

Thèse

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université des Antilles

*Champ disciplinaire Spécialité Science et Technique des Activités Physiques et Sportives
(STAPS)*

Spécialité : Physiologie

CARACTERISATION DE LA FONCTION MICRO ET MACROVASCULAIRE CHEZ LES

ENFANTS DREPANOCYTAIRES SS ET SC :

*LES EFFETS DE L'ACTIVITE PHYSIQUE, DU STRESS OXYDANT ET LES
CONSEQUENCES SUR LA SEVERITE CLINIQUE*

Présentée par

Berenike Charlotte MÖCKESCH

Le 6 novembre 2017

Membres du jury

Mme VINET-JULLIAN Agnès (Rapporteur)	Professeur	Université d'Avignon
Mme RANQUE Brigitte (Rapporteur)	Professeur	Université de Paris
Mr ROMANA Marc (Examineur)	Chargé de Recherche INSERM U 1134	
Mr INAMO Jocelyn (Examineur)	MCF	Cardiologie CHU Martinique
Mme ANTOINE-JONVILLE Sophie (Directeur)	MCU-HDR	Université des Antilles
Mr CONNES Philippe (Directeur)	Professeur	Université de Lyon

Directeurs de Thèse : Sophie ANTOINE-JONVILLE & Philippe CONNES

Ecole doctorale : Ecole doctorale pluridisciplinaire de l'Université des Antilles

Laboratoire d'accueil: ACTES, Adaptation au Climat Tropicale, Exercice et Santé - EA 3596

Thèse

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université des Antilles

Champ disciplinaire Spécialité Science et Technique des Activités Physiques et Sportives (STAPS)

Spécialité : Physiologie

CARACTERISATION DE LA FONCTION MICRO ET MACROVASCULAIRE CHEZ LES ENFANTS DREPANOCYTAIRES SS ET SC :

*LES EFFETS DE L'ACTIVITE PHYSIQUE, DU STRESS OXYDANT ET LES
CONSEQUENCES SUR LA SEVERITE CLINIQUE*

Présentée par

Berenike Charlotte MÖCKESCH

Le 6 novembre 2017

Membres du jury

Mme VINET-JULLIAN Agnès (Rapporteur)	Professeur	Université d'Avignon
Mme RANQUE Brigitte (Rapporteur)	Professeur	Université de Paris
Mr ROMANA Marc (Examineur)	Chargé de Recherche INSERM U 1134	
Mr INAMO Jocelyn (Examineur)	MCF	Cardiologie CHU Martinique
Mme ANTOINE-JONVILLE Sophie (Directeur)	MCU-HDR	Université des Antilles
Mr CONNES Philippe (Directeur)	Professeur	Université de Lyon

Directeurs de Thèse : Sophie ANTOINE-JONVILLE & Philippe CONNES

Ecole doctorale : Ecole doctorale pluridisciplinaire de l'Université des Antilles

Laboratoire d'accueil: ACTES, Adaptation au Climat Tropicale, Exercice et Santé - EA 3596

*« Wohin du auch gehst,
geh mit deinem ganzen Herzen »*

Konfuzius

Remerciements

Je tiens à remercier,

L'ensemble des membres de jury,

merci d'avoir accepté de participer à ce jury, de partager votre expertise et vos connaissances, mais aussi d'avoir été présent durant ma thèse avec des remarques et conseils toujours très éclairés.

Mes rapporteurs de thèse,

d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail doctoral, j'en suis très honorée. Merci de votre travail afin d'améliorer la qualité de ces résultats de recherche.

Avant de rentrer dans le monde scientifique, j'aimerais dire un grand merci à l'ensemble des personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, à réaliser ce travail de thèse et sans qui ce travail n'aurait jamais abouti.

Votre soutien, votre bonne humeur et votre collaboration m'ont permis de progresser peu à peu, de me motiver, de passer des années enrichissantes pour arriver là où je suis aujourd'hui. Je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et gratitude.

J'adresse particulièrement mes plus sincères remerciements

***A Sophie Antoine-Jonville et Philippe Connes**, mes directeurs de thèse, pour avoir accepté d'être « meine Doktormama und mein Doktorpapa », m'avoir pris par la main tout au long de ces dernières années. Vos conseils, votre patience et votre endurance m'ont permis to sail safely the ship and to be not afraid of storm. Travailler à vos côtés est un grand plaisir et est plus qu'enrichissant. Je vous remercie pour votre disponibilité jour et nuit, votre engagement et encouragements, vos enseignements, votre compréhension et confiance et de m'avoir fait découvrir le monde scientifique avec joie et bonne humeur. Je mesure ma chance de vous avoir eu comme directeurs de thèse et je vous remercie encore à l'infini.*

***Au Professeur Olivier Hue**, je te remercie pour l'accueil au sein du laboratoire ACTES, pour avoir accepté de diriger ces travaux de thèse, pour ta confiance et de m'avoir réveillé du sommeil profond par tes « blagues ».*

***A Keyne Charlot**, de m'avoir formé patiemment et généreusement toujours de bonne humeur dans les techniques de mesure et d'analyse utilisées en majeure partie dans ce travail de*

recherche. Je te remercie pour tes conseils précieux et d'avoir élargi mes connaissances scientifiques.

*A Marie Dominique Hardy-Dessources et Marc Romana, pour votre accueil au sein de l'unité **Inserm** Guadeloupe, votre collaboration, votre aide technique, votre disponibilité et sympathie.*

*A Vincent Pialoux, pour ton implication dans la réalisation de ce travail, pour tes enseignements et ton accompagnement dans ce projet de recherche. Je remercie également Cyril Matin pour tes remarques pertinentes et l'ensemble de l'équipe du laboratoire **LIBM** de l'Université de Lyon pour l'accueil chaleureux tout au long de mon stage et d'avoir élargi mes connaissances scientifiques et techniques. Ma gratitude va particulièrement à Sarah Skinner pour la grande aide que tu m'as apporté pendant mon stage. Merci pour ta sympathie et les pauses midi plaisantes. J'ai passé un très bon séjour à Lyon. Merci à tous!*

A l'ensemble des membres de l' Unité Transversale de la Drépanocytose d'avoir accepté d'intégrer ce projet de recherche dans le fonctionnement de votre service. Je remercie particulièrement docteur Nathalie Lemonne, docteur Marie Billaud, docteur Maryse Etienne-Julan, docteur Lydia Divialle-Doumido et docteur Marie Petras d'avoir accepté de collaborer avec nous. Merci pour votre travail supplémentaire, votre disponibilité, votre investissement et tout votre engagement permettant de réaliser ces travaux de recherche. J'en profite également pour remercier les infirmières Nathalie Negrit et Brigitte Guyonnet pour votre contribution et pour avoir prélevé patiemment tous les participants. Ces travaux n'auraient pas pu se faire sans vous.

A l'université des Antilles pour le soutien financier et pour m'avoir donné la chance d'obtenir le grade docteur.

*A mes collègues de bureau actuels : **Kévin, Shelly, Stéph, Aurelie, Maëva, Maryse** et anciens **Michelle** et **Cécile** pour votre soutien, vos réponses à mes milliers de questions.*

« Un pour tous, Tous pour un »

Je remercie particulièrement notre capitaine Kévin pour ton amitié, ton aide, tes conseils et ton engagement d'avoir organisé les super sorties de labo. Nos chemins vont se séparer bientôt, we started with a simple hello but ended with a complicated goodbye... so we simply say : see you soon ! Je te souhaite à toi et ta famille toute le bonheur du monde et une bonne continuation pour tous vos projets.

*A mes anciennes camarades de table de l'INSERM : **Marie** (pour ton écoute, nos échanges, et les moments sympathiques dans la mer, la plage ou au travail), **Kizzy-Clara** (pour ton humour, tes conseils et ton amitié), **Régine** (pour ton dynamisme, tes blagues et ton soutien), **Séverine** (pour ton aide, ton engagement et tes idées de sorties sympathiques d'aventures ou des soirées gourmandes) et **Yohan** (pour notre collaboration et nos discussions). Parmi nous, je suis le dernière Samouraï à passer la thèse. Vous êtes des gens formidables et vous nous manquez à l'Inserm. J'ai passé beaucoup des bons moments avec vous. Merci !*

***Aux chers collègues de l'UFR STAPS** pour créer cet agréable ambiance de travail. Je tiens à remercier également les professeurs et chercheurs de l'Université des Antilles pour leurs compétences et engagements, d'avoir pu me former pendant mes années universitaires et d'avoir élargi mon horizon.*

*A tous les **enfants** qui ont participé à cette étude et sans qui rien ne serait possible. Merci pour votre courage et votre patience !*

A mes amies de près et loin pour votre présence

*A ma famille, **Mama, Papa** (Mama tu traduis pour Papa stp.)*

Je vous remercie de tout mon cœur pour votre amour et pour tout... Votre soutien, écoute et vos encouragements dans toutes mes aventures malgré les milliers de miles entre nous. Vous étiez les premiers qui m'ont appris à parler et à lire et m'avoir donné tous les fondamentaux pour pouvoir arriver là où je suis aujourd'hui. Ich hab Euch lieb !

