P. (2003). Managing sickle cell disease. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 327(7424), 1151–5.
- Cnaan, A., & Ryan, L. (1989). Survival analysis in natural history studies of disease. *Statistics in Medicine*, 8(10), 1255–68.
- Coletta, M., Hofrichter, J., Ferrone, F. A., & Eaton, W. A. (1982). Kinetics of sickle haemoglobin polymerization in single red cells. *Nature*, 300(5888), 194–7.
- Connes, P. (2011). Altered autonomic nervous system function in sickle cell disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(4), 398–400.
- Connes, P., & Coates, T. D. (2013). Autonomic nervous system dysfunction: implication in sickle cell disease. *Comptes Rendus Biologies*, 336(3), 142–7.
- Connes, P., Hue, O., Hardy-Dessources, M.-D., Boucher, J. H., Pichot, V., & Barthélémy, J.-C. (2008). Hemorheology and heart rate variability: is there a relationship? *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 38(4), 257–65.
- Connes, P., Lamarre, Y., Hardy-Dessources, M.-D., Lemonne, N., Waltz, X., Mougenel, D., ... Romana, M. (2013). Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. *PloS One*, 8(11), e79680.
- Connes, P., Lamarre, Y., Waltz, X., Ballas, S. K., Lemonne, N., Etienne-Julan, M., ... Romana, M. (2014). Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, 165(4), 564–72.
- Cook, J. E., & Meyer, J. (1915). Severe anemia with remarkable elongated and sickle-shaped red blood cells and chronic leg ulcers. *Archives of Internal Medicine*, (16), 644–651.
- Corbett, J. D., & Golan, D. E. (1993). Band 3 and glycophorin are progressively aggregated in density-fractionated sickle and normal red blood cells. Evidence from rotational and lateral mobility studies. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(1), 208–17.
- Crandall, I., & Sherman, I. W. (1994). Cytoadherence-related neoantigens on Plasmodium falciparum (human malaria)-infected human erythrocytes result from the exposure of normally cryptic regions of the band 3 protein. *Parasitology*, 108 (Pt 3), 257–67.
- Croizat, H. (1994). Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *British Journal of Haematology*, 87(3), 592–7.
- Das, S. K., & Nair, R. C. (1980). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *British Journal of Haematology*, 44(1), 87–92.
- Dasgupta, T., Hebbel, R. P., & Kaul, D. K. (2006). Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(12), 1771–80. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.025>

- Davalos, D., & Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 34(1), 43–62.
- De Franceschi, L., Fumagalli, L., Olivieri, O., Corrocher, R., Lowell, C. A., & Berton, G. (1997). Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(2), 220–7.
- Dekou A., Ouegnin G.A., Konan P.G., Kouame B., M. K. (2006). Les étiologies et facteurs de risque du priapisme à partir d'une série colligée dans le service d'urologie du CHU de Cocody à Abidjan.
- Dominique Helley. (2011). Les nouveaux marqueurs d'activation de l'hémostase : les microparticules. *Revue Francophone Des Laboratoires*.
- Dominique Labie, J. E. (1999). La N-acétylcystéine, traitement d'appoint de la drépanocytose par son action anti-oxydative.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- Durpès, M.-C., Hardy-Dessources, M.-D., El Nemer, W., Picot, J., Lemonne, N., Elion, J., & Decastel, M. (2011). Activation state of $\alpha 4 \beta 1$ integrin on sickle red blood cells is linked to the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(4), 3057–64.
- Durpès, M.-C., Nebor, D., du Mesnil, P. C., Mougénel, D., Decastel, M., Elion, J., & Hardy-Dessources, M.-D. (2010). Effect of interleukin-8 and RANTES on the Gardos channel activity in sickle human red blood cells: role of the Duffy antigen receptor for chemokines. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 44(4), 219–23.
- Dykes, G. W., Crepeau, R. H., & Edelstein, S. J. (1979). Three-dimensional reconstruction of the 14-filament fibers of hemoglobin S. *Journal of Molecular Biology*, 130(4), 451–72.
- El Nemer, W., Gauthier, E., Wautier, M.-P., Rahuel, C., Gane, P., Galactéros, F., ... Le Van Kim, C. (2008). Role of Lu/BCAM in abnormal adhesion of sickle red blood cells to vascular endothelium. *Transfusion Clinique et Biologique : Journal de La Société Française de Transfusion Sanguine*, 15(1-2), 29–33.
- El Nemer, W., Wautier, M.-P., Rahuel, C., Gane, P., Hermand, P., Galactéros, F., ... Le Van Kim, C. (2007). Endothelial Lu/BCAM glycoproteins are novel ligands for red blood cell $\alpha 4 \beta 1$ integrin: role in adhesion of sickle red blood cells to endothelial cells. *Blood*, 109(8), 3544–51.
- Eldor, A. (1978). Abnormal platelet functions in beta thalassaemia. *Scandinavian Journal of Haematology*, 20(5), 447–52.
- Embury, S. H. (2004). The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 11(2), 101–13.

- Emokpae, M. A., Uadia, P. O., & Gadzama, A. A. Correlation of oxidative stress and inflammatory markers with the severity of sickle cell nephropathy. *Annals of African Medicine*, 9(3), 141–6.
- Fadlon, E., Vordermeier, S., Pearson, T. C., Mire-Sluis, A. R., Dumonde, D. C., Phillips, J., ... Brown, K. A. (1998). Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood*, 91(1), 266–74.
- Fadok, V. A., de Cathelineau A, Daleke, D. L., Henson, P. M., & Bratton, D. L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1071–7.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(7), 2207–16.
- Falk, R. J., & Jennette, J. C. (1994). Sickle cell nephropathy. *Advances in Nephrology from the Necker Hospital*, 23, 133–47.
- Fang, F. C. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(12), 2818–25.
- Fasola, F., Adedapo, K., Anetor, J., & Kutu, M. (2007). Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. *Journal of the National Medical Association*, 99(8), 891–4.
- Fathallah, H., Coezy, E., de Neef, R. S., Hardy-Dessources, M. D., & Giraud, F. (1995). Inhibition of deoxygenation-induced membrane protein dephosphorylation and cell dehydration by phorbol esters and okadaic acid in sickle cells. *Blood*, 86(5), 1999–2007.
- Favier, A. (2003a). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
- Favier, A. (2003b). Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
- Faye, P. M., De Jonckheere, J., Logier, R., Kuissi, E., Jeanne, M., Rakza, T., & Storme, L. (2010). Newborn infant pain assessment using heart rate variability analysis. *The Clinical Journal of Pain*, 26(9), 777–82.
- Ferru, E., Giger, K., Pantaleo, A., Campanella, E., Grey, J., Ritchie, K., ... Low, P. S. (2011). Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood*, 117(22), 5998–6006.