*A mes sœurs **Christina, Liv** et mes frères **Moritz, Rouven**. Ich danke Euch, dass ihr immer für mich da seid ! Je pense à vous bien plus que ce que je ne vous le montre.*

A l'océan keeping my mind fresh et d'être la source de mon énergie

~ Merci ~

Un chapitre s'achève pour laisser place à une nouvelle aventure

Sommaire

Liste des Figures.....	13
Liste des Tableaux.....	16
Abréviations.....	17
A INTRODUCTION GENERALE	22
B REVUE DE LITTERATURE.....	25
I. LE SYSTEME CIRCULATOIRE – NOTIONS D’HEMODYNAMIQUE	25
I.1 Aspects généraux de l’hémoglobine	26
I.2 Hémodynamique vasculaire.....	30
1. Les vaisseaux sanguins.....	30
2. Les artères	32
3. Les capillaires	33
4. Les veines	33
I.3 Les principales grandeurs hémodynamiques	35
1. Le débit sanguin	36
2. La pression sanguine.....	37
3. L’écoulement sanguin.....	38
4. Relation débit-pression - La Loi de Poiseuille.....	40
5. La Loi de Laplace.....	41
I.4 Vasodilatation et vasoconstriction des vaisseaux sanguins	44
1. La régulation vasculaire endothélium-dépendante.....	46
I.5 Le NO et ses propriétés vasculaires.....	48
I.6 Le dysfonctionnement endothélial.....	51
II. LA DREPANOCYTOSE : UNE PATHOLOGIE COMPLEXE.....	54
II.1 Découverte et rapide historique de cette pathologie	54
II.2 Apparition et répartition géographique	59
1. Haplotypes de la mutation β^s	59
2. La mutation β^s , un avantage sélectif?	61
3. La diversité génotypique de la drépanocytose	62
4. Dépistage ciblé de la Drépanocytose.....	63
5. La drépanocytose en France et en Guadeloupe.....	64
II.3 Physiopathologie de la Drépanocytose	65
1. Propriétés de l’hémoglobine S et l’hémoglobine C.....	65
II.4 La Drépanocytose, une hémoglobinopathie aux complications multiples	70
1. La Drépanocytose, une pathologie multifactorielle.....	70
II.5 Aspects cliniques de la Drépanocytose	77
1. Complications drépanocytaires : classification en deux phénotypes.....	80
III. LES EFFETS DU STRESS OXYDANT DANS LA DREPANOCYTOSE	83
III.1 Les espèces oxygénées réactives.....	83
III.2 Les systèmes antioxydants.....	86
III.3 Le stress oxydant dans la Drépanocytose	90
1. Formation des espèces réactives à l’oxygène dans la Drépanocytose	90
2. Altération des mécanismes de défenses antioxydantes dans la Drépanocytose.....	93

III.4 Hémolyse, stress oxydant et dysfonction vasculaire dans la Drépanocytose.....	94
IV. DREPANOCYTOSE ET EXERCICE.....	96
IV.1 Activités physiques : Généralité	96
IV.2 Effets de l'exercice aigu et chronique sur les paramètres hémato/ hémorhéologiques, le stress oxydant, la biodisponibilité du NO et l'adhésion vasculaire.....	98
1. Effet d'un exercice aigu chez les sujets sains.....	98
2. Effets d'un exercice chronique chez les sujets sains	103
IV.3 Exercice et Drépanocytose	108
1. Problématique de la pratique d'une activité physique aiguë chez les patients drépanocytaires	108
2. Bénéfices de santé induits par l'activité physique chronique chez les patients drépanocytaires	111
C CONTRIBUTION PERSONNELLE.....	113
I. GENERALITES DE HYPOSNAD	114
I.1 Problématique	114
I.2 Objectifs de l'étude <i>Hyposnad</i>	115
1. Objectif principal :	115
2. Objectifs secondaires :	116
I.3. Patients et critères d'inclusion.....	116
1. Critères d'inclusion.....	117
2. Critères de non-inclusion	117
I.4 Déroulement de l'étude	118
II. MATERIELS & METHODES	121
II.1 Evaluation de la fonction microvasculaire.....	121
II.2 Mesure de la fonction macrovasculaire et estimation de la rigidité artérielle.....	127
II.3 Mesures hémato-/hémorhéologiques	132
1. Le prélèvement sanguin.....	133
2. Mesure de l'hématocrite.....	133
3. Mesure de la viscosité sanguine.....	135
4. Mesure de la déformabilité erythrocytaire.....	137
5. Mesure de l'agrégation et desagrégation erythrocytaire.....	141
II.4 Mesure du stress oxydatif et du métabolisme du monoxyde d'azote	145
1. La mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides et des protéines :	146
2. La détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques :	147
3. Dosage des marqueurs du métabolisme du NO	149
4. Dosage du endothéline- 1 (Et-1)	149
II.5 Mesure de l'activité du système nerveux autonome (SNA)	150
II.6 Mesure de l'oxygénation cérébrale et musculaire.....	154
1. Principe de mesure.....	155
2. Mesure du Vasomotion et du Flowmotion.....	159
III.5 Mesure de l'aptitude physique	160
1. Evaluation du niveau d'aptitude physique	160
2. Evaluation du niveau d'activité physique	163

III.6 Disposition de l'ensemble des appareils.....	166
IV. RESULTATS & DISCUSSION	167
IV.1. Caractérisation de la population	167
1. Bilan du recrutement.....	167
2. Caractéristiques des patients inclus dans Hyposnad.....	168
3. Bref aperçu de l'historique clinique des patients SS et SC.....	169
4. Caractéristiques hématologiques et hémolytiques.....	171
IV.2 Caractérisation de la fonction vasculaire	179
1. Caractérisation de la fonction microvasculaire.....	179
2. Caractérisation de la fonction macrovasculaire.....	194
IV. 3 Facteurs déterminants de la fonction vasculaires	200
1. Rôle des paramètres hémorhéologiques et hématologiques	200
2. Rôle du métabolisme de monoxyde d'azote et du stress oxydant.....	202
3. Evaluation de la balance vasomotrice – Rôle d'Endothéline-1	207
4. L'implication de l'activité du système nerveux autonome	209
5. Le rôle de l'oxygénation tissulaire.....	212
6. Le rôle de l'activité physique et de l'aptitude physique.....	216
7. Le rôle de l'hydroxycarbamide (hydroxyurée, HU).....	220
8. L'impact de la dysfonction vasculaire sur la sévérité clinique.....	222
D CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	225
E BIBLIOGRAPHIE.....	236
F PUBLICATIONS.....	283

Liste des Figures

FIGURE 1. LA CIRCULATION PULMONAIRE ET SYSTEMIQUE	25
FIGURE 2. STRUCTURE MOLECULAIRE D'HEMOGLOBINE	27
FIGURE 3. EXPRESSION DES GENES GLOBINE AU COURS DU DEVELOPPEMENT ONTOGENIQUE.....	28
FIGURE 4. STRUCTURE ET ORGANISATION DES GENES GLOBINES SUR LES CHROMOSOMES 11 ET 16.....	29
FIGURE 5. LES VAISSEAUX SANGUINS	31
FIGURE 6. ANATOMIE FONCTIONNELLE DE LA PAROI VASCULAIRE DES ARTERES, VEINES ET CAPILLAIRES.....	35
FIGURE 7. LES LOI D'ECOULEMENT SANGUIN	38
FIGURE 8. L'ECOULEMENT LAMINAIRE ET TURBULENT.....	39
FIGURE 9. COURBE TENSION - RAYON DES VAISSEAUX A PAROIS ELASTIQUES	42
FIGURE 10. LA DROITE DE LAPLACE ET LA COURBE C DE LA RELATION TENSION - RAYON.....	43
FIGURE 11. RELAXATION DE LA CELLULE MUSCULAIRE LISSE VASCULAIRE.....	44
FIGURE 12. LE GLYCOLALYX DES CELLULES ENDOTHELIALES VASCULAIRES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	47
FIGURE 13. CONTRIBUTION DE L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE DANS L'HOMEOSTASIE VASCULAIRE.....	48
FIGURE 14. LA SYNTHESE DE MONOXYDE D'AZOTE PAR L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE	49
FIGURE 15. LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE	52
FIGURE 16. JAMES AFRICANUS.....	55
FIGURE 17. LA DREPANOCYTOSE, UNE MALADIE DES GLOBULES ROUGES FALCIFORMES	56
FIGURE 18. LINUS PAULING ET LA MIGRATION ANORMALE DE L'HbS.....	58
FIGURE 19. "FINGER PRINTS" D'APRES INGRAM, 1957	59
FIGURE 20. LA DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES HAPLOTYPES	60
FIGURE 21. RISQUE RELATIF D'INFECTION ET DE MORTALITE ASSOCIES A LA MALARIA	62
FIGURE 22. LA POLYMERISATION DE L'HbS	66
FIGURE 23. DE L'ERYTHROCYTE AU DREPANOCYTE	67
FIGURE 24. CRISTALLISATION DE L'HbC	69
FIGURE 25. MECANISMES IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DES OCCLUSIONS VASCULAIRES	72
FIGURE 26. L'HEMOLYSE INTRAVASCULAIRE.....	73
FIGURE 27. L'INFLAMMATION ET L'ADHERENCE DANS LA DREPANOCYTOSE	76
FIGURE 28. SCHEMA GENERAL DE L'ADHERENCE CELLULAIRE DANS LA DREPANOCYTOSE.....	77
FIGURE 29. MODELE PHYSIOPATHOLOGIQUE HYPOTHETIQUE DES SOUS-PHENOTYPES CLINIQUES DE LA DREPANOCYTOSE.....	81

FIGURE 31. LES SYSTEMES DE DEFENSE ANTIOXYDANTE ENZYMATIQUE.....	87
FIGURE 32. ALTERATION DE LA BIODISPONIBILITE DU NO PAR HEMOLYSE INTRAVASCULAIRE ET LE STRESS OXYDANT.....	92
FIGURE 33. VUE GENERALE DES ADAPTATIONS CARDIOVASCULAIRES À L'EXERCICE.	99
FIGURE 34. COURBES THEORIQUES DOSE - REPONSE DES EFFETS DU NIVEAU D'ACTIVITE PHYSIQUE SUR LA SANTÉ.	107
FIGURE 35. LA SATURATION SANGUINE EN OXYGÈNE ET L’AFFINITÉ L’HEMOGLOBINE POUR L’OXYGENE	109
FIGURE 36. DEROULEMENT DE L'ETUDE <i>HYPOSNAD</i>	120
FIGURE 37. LE PERIMED.	123
FIGURE 38. REPRESENTATION D'UNE REPONSE TYPIQUE A LA CHALEUR	124
FIGURE 39. VOIES DE SIGNALISATION EN REPONSE A LA CHALEUR.	125
FIGURE 40. LA COMPLIANCE ARTERIELLE	128
FIGURE 41. L'ONDE DE PRESSION EN FONCTION DE LA COMPLIANCE ARTERIELLE	129
FIGURE 42. CALCUL DU TEMPS DE TRANSIT DE L'ONDE DE POULS A L'AIDE D'UN TONOMETRE.....	131
FIGURE 43. REPARTITION INEGALE DE L'HEMATOCRITE.	134
FIGURE 44. REGLETTE DE MESURE DE L'HEMATOCRITE.....	135
FIGURE 45. LES FACTEURS SANGUINS INFLUENÇANT LA VISCOSITE SANGUINE.....	136
FIGURE 46. LE PRINCIPE DU VISCOSIMETRE CONE-PLAN.....	137
FIGURE 47. PRINCIPE DE L'EKTACYTOMETRIE (LORCA).....	139
FIGURE 48. COURBE DE L'INDICE D'ELONGATION EN FONCTION DES CONTRAINTES DE CISAILLEMENT (SHEAR STRESS) APPLIQUEES.....	140
FIGURE 49. PATTERN DE DIFFRACTION EN FONCTION DES CONTRAINTES DE CISAILLEMENT.	141
FIGURE 50. LE SYLLECTOGRAMME.....	143
FIGURE 51. PRINCIPE DE LA DETERMINATION DU SEUIL DE DESAGREGATION ERYTHROCYTAIRE	144
FIGURE 52. PRINCIPE DE DOSAGE DE LA SUPEROXIDE DISMUTASE.	1477
FIGURE 53. PRINCIPE D'ANALYSE DE L'INTERVALL R-R.	151
FIGURE 54. PRINCIPE D'ANALYSE DE LA VFC A L'AIDE DU LOGICIEL KUBIOS.	153
FIGURE 55. LA NIRS	155
FIGURE 56. SPECTRE D'ABSORPTION D'HbO ₂ ET HHb.....	156
FIGURE 57. <i>LOI DE BEER LAMBERT MODIFIEE</i>	157
FIGURE 58. LE PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE A RESOLUTION SPATIALE	158
FIGURE 59. EXEMPLE DE L’AFFICHAGE OBTENU PAR LE SYSTEME NIRO-200.....	159
FIGURE 60. QUESTIONNAIRE D’ACTIVITE PHYSIQUE QPPLIQUE DANS L'ETUDE <i>HYPOSNAD</i>	165
FIGURE 61. DISPOSITION DE L'ENSEMBLE DES APPAREILS	166

FIGURE 62. BILIAN DE RECRUTEMENT DE L'ETUDE <i>HYPOSNAD</i>	167
FIGURE 63. REPARTITION DES COMPLICATIONS CHEZ LES ENFANTS SS ET SC.	171
FIGURE 64. MARQUEURS D'HÉMOLYSE CHEZ LES PATIENTS SS ET SC COMPARE AUX VALEURS/INTERVALLES DE REFERENCE (IR) DES SUJETS NON MALADES (AA)	178
FIGURE 65. LA REPONSE VASCULAIRE A L'HYPERHEMIE INDUITE PAR CHALEUR.	179
FIGURE 66. CAPTURE D'ECRAN D'UNE REPONSE NEGATIVE D'UN PATIENT SS.	186
FIGURE 67. IMPLICATION DE LA VOIE <i>RHOA/ROCK</i> DANS LE CONTROLE VASCULAIRE.....	188
FIGURE 68. RESULTATS D'ANALYSE SPECTRALE PAR TRANSFORMEE DE FOURIER DE LA PERFUSION CUTANEE BASALE CHEZ LES VOLONTAIRES SAINS (AA), LES PATIENTS SC ET LES PATIENTS SS.....	192
FIGURE 69. VASOMOTION & FLOWMOTION.....	193
FIGURE 70. LA VELOCITE DE L'ONDE DE POULS CHEZ LES ENFANTS AA, SC ET SS	194
FIGURE 71. RELATION ENTRE LA VOP CAROTIDE-RADIALE ET LA REPONSE MICROVASCULAIRE A L'HYPEREMIE NO-DEPENDANTE	198
FIGURE 72. COMPARAISON DU STRESS OXYDANT, DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET DU METABOLISME DE MONOXYDE D'AZOTE	203
FIGURE 73. CONCENTRATION EN ET-1 PLASMATIQUE CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES SS ET CHEZ LES PATIENTS SC	208
FIGURE 74. L'ACTIVITE DU SNA CHEZ LES PATIENTS DRÉPANOCYTAIRES SS ET SC COMPARES AUX SUJETS SAINS (AA).....	211
FIGURE 75. COMPARAISON DE L'OXYGENATION, DE LA VASOMOTION ET DU FLOWMOTION CEREBRAL	213
FIGURE 76. REPARTITION DES CINQ BANDES DE FRÉQUENCES	215
FIGURE 77. COMPARAISON DU NIVEAU D'ACTIVITE PHYSIQUE ET L'APTITUDE PHYSIQUE ENTRE LES ENFANTS AA, SC ET SS	216

Liste des Tableaux

TABLEAU 1. COMPARAISON DE LA PREVALENCE DE QUELQUES COMPLICATIONS CLINIQUES CHRONIQUES ENTRE LES PATIENTS ADULTES SC ET SS	79
TABLEAU 2. CARACTERISTIQUES ANTHROPOLOGIQUES DES PARTICIPANTS.	168
TABLEAU 3. COMPARAISON DU PROFIL HEMATOLOGIQUE ET DES MARQUEURS HEMOLYTIQUE.	172
TABLEAU 4. LES INDICES D'ELONGATION.....	174
TABLEAU 5. COMPARAISON DES INDICES D'AGREGATION ERYTHROCYTAIRE ENTRE LE GROUPE SC ET LE GROUPE SS.	174
TABLEAU 6. VALEURS DE REFERENCE INTERNATIONALE POUR CARACTERISER LES SUJETS CONTROLES (AA) AU NIVEAU HEMATOLOGIQUE ET HEMOLYTIQUE.....	177
TABLEAU 7. COMPARAISON DE LA PERFUSION BASALE ET DES DEUX PHASES DE LA REPONSE A L'HYPEREMIE ENTRE LES TROIS GROUPES.....	180
TABLEAU 8. CLASSIFICATION DE LA REEPPONSE A L'HYPEREMIE INDUITE PAR LA CHALEUR SELON LA COURBE D'HYPERTHERMIE OBTENUE.	185
TABLEAU 9. COMPARAISON DES VARIABLES CARDIOVASCULAIRES ENTRE LES SUJETS SAINS (AA) ET LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES SC ET SS	195
TABLEAU 10. SIGNIFICATIVITE DES CORRELATIONS ENTRE LES PARAMETRES MICROVASCULAIRES ET LE STRESS OXYDANT ET LE METABOLISME DE NO CHEZ LES PATIENTS SC ET SS	206
TABLEAU 11. LA VARIABILITE DE LA FREQUENCE CARDIAQUE	209
TABLEAU 12. EFFET DU TRAITEMENT HU SUR LES PARAMETRES DE LA FONCTION VASCULAIRE ET DU STRESS OXYDANT.....	221

Index des Abréviations

A

A : surface de section vasculaire
AA : sujets sains
ACTES : adaptation au climat tropical, exercice et santé
ADN : l'acide désoxyribonucléique
AI : l'indice d'agrégation
AMP : adénosine monophosphate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ANF : facteur natriurétique auriculaire
AOPP : produits avancés de l'oxydation des protéines
AP : activité physique
AS : sujets porteur du trait drépanocytaire
AST : aspartate aminotransferase
ATP : adénosine triphosphate
AVC : accident vasculaire cérébrale

B

BH₄ : tetrahydrobioptérine

C

Ca²⁺ : calcium
CAM : *cell adhesion molecule*
CAT : catalase
CGRP : *calcitonin gene related peptide*
CHU : centre hospitalier universitaire
Cl : chloride
CMBC : *concentration of moving blood cells*
CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires
CO₂ : dioxyde de carbone
CVC : *cutaneous vascular conductance*
CVO : crises vaso-occlusive