- Field, J. J., Knight-Perry, J. E., & Debaun, M. R. (2009). Acute pain in children and adults with sickle cell disease: management in the absence of evidence-based guidelines. *Current Opinion in Hematology*, 16(3), 173–8.
- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Letters*, 476(1-2), 52–4.
- Finsnes, F., Christensen, G., Lyberg, T., Sejersted, O. M., & Skjøsberg, O. H. (1998). Increased synthesis and release of endothelin-1 during the initial phase of airway inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(5 Pt 1), 1600–6.
- Francis, R. B., & Haywood, L. J. (1992). Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *Journal of the National Medical Association*, 84(7), 611–5.
- Frenette, P. S. (2004). Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 11(2), 167–77.
- Frenette, P. S., & Atweh, G. F. (2007). Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 850–8.
- Friedman, M. J. (1978). Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(4), 1994–7.
- Gandhi, R. A., Marques, J. L. B., Selvarajah, D., Emery, C. J., & Tesfaye, S. (2010). Painful diabetic neuropathy is associated with greater autonomic dysfunction than painless diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, 33(7), 1585–90.
- Gardos, G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30(3), 653–4.
- Gaston, M. H., Verter, J. I., Woods, G., Pegelow, C., Kelleher, J., Presbury, G., ... Lobel, J. S. (1986). Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *The New England Journal of Medicine*, 314(25), 1593–9.
- Gayen Betal, S., & Setty, B. N. Y. (2008). Phosphatidylserine-positive erythrocytes bind to immobilized and soluble thrombospondin-1 via its heparin-binding domain. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 152(4), 165–77.
- Gee, B. E., & Platt, O. S. (1995). Sickle reticulocytes adhere to VCAM-1. *Blood*, 85(1), 268–74.
- Genetet, S., Ripoche, P., Picot, J., Bigot, S., Delaunay, J., Armari-Alla, C., ... Mouro-Chanteloup, I. (2012). Human RhAG ammonia channel is impaired by the Phe65Ser mutation in overhydrated stomatocytic red cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 302(2), C419–28.

- Gerotziafas, G. T., Van Dreden, P., Chaari, M., Galea, V., Khaterchi, A., Lionnet, F., ... Elalamy, I. (2012). The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles. *Thrombosis and Haemostasis*, 107(6), 1044–52.
- Gibson, X. A., Shartava, A., McIntyre, J., Monteiro, C. A., Zhang, Y., Shah, A., ... Goodman, S. R. (1998). The efficacy of reducing agents or antioxidants in blocking the formation of dense cells and irreversibly sickled cells in vitro. *Blood*, 91(11), 4373–8.
- Gill, F. M., Sleeper, L. A., Weiner, S. J., Brown, A. K., Bellevue, R., Grover, R., ... Vichinsky, E. (1995). Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*, 86(2), 776–83.
- Girot R, Galactéros F, Lena-Russo D, M.-R. M., & Bardakdjian-Michau J, M. M. (1990). Dépistage Néonatal de la Drépanocytose en France Métropolitaine.
- Gizi, A., Papassotiriou, I., Apostolakou, F., Lazaropoulou, C., Papastamataki, M., Kanavaki, I., ... Kanavakis, E. (2011). Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant–antioxidant status. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46(3), 220–225.
- Gladwin, M. T., Sachdev, V., Jison, M. L., Shizukuda, Y., Plehn, J. F., Minter, K., ... Ognibene, F. P. (2004). Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *The New England Journal of Medicine*, 350(9), 886–95.
- Gladwin, M. T., & Vichinsky, E. (2008). Pulmonary complications of sickle cell disease. *The New England Journal of Medicine*, 359(21), 2254–65.
- Graido-Gonzalez, E., Doherty, J. C., Bergreen, E. W., Organ, G., Telfer, M., & McMillen, M. A. (1998). Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood*, 92(7), 2551–5.
- Grau, M., Mozar, A., Charlot, K., Lamarre, Y., Weyel, L., Suhr, F., ... Connes, P. (2015). High red blood cell nitric oxide synthase activation is not associated with improved vascular function and red blood cell deformability in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, 168(5), 728–36.
- Grau, M., Pauly, S., Ali, J., Walpurgis, K., Thevis, M., Bloch, W., & Suhr, F. (2013). RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. *PloS One*, 8(2), e56759.
- Graves, L. E., Ariztia, E. V, Navari, J. R., Matzel, H. J., Stack, M. S., & Fishman, D. A. (2004). Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Research*, 64(19), 7045–9.
- Green, N. S., Fabry, M. E., Kaptue-Noche, L., & Nagel, R. L. (1993). Senegal haplotype is associated with higher HbF than Benin and Cameroon haplotypes in African children with sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, 44(2), 145–6.

- Grisendi, G., Finetti, E., Manganaro, D., Cordova, N., Montagnani, G., Spano, C., ... Dominici, M. (2014). Detection of microparticles from human red blood cells by multiparametric flow cytometry. *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue*, 1–7.
- Guzik, T. J., Korbust, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 54(4), 469–87.
- Hahn, E., & Gillespie, E. (1927). Sick cell anemia. Report of a case greatly improved by splenectomy and further observations on mechanism of sick cell formation. *Arch Intern Med*, 39, 233–54.
- Haldane, J. (1949). The rate of mutation of human genes. *Hereditas*, (35), 267–73.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, 1(8391), 1396–7.
- Hamasaki, N. (2006). [Band 3 protein as a metabolic sensor--CO₂ regulates the amount of oxygen delivered to tissues from red blood cells]. *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 263–9.
- Hankins, J. S., Ware, R. E., Rogers, Z. R., Wynn, L. W., Lane, P. A., Scott, J. P., & Wang, W. C. (2005). Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia: the HUSOFT extension study. *Blood*, 106(7), 2269–75.
- Harris, J. W. (1950). Studies on the destruction of red blood cells. VIII. Molecular orientation in sickle cell hemoglobin solutions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 75(1), 197–201.
- Haupt, H. M., Moore, G. W., Bauer, T. W., & Hutchins, G. M. (1982). The lung in sickle cell disease. *Chest*, 81(3), 332–7.
- Hawker, H., Neilson, H., Hayes, R. J., & Serjeant, G. R. (1982). Haematological factors associated with avascular necrosis of the femoral head in homozygous sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 50(1), 29–34.
- Hebbel, R. P. (1984). Erythrocyte autoxidation and the membrane abnormalities of sickle red cells. *Progress in Clinical and Biological Research*, 159, 219–25.
- Hebbel, R. P. (1990). The sickle erythrocyte in double jeopardy: autoxidation and iron decompartmentalization. *Seminars in Hematology*, 27(1), 51–69.
- Hebbel, R. P. (1991). Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*, 77(2), 214–37.
- Hebbel, R. P. (2004). Special issue of Microcirculation: examination of the vascular pathobiology of sickle cell anemia. Foreword. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 11(2), 99–100.