D

d : diamètre du vaisseau

DE : dépense énergétique

E

ECG : électrocardiogramme

EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

EDRF : *endothelium derived relaxing factor*

EI : *elongation index*

EPS : éducation physique et sportive

ERO : espèces réactives de l'oxygène

ET-1 : endothéline -1

F

Fe²⁺ : ion ferreux

Fe³⁺ : ions ferriques

FRAP : *Ferric reducing ability of plasma*

G

GhR : glutathion réductase

GMPC : acide guanosine monophosphate cyclique

G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase

GPX : glutathion peroxydase

GR : globule rouge / **GRs** : globules rouges

Gr : glutathion réductase

GSH : glutathion

GSSG : glutathion oxydé

H

H⁺ : ions hydrogène

HAS : haute autorité de santé

Hb : hémoglobine

HHb : déoxyhémoglobine

HbA : hémoglobine normale

HbC : hémoglobine C

HbF : hémoglobine foetale
HbO₂ : oxyhémoglobine
HbS : hémoglobine S
HF : *high frequency* / **HF_n** : HF normalisé en pourcentage
H₂O : eau
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
HU : hydroxyurée

I

ICAM : *intercellular adhesion molecule*

K

K⁺ : potassium
KEAP1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1*

L

L : longueur
LDH : lactate déshydrogénase
LDF : *Laser Doppler flowmetry*
LF : *low frequency* / **LF_n** : LF normalisé en pourcentage

M

MDA : malondialdehyde
METmin : *Metabolic Equivalent of Task*
metHb : méthémoglobine

N

NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT : nirtoblue tetrazolium
NF-κB : facteur de transcription nucléaire-κB
NO : monoxyde d'azote
NO₂[°] : dioxyde d'azote
NO₃⁻ : nitrate

NO_x : métabolites nitrites et nitrates

NOS : oxyde nitrique synthase

eNOS : *endothelial Nitric Oxide Synthase*

Nrf2 : *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

O

O₂ : oxygène

O₂^{•-} : anion superoxyde

OH[•] : radical hydroxyle

OMS : organisation mondiale de la santé

ONOO⁻ : peroxydinitrite

P

P : pression

PAEE : *physical activity energy expenditure*

PAD : pression artérielle diastolique

PAM : pression artérielle moyenne

PAS : pression artérielle systolique

PGI₂ : prostacycline

pH : potentiel hydrogène

PNNS : plan national nutrition santé

PNN50 : pourcentage d'intervalles RR différent de plus de 50 ms du précédent

P_{tot} : spectre de puissance totale

PU : perfusion

PVP : Polyvinylpymolidone

Q

Q̇ : débit sanguin

R

r : rayon

R : résistance vasculaire

REE : dépense énergétique au repos

RMSSD : la racine carré de la moyenne de la somme des différences au carré des intervalles RR successifs

ROS : radicaux dérivé de l'oxygène

S

SC : sujets drépanocutaire hétérozygote portant de l'HbS et de l'Hb C

SDM : syndrome drépanocytaire majeur

SDNN : écart type de la durée d'une suite d'intervalles RR

SNA : système nerveux autonome

SOD : superoxyde dismutase

SpO₂ : saturation de l'Hb en oxygène

STA : *syndrome thoracique aigu*

T

T : tension

t : unité de temps

TBA : acide 2-thiobarbiturique

THI : *tissu hemoglobin index*

TM6M : test de marche de 6 minutes

TOI : *tissu oxygen index*

U

UTD : Unité Transversale de la Drépanocytose

V

$\vec{v}$: vitesse de l'écoulement

VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule*

VFC : variabilité de la fréquence cardiaque

VIP : *vasoactive intestinal polypeptide*

VLF : *Very Low Frequency*

VOP : vitesse de l'onde de pouls

VOP-CF : VOP carotido-fémorale

VOP –CR : VOP carotido-radiale

VU : vitesse d'écoulement sanguin

η : viscosité sanguine

X

XO : xanthine oxydase

A

INTRODUCTION

GENERALE

Le système cardiovasculaire est indispensable au bon fonctionnement de tous les autres systèmes, plus particulièrement les fonctions de chaque cellule dépendent de cet appareil. Il apporte l'oxygène et des nutriments, élimine le dioxyde de carbone et les déchets métaboliques, transporte les hormones, permet de réguler la température et le pH du corps et participe aux défenses immunitaires. Au cours du développement humain, l'appareil circulatoire subit des modifications en fonction des besoins de l'individu. Le cœur embryonnaire commence à battre dès le 23^{ème} jour du développement. C'est le premier appareil qui est fonctionnel. Le développement du tube cardiaque en cœur à quatre cavités et le passage des vaisseaux primitifs aux vaisseaux définitifs caractérisent la circulation dite « foetale » avec la spécificité d'être irrigué par du sang mêlé. La circulation dite « définitive » se met en place à la naissance. Au premier cri de l'enfant, la circulation pulmonaire devient fonctionnelle. L'air riche en oxygène entraîne la fermeture du canal artériel et du foramen ovale ce qui permet la séparation de deux circulations, veineuse et artérielle. La bonne coordination des deux circulations exige la mise en jeu de régulateurs nerveux et hormonaux. De l'enfance à l'âge adulte le système cardiovasculaire subit aussi des changements. Chez l'enfant les dimensions du cœur, le volume sanguin total et le volume d'éjection systolique sont inférieurs à ceux de l'adulte. En compensation, la fréquence cardiaque est plus élevée. Chez les sujets âgés, la fonction cardiovasculaire se dégrade avec le vieillissement, et la fréquence cardiaque et la réactivité vasculaire diminuent progressivement.

En général, le cœur, la circulation sanguine et la régulation vasculaire sont essentiels pour le contrôle et le maintien de l'homéostasie. L'équilibre dynamique est maintenu par la capacité du système cardiovasculaire à s'adapter aux changements des conditions physiologiques et aux besoins multiples de l'organisme (exercice, état de santé, climat, grossesse, croissance etc.). Cependant, les demandes d'adaptations cardiovasculaires chroniques peuvent conduire à des changements structurels et fonctionnels irréversibles. C'est le cas de la drépanocytose. Cette hémoglobinopathie se caractérise par des anomalies cardiovasculaires (au niveau

sanguin et vasculaire). Le système cardiovasculaire a subi des changements multiples pour pouvoir maintenir un fonctionnement adéquat. Plusieurs équipes de recherche cherchent à mieux comprendre la contribution de la dysfonction vasculaire à la survenue des complications cliniques, tant chez les patients drépanocytaires de génotypes majeurs que de génotypes drépanocytaires modérés, ceci afin de mieux caractériser son apparition et son développement pour pouvoir développer des approches thérapeutiques. Compte tenu de ses divers fonctions dans le maintien du fonctionnement et de l'homéostasie endothéliale et vasculaire, la diminution de la disponibilité en monoxyde d'azote se traduit par l'apparition d'une dysfonction vasculaire. Le rôle du monoxyde d'azote dans la physiopathologie SS est assez bien connu tandis que son implication dans la physiopathologie de la forme drépanocytaire composite SC n'est pas bien étudiée. Ces travaux de thèse ont comme objectif de tester l'hypothèse suivante : si chez les patients SS l'hémolyse exacerbée contribue probablement à la dysfonction vasculaire, chez les patients SC, qui ont apparemment un taux d'hémolyse plus faible, on devrait observer une fonction vasculaire moins altérée. Néanmoins, la validation ou l'invalidation de cette hypothèse nécessite une caractérisation de la fonction vasculaire dans ces deux génotypes drépanocytaires et dans un deuxième temps identifier et comparer les déterminants de cette dysfonction. La pratique physique joue un rôle essentiel dans la prévention des divers troubles cardiovasculaires. Un programme de réentraînement comme « thérapie » chez les patients drépanocytaires fait l'objet depuis quelques années d'un nombre de recherches croissant. Il apparaît que la pratique régulière d'une activité physique d'intensité modérée pourrait avoir des effets bénéfiques. Ainsi, afin de répondre à cette hypothèse mes travaux de thèse visent également d'identifier un possible lien entre les atteintes vasculaires et la condition physique.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail de thèse.

B

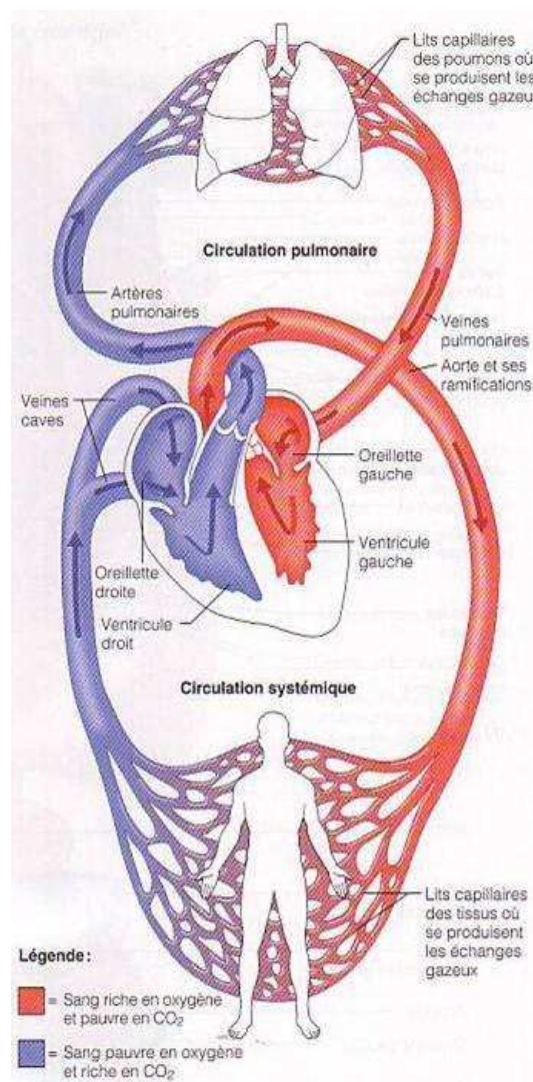
REVUE DE

LITTERATURE

I. LE SYSTEME CIRCULATOIRE – NOTIONS D'HEMODYNAMIQUE

LA CIRCULATION SANGUINE

Le système cardiovasculaire est un système en circuit fermé. On distingue deux sous-systèmes : la grande circulation systémique et la petite circulation pulmonaire (Figure 1). Le sang y circule en raison du gradient de pression qui existe entre le réseau artériel et veineux en allant des régions de pression élevée vers les régions de basse pression : artères– artérioles- capillaires- veinules- veines.