- Hebbel, R. P. (2008). Adhesion of sickle red cells to endothelium: myths and future directions. *Transfusion Clinique et Biologique : Journal de La Société Française de Transfusion Sanguine*, 15(1-2), 14–8.
- Hebbel, R. P., Boogaerts, M. A., Eaton, J. W., & Steinberg, M. H. (1980). Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. *The New England Journal of Medicine*, 302(18), 992–5.
- Hebbel, R. P., Eaton, J. W., Balasingam, M., & Steinberg, M. H. (1982). Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 70(6), 1253–9.
- Hebbel, R. P., & Miller, W. J. (1984). Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia. *Blood*, 64(3), 733–41.
- Hebbel, R. P., Morgan, W. T., Eaton, J. W., & Hedlund, B. E. (1988). Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(1), 237–41.
- Hebbel, R. P., Visser, M. R., Goodman, J. L., Jacob, H. S., & Vercellotti, G. M. (1987). Potentiated adherence of sickle erythrocytes to endothelium infected by virus. *The Journal of Clinical Investigation*, 80(5), 1503–6.
- Herrick, J. B. (1910). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Archives of Internal Medicine*, (6), 517–521.
- Herrmann, A., & Devaux, P. F. (1990). Alteration of the aminophospholipid translocase activity during in vivo and artificial aging of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1027(1), 41–6.
- Hill, A. V, Allsopp, C. E., Kwiatkowski, D., Anstey, N. M., Twumasi, P., Rowe, P. A., ... Greenwood, B. M. (1991). Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 352(6336), 595–600.
- Hocher, B., Thöne-Reineke, C., Rohmeiss, P., Schmager, F., Slowinski, T., Burst, V., ... Theuring, F. (1997). Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(6), 1380–9.
- Hofrichter, J., Ross, P. D., & Eaton, W. A. (1974). Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(12), 4864–8.
- Hofstra, T. C., Kalra, V. K., Meiselman, H. J., & Coates, T. D. (1996). Sickle erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst. *Blood*, 87(10), 4440–7.

- Hoover, R., Rubin, R., Wise, G., & Warren, R. (1979). Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. *Blood*, 54(4), 872–6.
- Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C., & Freyssinet, J.-M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 20, 22–7.
- Huggins, T. G., Wells-Knecht, M. C., Detorie, N. A., Baynes, J. W., & Thorpe, S. R. (1993). Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12341–7.
- Hunter, M. J. (1977). Human erythrocyte anion permeabilities measured under conditions of net charge transfer. *The Journal of Physiology*, 268(1), 35–49.
- Huston, J. M., & Tracey, K. J. (2011). The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. *Journal of Internal Medicine*, 269(1), 45–53.
- Inamo, J., Connes, P., Barthélémy, J.-C., Dan, V., Coates, T., & Loko, G. (2009). Pulmonary hypertension does not affect the autonomic nervous system dysfunction of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 84(5), 311–2.
- Ingram, V. M. (1957). Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*, 180(4581), 326–8.
- Iuliano, L., Colavita, A. R., Leo, R., Praticò, D., & Violi, F. (1997). Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(6), 999–1006.
- Jakubik, L. D., & Thompson, M. Care of the child with sickle cell disease: acute complications. *Pediatric Nursing*, 26(4), 373–9.
- Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G. M., Eaton, J. W., & Balla, G. (2002). Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, 100(3), 879–87.
- Johnson, C. S. (2005). The acute chest syndrome. *Hematology/oncology Clinics of North America*, 19(5), 857–79, vi–vii.
- Joneckis, C. C., Ackley, R. L., Orringer, E. P., Wayner, E. A., & Parise, L. V. (1993). Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. *Blood*, 82(12), 3548–55.
- Jungbluth, G. (2008). Les espèces réactives de l’oxygène et leurs principales implications dans la physiopathologie canine.
- Jy, W., Horstman, L. L., Jimenez, J. J., Ahn, Y. S., Biró, E., Nieuwland, R., ... Hebbel, R. P. (2004). Measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 2(10), 1842–51.

Kan, Y. W., & Dozy, A. M. (1978). Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(11), 5631–5.

Kan, Y. W., Trecartin, R. F., & Dozy, A. M. (1980). Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 344, 141–50.

Kato, G. J., Gladwin, M. T., & Steinberg, M. H. (2007). Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews*, 21(1), 37–47.

Kato, G. J., McGowan, V., Machado, R. F., Little, J. A., Taylor, J., Morris, C. R., ... Gladwin, M. T. (2006). Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, 107(6), 2279–85.

Kaul, D. K., Fabry, M. E., Windisch, P., Baez, S., & Nagel, R. L. (1983). Erythrocytes in sickle cell anemia are heterogeneous in their rheological and hemodynamic characteristics. *The Journal of Clinical Investigation*, 72(1), 22–31.

Kaul, D. K., & Hebbel, R. P. (2000). Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(3), 411–20.

Kaul, D. K., Koshkaryev, A., Artmann, G., Barshtein, G., & Yedgar, S. (2008). Additive effect of red blood cell rigidity and adherence to endothelial cells in inducing vascular resistance. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295(4), H1788–93.

Kaul DK, B. S. and N. R. (1981). Flow properties of oxygenated HbS and HbC erythrocytes in the isolated microvasculature of the rat. A contribution to the hemorheology of hemoglobinopathies. *Clin Hemorheol*, 1 : 73-86.

Kayanoki, Y., Kawata, S., Yamasaki, E., Kiso, S., Inoue, S., Tamura, S., ... Matsuzawa, Y. (1999). Reduced nitric oxide production by L-arginine deficiency in lysinuric protein intolerance exacerbates intravascular coagulation. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 48(9), 1136–40.

Kéclard, L., Ollendorf, V., Berchel, C., Loret, H., & Méréault, G. (1996). beta S haplotypes, alpha-globin gene status, and hematological data of sickle cell disease patients in Guadeloupe (F.W.I.). *Hemoglobin*, 20(1), 63–74.

Kleinbongard, P. (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*, 107(7), 2943–2951.

Klings, E. S., & Farber, H. W. (2001). Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respiratory Research*, 2(5), 280–5.

- Knight-Madden, J. M., Connes, P., Bowers, A., Nebor, D., Hardy-Dessources, M.-D., Romana, M., ... Reid, M. (2013). Relationship between acute chest syndrome and the sympatho-vagal balance in adults with hemoglobin SS disease; a case control study. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 53(3), 231–8.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–50.
- Koshkaryev A., B. G. and Y. S. (2004). Membrane components in the interaction of red blood cells with endothelial cells.
- Krinsky, N. I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 7(6), 617–35.
- Labie, D. (2010). [The complex relations between haemoglobinopathies and malaria]. *Médecine Sciences : M/S*, 26(8-9), 685–7.
- Labie, D., & Elion, J. (2005). Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie*.
- Lacroix, R., Sabatier, F., Mialhe, A., Basire, A., Pannell, R., Borghi, H., ... Dignat-George, F. (2007). Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 110(7), 2432–9.
- Lamarre, Y. (2013). *Implication de l'hémorhéologie dans la physiopathologie de la drépanocytose*.
- Lamarre, Y., Romana, M., Lemonne, N., Hardy-Dessources, M.-D., Tarer, V., Mougenel, D., ... Connes, P. (2014). Alpha thalassemia protects sickle cell anemia patients from macro-albuminuria through its effects on red blood cell rheological properties. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 57(1), 63–72.
- Lamarre, Y., Romana, M., Waltz, X., Lalanne-Mistrih, M.-L., Tressières, B., Divialle-Doumbo, L., ... Connes, P. (2012). Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica*, 97(11), 1641–7.
- Lapoumériou, C., Benkerrou, M., Odièvre, M. H., Ducrocq, R., Brun, M., & Elion, J. (2005). Decreased plasma endothelin-1 levels in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Haematologica*, 90(3), 401–3.
- Lard, L. R., Mul, F. P., de Haas, M., Roos, D., & Duits, A. J. (1999). Neutrophil activation in sickle cell disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(3), 411–5.
- Laurance, S., Lansiaux, P., Pellay, F.-X., Hauchecorne, M., Benecke, A., Elion, J., & Lapoumériou, C. (2011). Differential modulation of adhesion molecule expression by

hydroxycarbamide in human endothelial cells from the micro- and macrocirculation: potential implications in sickle cell disease vasoocclusive events. *Haematologica*, 96(4), 534–42.

Laurance, S., Pellay, F.-X., Dossou-Yovo, O. P., Verger, E., Krishnamoorthy, R., Lapoumeroulie, C., ... Elion, J. (2010). Hydroxycarbamide stimulates the production of proinflammatory cytokines by endothelial cells: relevance to sickle cell disease. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(4), 257–68.

Lawn, R. M., Fritsch, E. F., Parker, R. C., Blake, G., & Maniatis, T. (1978). The isolation and characterization of linked delta- and beta-globin genes from a cloned library of human DNA. *Cell*, 15(4), 1157–74.

Lederberg, J. (1999). J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. *Genetics*, 153(1), 1–3.

Leikin, S. L., Gallagher, D., Kinney, T. R., Sloane, D., Klug, P., & Rida, W. (1989). Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics*, 84(3), 500–8.

Lemaire, C., Lamarre, Y., Lemonne, N., Waltz, X., Chahed, S., Cabot, F., ... Connes, P. (2013). Severe proliferative retinopathy is associated with blood hyperviscosity in sickle cell hemoglobin-C disease but not in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 55(2), 205–12.

Lemonne, N., Lamarre, Y., Romana, M., Mukisi-Mukaza, M., Hardy-Dessources, M.-D., Tarer, V., ... Connes, P. (2013). Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle cell anemia? *Blood*, 121(15), 3054–6.

Lenzi, F. (2011). Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint.

Lerma, C., Martinez, A., Ruiz, N., Vargas, A., Infante, O., & Martinez-Lavin, M. (2011). Nocturnal heart rate variability parameters as potential fibromyalgia biomarker: correlation with symptoms severity. *Arthritis Research & Therapy*, 13(6), R185.

Lionnet, F., Hammoudi, N., Stojanovic, K. S., Avellino, V., Grateau, G., Girot, R., & Haymann, J.-P. (2012). Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica*, 97(8), 1136–41.

Lipowsky, H. H., & Chien, S. (1989). Role of leukocyte-endothelium adhesion in affecting recovery from ischemic episodes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 565, 308–15.

Liu, S. C., Derick, L. H., Zhai, S., & Palek, J. (1991). Uncoupling of the spectrin-based skeleton from the lipid bilayer in sickled red cells. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5005), 574–6.

Low, P. S. (1986). Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 864(2), 145–67.

- Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, K., & Drenckhahn, D. (1985). The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4686), 531–3.
- M. de Montalembert, L. T. (2007). Les progrès thérapeutiques dans la prise en charge de la drépanocytose sont-ils applicables en Afrique Subsaharienne?
- Machado, R. F., Anthi, A., Steinberg, M. H., Bonds, D., Sachdev, V., Kato, G. J., ... Gladwin, M. T. (2006). N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels and risk of death in sickle cell disease. *JAMA*, 296(3), 310–8.
- Mack, A. K., & Kato, G. J. (2006). Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(8), 1237–43.
- Mahfoudhi, E., Lecluse, Y., Driss, F., Abbes, S., Flaujac, C., & Garçon, L. (2012). Red cells exchanges in sickle cells disease lead to a selective reduction of erythrocytes-derived blood microparticles. *British Journal of Haematology*, 156(4), 545–7.
- Manodori, A. B., Barabino, G. A., Lubin, B. H., & Kuypers, F. A. (2000). Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. *Blood*, 95(4), 1293–300.
- Marsella, M., & Borgna-Pignatti, C. (2014). Transfusional iron overload and iron chelation therapy in thalassemia major and sickle cell disease. *Hematology/oncology Clinics of North America*, 28(4), 703–27, vi.
- Masumoto, A., & Hemler, M. E. (1993). Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS1/fibronectin and to vascular cell adhesion molecule-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(1), 228–34.
- Matarrese, P., Straface, E., Pietraforte, D., Gambardella, L., Vona, R., Maccaglia, A., ... Malorni, W. (2005). Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(3), 416–8.
- Mellion, B. T., Ignarro, L. J., Ohlstein, E. H., Pontecorvo, E. G., Hyman, A. L., & Kadowitz, P. J. (1981). Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*, 57(5), 946–55.
- Meziani, F., Delabranche, X., Asfar, P., & Toti, F. (2010). Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Critical Care (London, England)*, 14(5), 236.
- Miki, Y., Tazawa, T., Hirano, K., Matsushima, H., Kumamoto, S., Hamasaki, N., ... Beppu, M. (2007). Clearance of oxidized erythrocytes by macrophages: involvement of caspases in the generation of clearance signal at band 3 glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(1), 57–62.

- Milner, P. F., Kraus, A. P., Sebes, J. I., Sleeper, L. A., Dukes, K. A., Embury, S. H., ... Smith, J. (1991). Sick cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *The New England Journal of Medicine*, 325(21), 1476–81.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(21), 6960–2.
- Mohamed, A. O., Hashim, M. S., Nilsson, U. R., & Venge, P. (1993). Increased in vivo activation of neutrophils and complement in sickle cell disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(6), 799–803.
- Mohan, J. S., Lip, G. Y., Wright, J., Bareford, D., & Blann, A. D. (2005). Plasma levels of tissue factor and soluble E-selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation. *Blood Coagulation & Fibrinolysis : An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 16(3), 209–14.
- Mohan, J. S., Marshall, J. M., Reid, H. L., Thomas, P. W., & Serjeant, G. R. (1997). Postural vasoconstriction and leg ulceration in homozygous sickle cell disease. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 92(2), 153–8.
- Mohandas, N., & Chasis, J. A. (1993). Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Seminars in Hematology*, 30(3), 171–92.
- Mohandas, N., & Evans, E. (1984). Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: requirement for both cell membrane changes and plasma factors. *Blood*, 64(1), 282–7.
- Mohandas, N., & Evans, E. (1994). Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23, 787–818.
- Moncada, S., & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*, 329(27), 2002–12.
- Monplaisir, N., Merault, G., Poyart, C., Rhoda, M. D., Craescu, C., Vidaud, M., ... Rosa, J. (1986). Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(24), 9363–7.
- Morel, O., Toti, F., & Freyssinet, J.-M. (2007). [Markers of thrombotic disease: procoagulant microparticles]. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 65(2), 75–84.
- Mozar, A., Grau, M., Lamarre, Y., Weyel, L., Suhr, F., Collins, B., ... Connes, P. (2015). Red blood cell nitric oxide synthase activation is increased in patients with sickle cell hemoglobin C disease. *American Journal of Hematology*, 90(2), E30–2.
- Mozzarelli, A., Hofrichter, J., & Eaton, W. A. (1987). Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4814), 500–6.