Le corps humain.fr

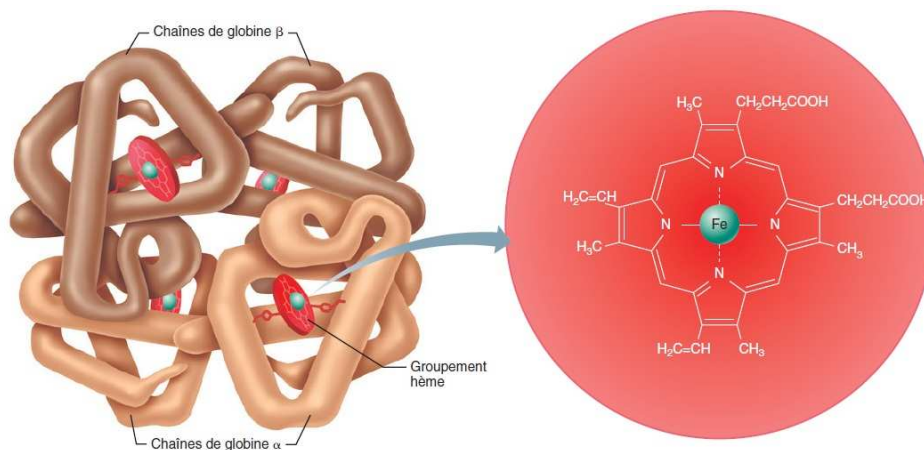
Figure 1. La circulation pulmonaire et systémique

Les propriétés du flux sanguin sont complexes. Cette complexité provient du fait que le sang contient de nombreux éléments (les éléments figurés), suspendus dans une solution aqueuse contenant des ions, des sucres, des lipides et des protéines (le plasma). Les cellules, que l'on peut séparer par centrifugation, sont de trois types : les érythrocytes, les leucocytes et les thrombocytes.

I.1 Aspects généraux de l'hémoglobine

Les globules rouges (érythrocytes, GR) sont les cellules les plus nombreuses du sang dont le rôle principal est de transporter l'oxygène. Le sang humain normal contient 4 à 5 millions de globules rouges par mm^3 . Le globule rouge normal est une cellule discoïde biconcave dépourvue de noyau, de $8\mu\text{m}$ de diamètre avec un volume de 90 fl, soit 90.10^{-15} litre (Bull & Brenton-Gorius, 1995). La flexibilité membranaire et la forme biconcave permettent une expansion cellulaire jusqu'à 150 fl et facilitent le passage capillaire (Klinken, 2002). Lors d'un ralentissement du flux sanguin, les globules rouges interagissent spontanément et peuvent former des agrégats réversibles, phénomène décrit initialement par Fåhræus (Fåhræus, 1929). Le globule rouge normal vit en moyenne 120 jours (Shemin & Rittenberg, 1946).

L'hémoglobine (Hb), le pigment respiratoire des globules rouges, est une protéine globulaire composée de quatre sous-unités : deux paires de chaînes polypeptidique « globine » dont chacune possède un groupement hème, portant en son centre un ion ferreux (Fe^{2+}) qui assure la fixation du dioxygène (Figure 2) (Steinberg *et al*, 2009). Chaque globule rouge renferme environ 250 millions de molécules d'hémoglobine, chacune pouvant fixer quatre molécules du dioxygène.



<http://1.bp.blogspot.com/-e6Smqg7Onuk/TRjRXgT54SI/AAAAAAAAAPg/uD7Q55FaHqM/s1600/HB.jpg>

Figure 2. Structure moléculaire d'hémoglobine

(à gauche) L'hémoglobine est composée de quatre chaînes polypeptidique de globine : deux chaînes α , deux chaînes β et de quatre groupements hème, (à droite) Schéma d'une molécule d'hème contenant du fer.

Au cours du développement embryonnaire jusqu'à quelques semaines après la naissance, on observe des changements tant au niveau du lieu de la synthèse des globines que dans le type de celles-ci (Figure 3) (Labie & Elion, 2005). On distingue six types de globine désignés par une lettre grecque : alpha (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ) et zêta (ζ). Les hémoglobines embryonnaires ϵ , ζ , α et γ sont synthétisées précocement au début du développement essentiellement au niveau du sac vitellin. Elles se combinent pour former l'hémoglobine Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), l'hémoglobine Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) et l'hémoglobine Portland ($\zeta_2\gamma_2$) (Figure 4). La période embryonnaire se termine entre la 6^e et la 8^e semaine. Progressivement ces deux globines sont remplacées ($\zeta \rightarrow \alpha_1$ et α_2 et $\epsilon \rightarrow \gamma$) par les globines fœtales (HbF $\alpha_2\gamma_2$) (Figure 3). A partir de la 9^e semaine et pour le reste de la vie fœtale, le foie et la rate sont les sites majeurs d'érythropoïèse, bien que la moelle osseuse devienne active dès le second trimestre et soit le lieu majeur de synthèse à partir de la naissance.

La synthèse de la chaîne β reste faible pendant plusieurs mois mais augmente brusquement avant la naissance. A la naissance, il y a encore une large prédominance de l'HbF mais

l'expression des chaînes γ diminue dans les premiers mois de vie. Le stade des globines adultes (98% HbA₁ $\alpha_2\beta_2$) est atteint entre 6 et 12 mois après la naissance.

L'Hb adulte est composée de deux chaînes α et deux chaînes β (Rhinesmith, 1957; Rhinesmith, 1958). L'évolution de la chaîne δ plus tardive restera faible (HbA₂ $\alpha_2\delta_2$). La proportion d'hémoglobine fœtale est normalement inférieure à 1% mais son expression peut persister dans des conditions pathologiques, telles que dans la drépanocytose.

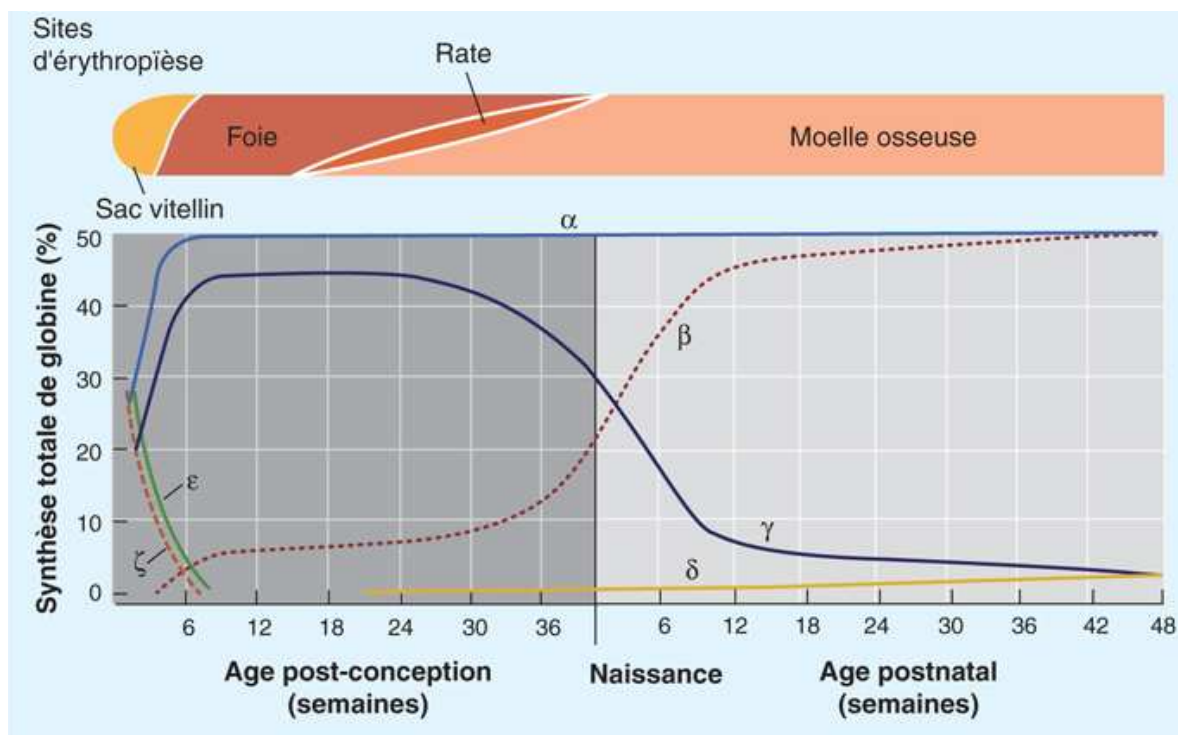


Figure 3. Expression des gènes globine au cours du développement ontogénique

(Libbey, 2013)

Pour la chaîne β on observe deux étapes principales : la première à la fin du stade embryonnaire lors de l'extinction du gène ϵ en faveur de la chaîne γ et la deuxième au stade périnatal lors du remplacement du chaînes γ par celle du gène adulte β . La chaîne adulte α commence à se développer à la fin du stade embryonnaire et remplace l'expression du gène ζ (Labie & Elion, 2005).