- Mukisi-Mukaza, M., Gomez-Bouchet, A., Donkerwolcke, M., Hinsenkamp, M., & Burny, F. (2011). Histopathology of aseptic necrosis of the femoral head in sickle cell disease. *International Orthopaedics*, 35(8), 1145–50.
- Murayama, M. (1966). Tertiary structure of sickle cell hemoglobin and its functional significance. *Journal of Cellular Physiology*, 67(3), Suppl 1:21–32.
- Nagababu, E., Fabry, M. E., Nagel, R. L., & Rifkind, J. M. (2008). Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 41(1), 60–6. <http://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.12.003>
- Nagel, R. L., & Labie, D. (1989). DNA haplotypes and the beta s globin gene. *Progress in Clinical and Biological Research*, 316B, 371–93.
- Nagel, R. L., Rao, S. K., Dunda-Belkhodja, O., Connolly, M. M., Fabry, M. E., Georges, A., ... Labie, D. (1987). The hematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: the relationship between G gamma and HbF level. *Blood*, 69(4), 1026–30.
- Naumann, H. N., Diggs, L. W., Barreras, L., & Williams, B. J. (1971). Plasma hemoglobin and hemoglobin fractions in sickle cell crisis. *American Journal of Clinical Pathology*, 56(2), 137–47.
- Nebor, D., Bowers, A., Connes, P., Hardy-Dessources, M.-D., Knight-Madden, J., Cumming, V., ... Romana, M. (2014). Plasma concentration of platelet-derived microparticles is related to painful vaso-occlusive phenotype severity in sickle cell anemia. *PloS One*, 9(1), e87243.
- Nebor, D., Bowers, A., Hardy-Dessources, M.-D., Knight-Madden, J., Romana, M., Reid, H., ... Connes, P. (2011). Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica*, 96(11), 1589–94.
- Nebor, D., Broquere, C., Brudey, K., Mouguel, D., Tarer, V., Connes, P., ... Romana, M. (2010). Alpha-thalassemia is associated with a decreased occurrence and a delayed age-at-onset of albuminuria in sickle cell anemia patients. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 45(2), 154–8.
- Nébor, D., Romana, M., Santiago, R., Vachier, N., Picot, J., Broquere, C., ... Elion, J. (2013). Fetal hemoglobin and hydroxycarbamide modulate both plasma concentration and cellular origin of circulating microparticles in sickle cell anemia children. *Haematologica*, 98(6), 862–7.
- Neel, J. V. (1949). The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 110(2846), 64–6.
- Neuzil, J., & Stocker, R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters*, 331(3), 281–4.

- Ngo, D. A., Aygun, B., Akinsheye, I., Hankins, J. S., Bhan, I., Luo, H. Y., ... Chui, D. H. K. (2012). Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *British Journal of Haematology*, 156(2), 259–64.
- Nielsen, M. H., Beck-Nielsen, H., Andersen, M. N., & Handberg, A. (2014). A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3.
- Nieuwland, R., Berckmans, R. J., McGregor, S., Böing, A. N., Romijn, F. P., Westendorp, R. G., ... Sturk, A. (2000). Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*, 95(3), 930–5.
- Nishino, T., Nakanishi, S., Okamoto, K., Mizushima, J., Hori, H., Iwasaki, T., ... Nakazawa, H. (1997). Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochemical Society Transactions*, 25(3), 783–6.
- Nolan, V. G., Adewoye, A., Baldwin, C., Wang, L., Ma, Q., Wyszynski, D. F., ... Steinberg, M. H. (2006). Sick cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *British Journal of Haematology*, 133(5), 570–8.
- Nomura, S., Tandon, N. N., Nakamura, T., Cone, J., Fukuhara, S., & Kambayashi, J. (2001). High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*, 158(2), 277–87.
- Nur, E., Biemond, B. J., Otten, H.-M., Brandjes, D. P., & Schnog, J.-J. B. (2011). Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *American Journal of Hematology*, 86(6), 484–9.
- Nur, E., Brandjes, D. P., Schnog, J.-J. B., Otten, H.-M., Fijnvandraat, K., Schalkwijk, C. G., & Biemond, B. J. (2010). Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. *British Journal of Haematology*, 151(1), 62–9.
- Nur, E., Brandjes, D. P., Teerlink, T., Otten, H.-M., Oude Elferink, R. P. J., Muskiet, F., ... Schnog, J.-J. B. (2012). N-acetylcysteine reduces oxidative stress in sickle cell patients. *Annals of Hematology*, 91(7), 1097–105.
- O'Donnell, S., Mandaro, R., Schuster, T. M., & Arnone, A. (1979). X-ray diffraction and solution studies of specifically carbamylated human hemoglobin A. Evidence for the location of a proton- and oxygen-linked chloride binding site at valine 1 alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(23), 12204–8.
- Odièvre, M.-H., Lapoumériou, C., & Elion, J. (2009). [Effect of hydroxyurea on adhesion proteins in sickle cell anemia]. *Archives de Pédiatrie : Organe Officiel de La Société Française de Pédiatrie*, 16(2), 95–8.

- Odièvre, M.-H., Verger, E., Silva-Pinto, A. C., & Elion, J. (2011). Pathophysiological insights in sickle cell disease. *The Indian Journal of Medical Research*, 134, 532–7.
- Oguanobi, N. I., Onwubere, B. J. C., Anisiuba, B. C., Ike, S. O., Ejim, E. C., & Ibegbulam, O. G. (2012). Clinical findings associated with cardiovascular autonomic dysfunction in adult sickle cell anaemia patients. *Acta Cardiologica*, 67(2), 169–75.
- Ohene-Frempong, K. (1991). Stroke in sickle cell disease: demographic, clinical, and therapeutic considerations. *Seminars in Hematology*, 28(3), 213–9.
- Okpala, I., Daniel, Y., Haynes, R., Odoemene, D., & Goldman, J. (2002). Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. *European Journal of Haematology*, 69(3), 135–44.
- Olofsson, P. S., Rosas-Ballina, M., Levine, Y. A., & Tracey, K. J. (2012). Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunological Reviews*, 248(1), 188–204.
- Ono, T., Tsuruta, R., Fujita, M., Aki, H. S., Kutsuna, S., Kawamura, Y., ... Maekawa, T. (2009). Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Research*, 1305, 158–67.
- Oppenheimer, E. H., & Esterly, J. R. (1971). Pulmonary changes in sickle cell disease. *The American Review of Respiratory Disease*, 103(6), 858–9.
- Osarogiagbon, U. R., Choong, S., Belcher, J. D., Vercellotti, G. M., Paller, M. S., & Hebbel, R. P. (2000). Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*, 96(1), 314–20.
- Pantaleo, A., Ferru, E., Giribaldi, G., Mannu, F., Carta, F., Matte, A., ... Turrini, F. (2009). Oxidized and poorly glycosylated band 3 is selectively phosphorylated by Syk kinase to form large membrane clusters in normal and G6PD-deficient red blood cells. *The Biochemical Journal*, 418(2), 359–67.
- Pasvol, G., Weatherall, D. J., & Wilson, R. J. (1978). Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature*, 274(5672), 701–3.
- Pauling, L., & Itano, H. A. (1949). Sickle cell anemia a molecular disease. *Science (New York, N.Y.)*, 110(2865), 543–8.
- Pearson, S. R., Alkon, A., Treadwell, M., Wolff, B., Quirolo, K., & Boyce, W. T. (2005). Autonomic reactivity and clinical severity in children with sickle cell disease. *Clinical Autonomic Research : Official Journal of the Clinical Autonomic Research Society*, 15(6), 400–7.

- Pernow, J., & Jung, C. (2013). Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovascular Research*, 98(3), 334–43.
- Philippidis, P., Mason, J. C., Evans, B. J., Nadra, I., Taylor, K. M., Haskard, D. O., & Landis, R. C. (2004). Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circulation Research*, 94(1), 119–26.
- Piel, F. B. (2013). Distribution géographique de la drépanocytose en 2010.
- Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Williams, T. N., ... Hay, S. I. (2010). Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nature Communications*, 1, 104.
- Platt, O. S. (2000). Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(3), 337–8.
- Platt, O. S., Brambilla, D. J., Rosse, W. F., Milner, P. F., Castro, O., Steinberg, M. H., & Klug, P. P. (1994). Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *The New England Journal of Medicine*, 330(23), 1639–44.
- Platt, O. S., Thorington, B. D., Brambilla, D. J., Milner, P. F., Rosse, W. F., Vichinsky, E., & Kinney, T. R. (1991). Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *The New England Journal of Medicine*, 325(1), 11–8.
- Powars, D. R., Hiti, A., Ramicone, E., Johnson, C., & Chan, L. (2002). Outcome in hemoglobin SC disease: a four-decade observational study of clinical, hematologic, and genetic factors. *American Journal of Hematology*, 70(3), 206–15.
- Prezelj, M., & Knap, B. (2010). Automated assay for non-transferrin-bound iron in serum samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*, 48(10), 1427–32.
- Psychari, S. N., Apostolou, T. S., Iliodromitis, E. K., Kourakos, P., Liakos, G., & Kremastinos, D. T. Inverse relation of C-reactive protein levels to heart rate variability in patients after acute myocardial infarction. *Hellenic Journal of Cardiology : HJC = Hellēnikē Kardiologikē Epitheōrēsē*, 48(2), 64–71.
- Quinn, C. T., Rogers, Z. R., & Buchanan, G. R. (2004). Survival of children with sickle cell disease. *Blood*, 103(11), 4023–7.
- Radomski, M. W., & Moncada, S. (1993). Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thrombosis and Haemostasis*, 70(1), 36–41.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2(8567), 1057–8.

- Ragusa, A., Lombardo, M., Sortino, G., Lombardo, T., Nagel, R. L., & Labie, D. (1988). Beta S gene in Sicily is in linkage disequilibrium with the Benin haplotype: implications for gene flow. *American Journal of Hematology*, 27(2), 139–41.
- Reinhart, W. H., & Singh, A. (1990). Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry. *European Journal of Clinical Investigation*, 20(4), 458–62.
- Reiter, C. D., Wang, X., Tanus-Santos, J. E., Hogg, N., Cannon, R. O., Schechter, A. N., & Gladwin, M. T. (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine*, 8(12), 1383–9.
- Repka, T., & Hebbel, R. P. (1991). Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood*, 78(10), 2753–8.
- Richard, V., Dodson, G. G., & Mauguén, Y. (1993). Human deoxyhaemoglobin-2,3-diphosphoglycerate complex low-salt structure at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 233(2), 270–4.
- Rifkind, J. M., & Nagababu, E. (2013). Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(17), 2274–83.
- Rivera, A., Jarolim, P., & Brugnara, C. (2002). Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. *Blood*, 99(1), 357–603.
- Rivera, A., Rotter, M. A., & Brugnara, C. (1999). Endothelins activate Ca(2+)-gated K(+) channels via endothelin B receptors in CD-1 mouse erythrocytes. *The American Journal of Physiology*, 277(4 Pt 1), C746–54.
- Roberts, I., & de Montalembert, M. (2007). Sickle cell disease as a paradigm of immigration hematology: new challenges for hematologists in Europe. *Haematologica*, 92(7), 865–71.
- Rogers, N. J., Targett, G. A., & Hall, B. S. (1996). Plasmodium falciparum gametocyte adhesion to C32 cells via CD36 is inhibited by antibodies to modified band 3. *Infection and Immunity*, 64(10), 4261–8.
- Rohn, T. T., Hinds, T. R., & Vincenzi, F. F. (1993). Inhibition of the Ca pump of intact red blood cells by t-butyl hydroperoxide: importance of glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1153(1), 67–76.
- Romero Mestre, J. C., Hernández, A., Agramonte, O., & Hernández, P. (1997). Cardiovascular autonomic dysfunction in sickle cell anemia: a possible risk factor for sudden death? *Clinical Autonomic Research : Official Journal of the Clinical Autonomic Research Society*, 7(3), 121–5.
- Roth, E. F., Friedman, M., Ueda, Y., Tellez, I., Trager, W., & Nagel, R. L. (1978). Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with Plasmodium falciparum malaria. *Science (New York, N.Y.)*, 202(4368), 650–2.

Roupret M, Beley S, Traxer O, Kirsh-Noir F, Jouanet P, Jardin A, T. N. (2005). Prise en charge du priapisme chez les patients drépanocytaires.

Rubanyi, G. M., & Polokoff, M. A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological Reviews*, 46(3), 325–415.

Rusanova, I., Escames, G., Cossio, G., de Borace, R. G., Moreno, B., Chahboune, M., ... Acuña-Castroviejo, D. (2010). Oxidative stress status, clinical outcome, and β -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, 85(6), 529–37.

Sabaa, N., de Franceschi, L., Bonnin, P., Castier, Y., Malpeli, G., Debbabi, H., ... Tharaux, P.-L. (2008). Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(5), 1924–33. <http://doi.org/10.1172/JCI33308>

Saint-Martin, C., Romana, M., Bibrac, A., Brudey, K., Tarer, V., Divialle-Doumido, L., ... Etienne-Julan, M. (2013). Universal newborn screening for haemoglobinopathies in Guadeloupe (French West Indies): a 27-year experience. *Journal of Medical Screening*, 20(4), 177–82.

Sangkatumvong, S., Khoo, M. C. K., Kato, R., Detterich, J. A., Bush, A., Keens, T. G., ... Coates, T. D. (2011). Peripheral vasoconstriction and abnormal parasympathetic response to sighs and transient hypoxia in sickle cell disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(4), 474–81.