Toutes les hémoglobines sont des tétramères composés de deux sous-unités de type α globine et deux sous-unités de type β globine. Les gènes codant les chaînes α globine sont disposés

sur le bras court du chromosome 16 alors que le gène β -globine est localisée sur le bras court du chromosome 11 (Figure 4).

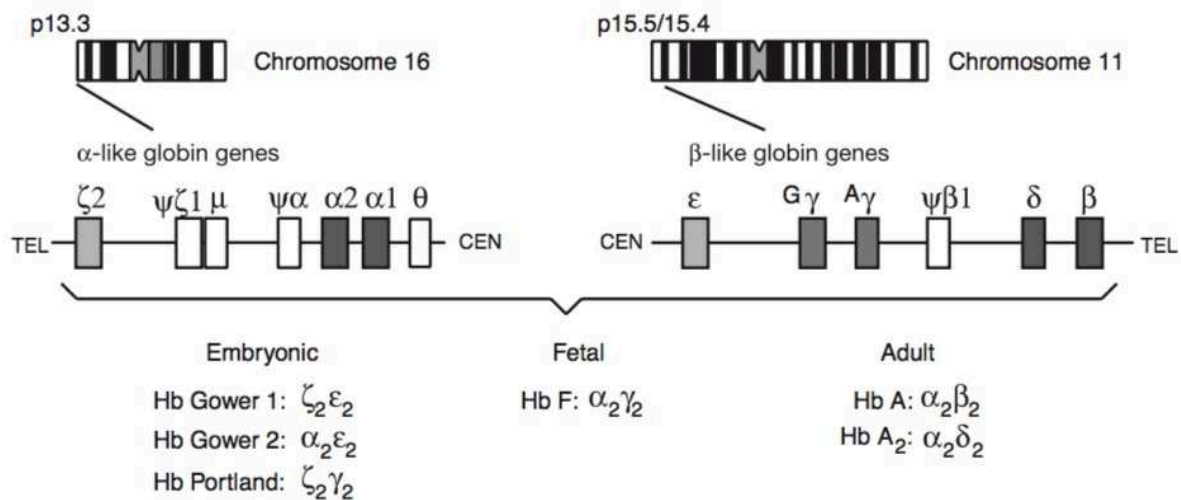


Figure 4. Structure et organisation des gènes globines sur les chromosomes 11 et 16 selon leur ordre d'expression au cours du développement

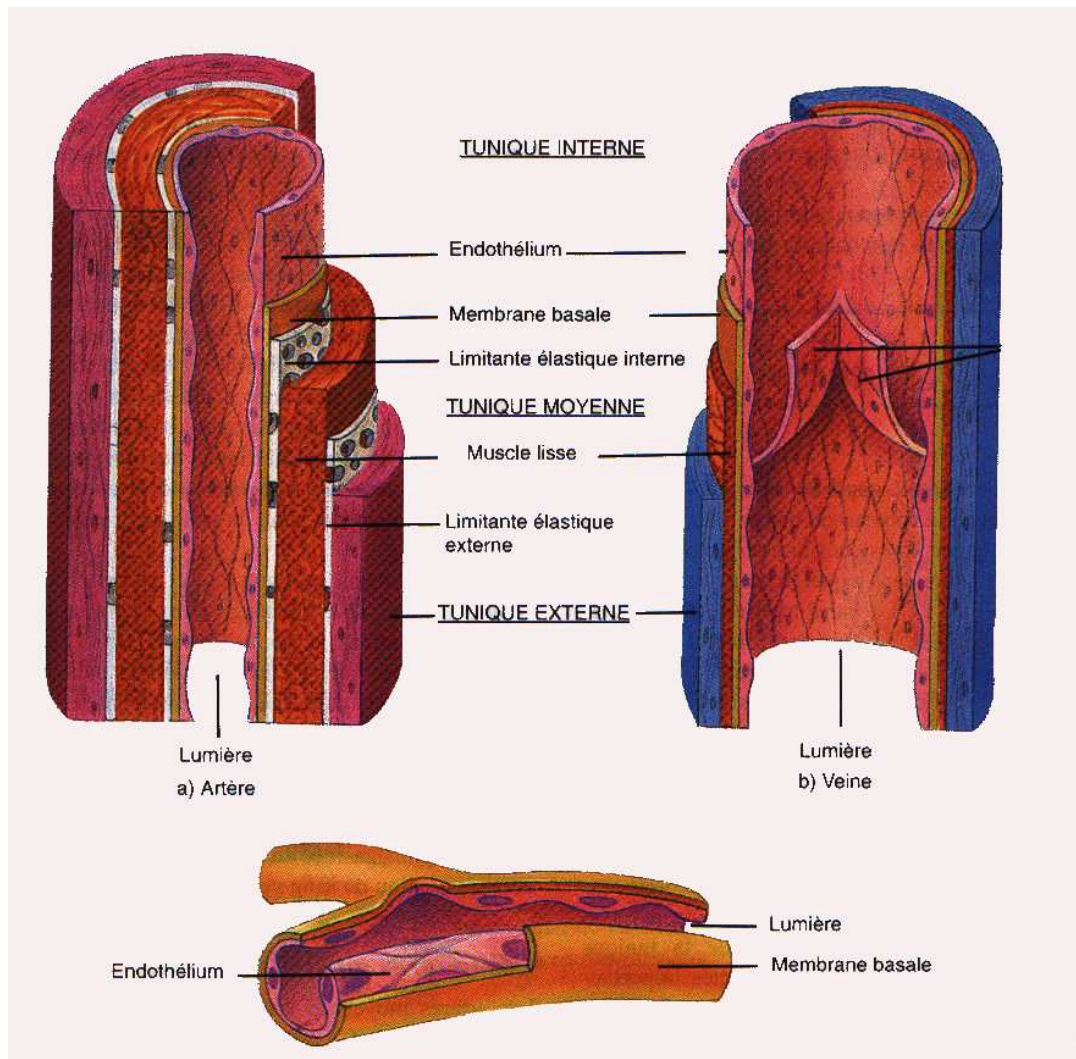
pour la famille α , gène ζ embryonnaire, α_1 et α_2 foetaux/ adultes ; pour la famille β , gène ζ embryonnaire, foetaux, δ (minoritaire) et β adultes. D'après (Steinberg *et al*, 2009)

La synthèse d'hémoglobine est un processus très complexe et coordonné. Malheureusement, plusieurs erreurs peuvent apparaître à des niveaux différents entraînant l'apparition des hémoglobinopathies. Il existe des multiples combinaisons possibles, bien illustré par la diversité des hémoglobinopathies, dont une est la Drépanocytose.

I.2 Hémodynamique vasculaire

1. Les vaisseaux sanguins

La fonction principale des vaisseaux sanguins est de transporter le sang et de contrôler son écoulement. Pour cela il contient quatre types de tissus : (1) les fibres collagènes, qui donnent la résistance aux vaisseaux empêchant leur distension, (2) les fibres élastiques, qui sont extensibles permettant l'élasticité vasculaire pour résister à la forte pression sanguine, (3) les muscles lisses, qui sont importants pour la réactivité vasculaire et l'adaptation vasculaire en fonction des besoins et des résistances périphériques et (4) un endothélium interne qui représente la zone de contact et communication avec le sang (Figure 5). Les propriétés mécaniques d'un vaisseau dépendent de la proportion de ces différentes composantes tissulaires. Ainsi, la structure et la composition des vaisseaux sont adaptées à leur localisation (Figure 5).



<http://bio.m2osw.com/gcartable/cardiologie/arterveinetcap.htm>

Figure 5. Les vaisseaux sanguins

Structure d'une artère (à gauche), d'une veine (à droite) et des capillaires (en bas). La paroi des artères et celle des veines est formée de tissus semblables, elles comportent trois couches principales :

- la tunique externe qui contient principalement des fibres collagènes donnant une stabilité et une fixation aux tissus voisins,
- la tunique moyenne (la média) est constituée de tissu musculaire lisse, de fibres élastiques et de fibres collagènes.
- la tunique interne est un revêtement endothélial composé d'une couche de cellules qui sont en contact direct avec le sang avec le rôle principal de produire, de stocker et de sécréter des substances vasoactives, des fibres collagènes, le facteur de *Von Willebrand* qui joue un rôle dans la coagulation, l'endothéline 1, certaines enzymes etc. Pais *et al*, in (Connes *et al*, 2010).

2. Les artères

Les artères sont divisées en trois catégories : les artères élastiques de conduction, les artères musculaires de distribution et les artérioles d'alimentation. La paroi artérielle des artères centrales (telles l'aorte ou la carotide) dispose d'une structure très élastique avec relativement peu de cellules musculaires lisses (Figure 6). La média contient des fibres d'élastine assurant l'élasticité de l'artère mais aussi des fibres de collagène donnant la solidité à la paroi artérielle pour résister à la forte pression qui est exercée par l'éjection ventriculaire. Leur fonction principale est l'amortissement et la régulation du flux sanguin. Pendant la systole, le sang éjecté par le cœur à forte pression provoque une distension de l'aorte et des grosses artères. Leur structure permet de préserver cette pression systolique et un volume sanguin transitoirement pour perfuser les tissus périphériques. Lors de la diastole, les parois élastiques reprennent leur position normale et transforment ainsi le débit sanguin pulsé cyclique et discontinu en débit sanguin continu et à basse pression (*effet Windkessel*, (Bouvrain & Levy, 1981)). Cette transformation permet de perfuser en continu les organes distaux et de limiter des éventuelles lésions induites par une pression trop élevée. A l'opposé, la paroi des artères périphériques plus distales (aussi appelées artères de distribution) a une structure musculaire et contient plus des fibres musculaires lisses que de fibres élastiques (Figure 6). La pression sanguine diminue avec l'éloignement du cœur et la vasomotricité vasculaire devient essentielle pour maintenir la perfusion stable et suffisante. C'est la capacité des muscles lisses vasculaires de se dilater et de se contracter grâce à des stimuli d'origine neuronale ou endothéliale qui régule l'écoulement du flux sanguin dans les artères distales. Les artérioles sont également appelées vaisseaux de résistance. Les artérioles pre-capillaires forment des sphincters pour réguler l'écoulement sanguin capillaire. Ils sont innervés richement et contiennent divers récepteurs d'hormones et d'autres substances (catécholamines, angiotensine etc.). Ils reçoivent des stimuli multiples d'origine endothéliale, métabolique ou

myogénique pour contrôler le volume et la pression du sang entrant dans les lit capillaires (Pais *et al*, 2010 ; Connes *et al*, 2010).

3. Les capillaires

La structure des capillaires est extrêmement simple (Figure 6). La paroi est fine, dépourvue de la tunique externe et moyenne et est composée seulement d'une couche de cellules endothéliales. La vasomotricité des capillaires est limitée à la capacité contractile des péricytes. Ce sont des cellules murales localisées au niveau de l'endothélium (Shepro & Morel, 1993). Elles jouent un rôle dans la régulation et l'adaptation du débit sanguin capillaires en fonction des besoins métaboliques (Shepro & Morel, 1993). Pour cela, elles transmettent les signaux aux artérioles pour que celle ci s'adaptent et se dilatent ou contractent (Murrant & IH., 2000). Quelques études (Neuhaus *et al*, 2017; Yemisci *et al*, 2009) démontraient que des périodes d'ischémie / réperfusion et le stress oxydatif provoquent une dysfonction des péricytes altérant le flux sanguin capillaire et post-capillaire.

Toutes les échanges entre le sang et les tissus se produisent au niveau de l'endothélium. Malgré leur petit diamètre (5-10 μ m), le sang y fluctue à une faible vitesse. Ceci est du au fait qu'ils occupent la plus grande surface vasculaire (3000cm² vs 4cm² de l'aorte (Pais *et al*, 2010). L'écoulement sanguin plus lent du sang favorise les échanges. Il est dépendant principalement de la déformabilité érythrocytaire.

4. Les veines

Le retour sanguin, en direction du cœur, s'effectue d'abord par les veinules et ensuite par les veines. La paroi des veines est généralement plus mince et le diamètre de la lumière vasculaire plus large que celle des artères (Figure 6). La tunique externe est bien développée contrairement à la tunique moyenne qui est très fine. Les veines transportent du sang à une

vitesse moindre et le sang circule dans les veines principalement grâce à l'action des muscles. Dans les plus grosses veines, il y a des valvules (Figure 5) qui permettent au sang de se diriger exclusivement vers le cœur bloquant le reflux du sang. Les veines sont divisées en trois catégories : les petites veines et veinules, les veines de taille moyenne et les large veines. À cause de la faible pression sanguine, les érythrocytes interagissent et forment souvent des agrégats (Cabel *et al*, 1997). Ainsi la viscosité sanguine à faible vitesse de cisaillement est très influencée par les propriétés d'agrégation érythrocytaire (Connes & Boisseau, 2010). Dans les veinules post capillaires on observe le phénomène d'adhérence des cellules circulantes à l'endothélium (Atherton & Born, 1972) via des sélectines (E-sélectine, P-sélectine, L-sélectine) et d'intégrine (CD11b/CD18) et des récepteurs endothéliaux (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule* ; VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule*) (Carlos & Harlan, 1994). Ce phénomène d'adhérence cellulaire à l'endothélium est nécessaire à la diapédèse. Dans certaines pathologies marquées par un environnement pro-inflammatoire et pro-oxydatif exacerbé, comme par exemple la drépanocytose, les érythrocytes peuvent interagir avec les leucocytes « adhésifs » en favorisant les obstructions vasculaires (Turhan *et al*, 2002). Dans les veines de taille moyenne, une dysfonction des valvules ou du tonus musculaire peut provoquer un élargissement des vaisseaux et le développement de thromboses, ou des ulcères. Les fibres d'élastine et collagène et les cellules musculaires deviennent plus abondantes dans les larges veines < 1cm (Figure 6). Les valvules y sont absentes.

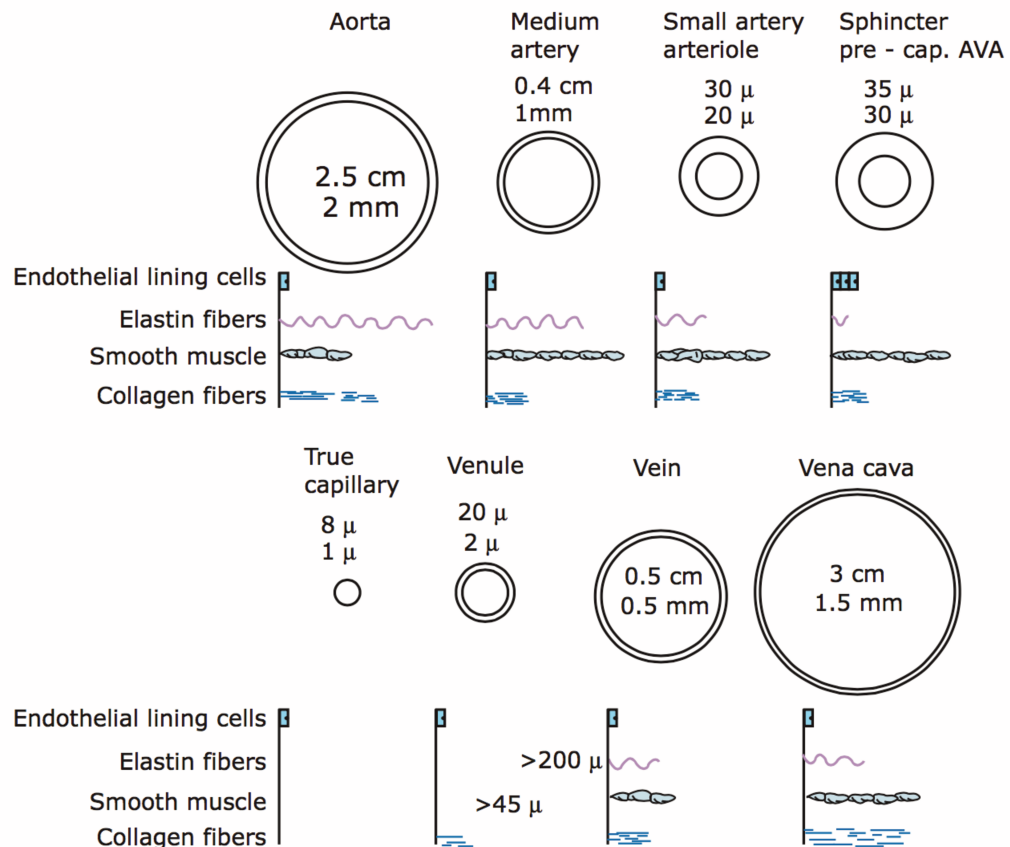


Figure by MIT OCW. After p. 64 in Burton. *Physiology and Biophysics of the Circulation*. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1972.

Figure 6. Anatomie fonctionnelle de la paroi vasculaire des artères, veines et capillaires

Les différentes composantes cardiovasculaires sont intrinsèquement complémentaires, faites pour interagir et fonctionner ensemble. Les adaptations et ajustements spontanés en réponse aux brusques changements physiologiques (par exemple simplement passer de la position allongée à la position debout) dépendent fortement de leur bonne coordination.

I.3 Les principales grandeurs hémodynamiques

L'hémodynamique est l'étude de l'interaction des déterminants sanguins et vasculaires de l'écoulement sanguin. Certaines relations ont été résumées dans des lois hémodynamiques. Une première approche est décrite par la suite.

1. Le débit sanguin

Le débit cardiaque est le volume du sang éjecté par le ventricule gauche lors de la systole par unité de temps. Il dépend du gradient de pression entre le réseau artériel et veineux et de la résistance qui s'oppose à l'écoulement du sang.