Sankaran, V. G., Xu, J., & Orkin, S. H. (2010). Advances in the understanding of haemoglobin switching. *British Journal of Haematology*, 149(2), 181–94.

Santin, A. (2003). Prise en charge d'un patient drépanocytaire aux urgences.

Schacter, L., Warth, J. A., Gordon, E. M., Prasad, A., & Klein, B. L. (1988). Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2(3), 237–43.

Schaer, C. A., Vallelian, F., Imhof, A., Schoedon, G., & Schaer, D. J. (2007). CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(1), 106–10.

Schlüter, K., & Drenckhahn, D. (1986). Co-clustering of denatured hemoglobin with band 3: its role in binding of autoantibodies against band 3 to abnormal and aged erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(16), 6137–41.

Schmalzer, E. A., Lee, J. O., Brown, A. K., Usami, S., & Chien, S. (1987). Viscosity of mixtures of sickle and normal red cells at varying hematocrit levels. Implications for transfusion. *Transfusion*, 27(3), 228–33.

- Schwartz, R. S., Rybicki, A. C., Heath, R. H., & Lubin, B. H. (1987). Protein 4.1 in sickle erythrocytes. Evidence for oxidative damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(32), 15666–72.
- Schwartz, R. S., Tanaka, Y., Fidler, I. J., Chiu, D. T., Lubin, B., & Schroit, A. J. (1985). Increased adherence of sickled and phosphatidylserine-enriched human erythrocytes to cultured human peripheral blood monocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 75(6), 1965–72.
- Sebastiani, P., Wang, L., Nolan, V. G., Melista, E., Ma, Q., Baldwin, C. T., & Steinberg, M. H. (2008). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Bayesian modeling of genetic associations. *American Journal of Hematology*, 83(3), 189–95.
- Serjeant, G. R. (1992). *Sickle cell disease*: Oxford university press New York.
- Setty, B. N., Kulkarni, S., Rao, A. K., & Stuart, M. J. (2000). Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation. *Blood*, 96(3), 1119–24.
- Setty, B. N. Y., & Betal, S. G. (2008). Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. *Blood*, 111(2), 905–14.
- Setty, B. N. Y., Kulkarni, S., & Stuart, M. J. (2002). Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood*, 99(5), 1564–71.
- Shao, J., Miyata, T., Yamada, K., Hanafusa, N., Wada, T., Gordon, K. L., ... Nangaku, M. (2001). Protective role of nitric oxide in a model of thrombotic microangiopathy in rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 12(10), 2088–97.
- Shartava, A., McIntyre, J., Shah, A. K., & Goodman, S. R. (2000). The Gardos channel is responsible for CDNB-induced dense sickle cell formation. *American Journal of Hematology*, 64(3), 184–9.
- Shear, H. L., Roth, E. F., Fabry, M. E., Costantini, F. D., Pachnis, A., Hood, A., & Nagel, R. L. (1993). Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria. *Blood*, 81(1), 222–6.
- Sherman, I. (1940). The sickling phenomenon, with special reference to the differentiation of sickle cell anemia from the sickle cell trait. *BULLETIN OF THE JOHNS HOPKINS HOSPITAL*, 67, 309–324.
- Shet, A. S., Aras, O., Gupta, K., Hass, M. J., Rausch, D. J., Saba, N., ... Hebbel, R. P. (2003). Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, 102(7), 2678–83.
- Silva, D. G. H., Belini Junior, E., de Almeida, E. A., & Bonini-Domingos, C. R. (2013). Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 1101–9.

- Singh, P., Hawkley, L. C., McDade, T. W., Cacioppo, J. T., & Masi, C. M. (2009). Autonomic tone and C-reactive protein: a prospective population-based study. *Clinical Autonomic Research : Official Journal of the Clinical Autonomic Research Society*, 19(6), 367–74.
- Solovey, A., Gui, L., Key, N. S., & Hebbel, R. P. (1998). Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(9), 1899–904.
- Solovey, A., Lin, Y., Browne, P., Choong, S., Wayner, E., & Hebbel, R. P. (1997). Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *The New England Journal of Medicine*, 337(22), 1584–90.
- Stein, P. D., Beemath, A., Meyers, F. A., Skaf, E., & Olson, R. E. (2006). Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in hospitalized patients with sickle cell disease. *The American Journal of Medicine*, 119(10), 897.e7–11.
- Steinberg, M. H., Hsu, H., Nagel, R. L., Milner, P. F., Adams, J. G., Benjamin, L., ... Josifovska, O. (1995). Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, 48(3), 175–81.
- Steinberg, M. H., & Rodgers, G. P. (2001). Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Seminars in Hematology*, 38(4), 299–306.
- Strouse, J. J., Lanzkron, S., Beach, M. C., Haywood, C., Park, H., Witkop, C., ... Segal, J. B. (2008). Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. *Pediatrics*, 122(6), 1332–42.
- Stuart, M. J., & Nagel, R. L. (2004). Sickle-cell disease. *Lancet*, 364(9442), 1343–60.
- Studt, J.-D., Kremer Hovinga, J. A., Antoine, G., Hermann, M., Rieger, M., Scheifflinger, F., & Lämmle, B. (2005). Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood*, 105(2), 542–4.
- Styles, L. A., & Vichinsky, E. (1994). Effects of a long-term transfusion regimen on sickle cell-related illnesses. *The Journal of Pediatrics*, 125(6 Pt 1), 909–11.
- Sugihara, K., Sugihara, T., Mohandas, N., & Hebbel, R. P. (1992). Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood*, 80(10), 2634–42.
- Swerlick, R. A., Eckman, J. R., Kumar, A., Jeitler, M., & Wick, T. M. (1993). Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. *Blood*, 82(6), 1891–9.
- Takada, Y., Huang, C., & Hemler, M. E. (1987). Fibronectin receptor structures in the VLA family of heterodimers. *Nature*, 326(6113), 607–9.

Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., & Dolo, V. (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *The American Journal of Pathology*, 160(2), 673–80.

Telen, M. J. (2000). Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Seminars in Hematology*, 37(2), 130–42.

Thayer, J. F., & Fischer, J. E. (2009). Heart rate variability, overnight urinary norepinephrine and C-reactive protein: evidence for the cholinergic anti-inflammatory pathway in healthy human adults. *Journal of Internal Medicine*, 265(4), 439–47.

Thérond, P., Denis, B. (2005). Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote: effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides.

Thevenin, B. J., Crandall, I., Ballas, S. K., Sherman, I. W., & Shohet, S. B. (1997). Band 3 peptides block the adherence of sickle cells to endothelial cells in vitro. *Blood*, 90(10), 4172–9.

Thiagarajan, P., & Tait, J. F. (1991). Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(36), 24302–7.

Thomas, A. N., Pattison, C., & Serjeant, G. R. (1982). Causes of death in sickle-cell disease in Jamaica. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 285(6342), 633–5.

Thomas, J. J., Kutlar, A., Scott, D. F., & Lanclos, K. D. (1998). Inhibition of gene expression by the Ggamma 5' flanking region of the Bantu beta(s) chromosome. *American Journal of Hematology*, 59(1), 51–6.

Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, 420(6917), 853–9.

Tripette, J., Alexy, T., Hardy-Dessources, M.-D., Mougénel, D., Beltan, E., Chalabi, T., ... Connes, P. (2009). Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. *Haematologica*, 94(8), 1060–5.

Turhan, A., Weiss, L. A., Mohandas, N., Collier, B. S., & Frenette, P. S. (2002). Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3047–51.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 335–44.

Udani, M., Zen, Q., Cottman, M., Leonard, N., Jefferson, S., Daymont, C., ... Telen, M. J. (1998). Basal cell adhesion molecule/lutheran protein. The receptor critical for sickle cell adhesion to laminin. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(11), 2550–8.

- Van Beers, E. J., Schaap, M. C. L., Berckmans, R. J., Nieuwland, R., Sturk, A., van Doormaal, F. F., ... Biemond, B. J. (2009). Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*, 94(11), 1513–9.
- Van Tits, L. J., van Heerde, W. L., Landburg, P. P., Boderie, M. J., Muskiet, F. A. J., Jacobs, N., ... Schnog, J. B. (2009). Plasma annexin A5 and microparticle phosphatidylserine levels are elevated in sickle cell disease and increase further during painful crisis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(1), 161–4.
- Vekilov, P. G. (2007). Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *British Journal of Haematology*, 139(2), 173–84.
- Vichinsky, E. (2001). Consensus document for transfusion-related iron overload. *Seminars in Hematology*, 38(1 Suppl 1), 2–4.
- Vichinsky, E. P., Neumayr, L. D., Earles, A. N., Williams, R., Lennette, E. T., Dean, D., ... Mancini, E. A. (2000). Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 342(25), 1855–65.
- Villaescusa, R., Arce, A. A., Lalanne-Mistrih, M.-L., Lamarre, Y., Hierso, R., Hernández, C., & Hardy-Dessources, M.-D. (2013). Natural anti-band 3 antibodies in patients with sickle cell disease. *Comptes Rendus Biologies*, 336(3), 173–6.
- Vinchi, F., De Franceschi, L., Ghigo, A., Townes, T., Cimino, J., Silengo, L., ... Tolosano, E. (2013). Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation*, 127(12), 1317–29.
- Walder, J. A., Chatterjee, R., Steck, T. L., Low, P. S., Musso, G. F., Kaiser, E. T., ... Arnone, A. (1984). The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(16), 10238–46.
- Waltz, X., Hedreville, M., Sinnapah, S., Lamarre, Y., Soter, V., Lemonne, N., ... Connes, P. (2012). Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 52(1), 15–26.
- Waltz, X., Pichon, A., Mougenel, D., Lemonne, N., Lalanne-Mistrih, M.-L., Sinnapah, S., ... Connes, P. (2012). Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients. *American Journal of Hematology*, 87(12), 1070–3.
- Wang, W. C., Helms, R. W., Lynn, H. S., Redding-Lallinger, R., Gee, B. E., Ohene-Frempong, K., ... Kinney, T. R. (2002). Effect of hydroxyurea on growth in children

with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS Study. *The Journal of Pediatrics*, 140(2), 225–9.

Ware, R. E., Zimmerman, S. A., & Schultz, W. H. (1999). Hydroxyurea as an alternative to blood transfusions for the prevention of recurrent stroke in children with sickle cell disease. *Blood*, 94(9), 3022–6.

Waugh, S. M., Willardson, B. M., Kannan, R., Labotka, R. J., & Low, P. S. (1986). Heinz bodies induce clustering of band 3, glycophorin, and ankyrin in sickle cell erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 78(5), 1155–60.

Weber, R. E., Voelter, W., Fago, A., Echner, H., Campanella, E., & Low, P. S. (2004). Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(2), R454–64.

Westerman, M. P., Green, D., Gilman-Sachs, A., Beaman, K., Freels, S., Boggio, L., ... Williamson, P. (1999). Antiphospholipid antibodies, proteins C and S, and coagulation changes in sickle cell disease. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 134(4), 352–62.

Westerman, M., Pizzey, A., Hirschman, J., Cerino, M., Weil-Weiner, Y., Ramotar, P., ... Porter, J. (2008). Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. *British Journal of Haematology*, 142(1), 126–35.

Wigfall, D. R., Ware, R. E., Burchinal, M. R., Kinney, T. R., & Foreman, J. W. (2000). Prevalence and clinical correlates of glomerulopathy in children with sickle cell disease. *The Journal of Pediatrics*, 136(6), 749–53.

Willcox, M., Björkman, A., Brohult, J., Pehrson, P. O., Rombo, L., & Bengtsson, E. (1983). A case-control study in northern Liberia of Plasmodium falciparum malaria in haemoglobin S and beta-thalassaemia traits. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77(3), 239–46.

Wishner, B. C., Ward, K. B., Lattman, E. E., & Love, W. E. (1975). Crystal structure of sickle-cell deoxyhemoglobin at 5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 98(1), 179–94.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., ... Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49(5), 1304–13.

Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3), 269–88.

Wood, K. C., & Granger, D. N. (2007). Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 34(9), 926–32.

- Wood, K. C., Hsu, L. L., & Gladwin, M. T. (2008). Sick cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(8), 1506–28.
- Wood, K., Russell, J., Hebbel, R. P., & Granger, D. N. (2004). Differential expression of E- and P-selectin in the microvasculature of sickle cell transgenic mice. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 11(4), 377–85.
- Wun, T., Paglieroni, T., Field, C. L., Welborn, J., Cheung, A., Walker, N. J., & Tablin, F. (1999). Platelet-erythrocyte adhesion in sickle cell disease. *Journal of Investigative Medicine : The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 47(3), 121–7.
- Wun, T., Paglieroni, T., Rangaswami, A., Franklin, P. H., Welborn, J., Cheung, A., & Tablin, F. (1998). Platelet activation in patients with sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 100(4), 741–9.
- Wun, T., Paglieroni, T., Tablin, F., Welborn, J., Nelson, K., & Cheung, A. (1997). Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J Lab Clin Med.*, 129(5), 507–16.
- Yesilkaya, A., Ertug, Z., Yegin, A., Melikoglu, M., & Baskurt, O. K. (1998). Deformability and oxidant stress in red blood cells under the influence of halothane and isoflurane anesthesia. *General Pharmacology*, 31(1), 33–6.
- Zachowski, A., Favre, E., Cribier, S., Hervé, P., & Devaux, P. F. (1986). Outside-inside translocation of aminophospholipids in the human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme. *Biochemistry*, 25(9), 2585–90.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), 337–49.
- Zhou, Z., Han, H., Cruz, M. A., López, J. A., Dong, J.-F., & Guchhait, P. (2009). Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: a mechanism associated with sickle cell disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(6), 1070–7.
- Zwaal, R. F. A., Comfurius, P., & Bevers, E. M. (2005). Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 62(9), 971–88.
- Zwaal, R. F., & Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89(4), 1121–32.