Le débit sanguin ($\dot{Q}$) décrit le volume du sang (V_s) qui circule par unité de temps (t) dans une région circulatoire donnée (le système vasculaire, un vaisseau ou un organe).

$$(1a) \quad \dot{Q} = \frac{V_s}{t}$$

$$(1b) \quad \dot{Q} = \frac{\text{longueur} \times A}{t}$$

A, surface de section vasculaire : $A = \frac{\pi d^2}{4}$

En utilisant $\vec{v}$, la vitesse de l'écoulement : $\vec{v} = \frac{\text{longueur}}{t}$ en (1a) on obtient

$$(1c) \quad \dot{Q} = \vec{v} \times A$$

$$(1d) \quad \dot{Q} = \vec{v} \times \frac{\pi d^2}{4}$$

La circulation sanguine est un circuit fermé avec un débit sanguin constant. Le débit sanguin suit la *Loi de continuité*, qui représente la conservation du débit.

$$(2a) \quad \dot{Q}_1 = \dot{Q}_2$$

$$(2b) \quad \vec{v}_1 \times A_1 = \vec{v}_2 \times A_2$$

$\vec{v}_1, \vec{v}_2$ étant les vitesses de l'écoulement du fluide aux points de section A_1, A_2

En conséquence de l'équation (1c) on obtient

$$(3) \quad \vec{v} = \frac{\dot{Q}}{A}$$

La vitesse de l'écoulement est inversement proportionnelle à la surface de section globale. Ainsi le sang s'écoule plus rapidement dans les segments étroits que dans les sections plus larges, ceci représente *l'effet Venturi* (Figure 7).

2. La pression sanguine

Les fluides exercent une force perpendiculairement à leurs surfaces de contact. C'est cette pression (P) qui déplace les fluides dans les conduits. Le sang exerce une force contre les parois vasculaires, cette force s'appelle pression sanguine, pression artérielle ou encore tension artérielle. Il va toujours des régions de forte pression vers les régions où la pression est la plus basse (Figure 7). Elle est plus élevée dans la circulation systémique que dans la circulation pulmonaire, et plus élevée dans les artères que dans les veines. Elle atteint son maximum pendant la systole ventriculaire (pression systolique). La pression la plus faible correspond à la pression diastolique. La pression moyenne exercée par le sang contre la paroi vasculaire est estimée à partir de la pression systolique et diastolique.

$$(4) P_{moyenne} = \frac{2}{3} P_{diastolique} + \frac{1}{3} P_{systolique}$$

La différence de pression entre la circulation artérielle et veineuse provient de la résistance des vaisseaux eux-mêmes (R). Cette résistance est une force qui s'oppose à l'écoulement du sang. Cette résistance, selon la *Loi de Poiseuille*, est en fonction de la longueur (L) et du rayon (r) du vaisseau et de la viscosité sanguine (η).

$$(5) R = \frac{8 \eta L}{\pi r^4}$$

La différence de pression est dépendante du débit sanguin et des résistances à l'écoulement.

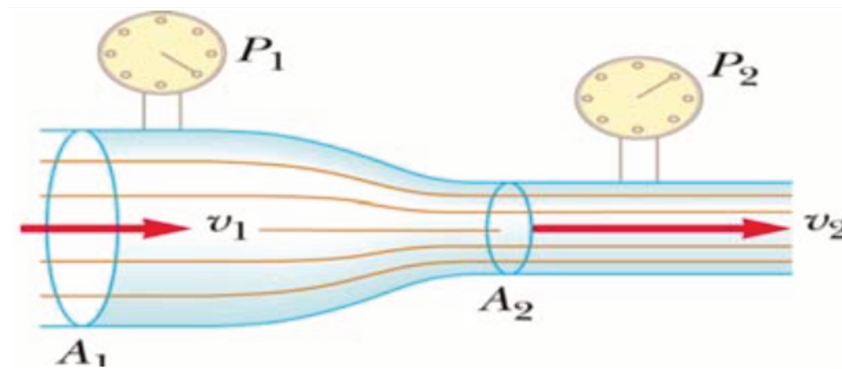


Figure 7. Les loi d'écoulement sanguin

Représentation schématique des deux loi d'écoulement sanguin. D'après Gaz (Gaz, 1970) :

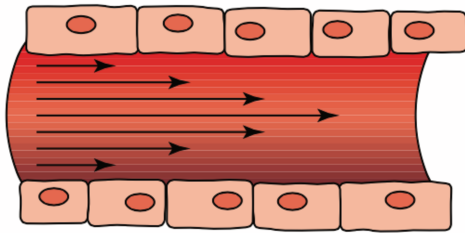
la Loi de Continuité (conservation du débit) et l'effet Venturi.

$\vec{v}$, vitesse du fluide ; A , surface de section; P , pression

3. L'écoulement sanguin

Un fluide peut présenter deux types principaux d'écoulement : l'écoulement laminaire et l'écoulement turbulent (Figure 8) (Lowe, 1986). Dans un écoulement laminaire, chaque cellule en suspension suit une trajectoire uniforme qui ne croise pas celle des autres. Le fluide se comporte comme s'il était constitué de plusieurs couches concentriques cylindriques se déplaçant à des vitesses croissantes de la périphérie vers le centre du conduit. La vitesse d'écoulement est presque nulle au contact de la paroi et devient maximale au centre du conduit. Le glissement de chaque couche provoque des frictions (contraintes de cisaillement) entre les couches et à la périphérie jusqu'à la paroi endothéliale. Ces frictions sont dépendantes des propriétés sanguines telles que sa composition, sa viscosité, la déformabilité érythrocytaire etc. Les contraintes augmentent du centre vers la périphérie en diminuant la vitesse de cisaillement (vitesse de déformation du fluide).

a Laminar shear stress



b Turbulent shear stress

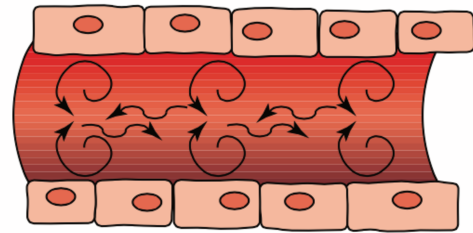


Figure 8. L'écoulement laminaire et turbulent

(Topper & Gimbrone, 1999)

Chez l'homme, l'écoulement sanguin est laminaire à l'exception des ventricules et de l'aorte. Sous certaines conditions physiologiques ou pathologiques, l'écoulement peut devenir turbulent comme par exemple lors de la présence d'une sténose artérielle, d'une adhérence vasculaire accrue ou d'une vitesse sanguine trop élevée. L'écoulement turbulent est marqué par une perte d'énergie importante. Ainsi l'écoulement turbulent modifie la relation débit-pression de façon que le débit n'augmente plus selon une fonction linéaire avec le gradient de pression. La nature d'un écoulement dépend généralement de quatre facteurs qui donne *le nombre de Reynolds* :

- la vitesse de l'écoulement ($\vec{v}$)
- le diamètre du vaisseau (d)
- la viscosité sanguine (η)
- la masse volumique sanguine (ρ)

$$(6a) \quad \text{le nombre de Reynolds} = \frac{\rho \times \vec{v} \times d}{\eta}$$

En utilisant l'équation (1d) $\dot{Q} = \vec{v} \times \frac{\pi d^2}{4}$ on obtient $\vec{v} \times d = \frac{4\dot{Q}}{\pi d}$ et par la suite

$$(6b) \quad \text{le nombre de Reynolds} = \frac{4\dot{Q}\rho}{\pi d\eta}$$

Lorsque le nombre de Reynolds est petit, l'écoulement est considéré comme laminaire et si le nombre est élevé on considère que l'écoulement est turbulent. Selon l'équation (5b) le flux devient turbulent soit par augmentation du débit, soit par réduction du diamètre vasculaire. La contrainte de cisaillement (*shear stress*) et le mode de l'écoulement, peuvent influencer l'expression endothéliale des gènes d'adhérence, d'inflammation, des facteurs de croissance (*growth factor*), des enzymes antioxydantes ou de la famille des monoxyde d'azote (NO) synthases mais également le remodelage de l'endothélium (Chappell *et al*, 1998; Resnick & Gimbrone, 1995; Topper & Gimbrone, 1999).

4. Relation débit-pression - La Loi de Poiseuille

Le débit sanguin est décrit par *la loi d'Ohm*. Il est proportionnel à la différence de pression dans le système vasculaire, mais également inversement proportionnel à la résistance vasculaire (R).

$$(7a) \quad \dot{Q} = \frac{\Delta P}{R}$$

Ainsi le débit sanguin peut augmenter par une augmentation du gradient de pression ou par une diminution des résistances vasculaires.

En remplaçant R de (5), on obtient :

$$(7b) \quad \dot{Q} = \Delta P \times \frac{\pi r^4}{8\eta L}$$

Les résistances vasculaires sont ainsi dépendantes de la viscosité sanguine et de la géométrie vasculaire. Le rayon est à la puissance 4. Ainsi une petite variation du rayon permet une grande variation de la résistance vasculaire et ainsi une modification importante du débit sanguin. Ainsi les résistances vasculaires contribuent à la régulation de la pression artérielle et du débit sanguin. Cependant la viscosité a un effet important sur la vasomotricité.

La viscosité est décrite par le rapport de la contrainte du cisaillement sur la vitesse de cisaillement (*shear rate*). Une augmentation de la viscosité renforce les contraintes de cisaillement contre la paroi vasculaire, augmentant ainsi l'activité de la NO-synthase endothéliale, la production de monoxyde d'azote et permettant une vasodilatation (Tsai *et al*, 2005; Paniagua *et al*, 2001; Buga *et al*, 1991; Pyke & Tschakovsky, 2005). C'est cette interaction entre les stimuli hémodynamiques et l'endothélium qui permet finalement le bon fonctionnement cardiovasculaire.

La loi de Poiseuille est largement utilisée dans le domaine cardiovasculaire. Cependant il est important de mentionner quelques limites. Cette loi a été validée uniquement pour les fluides newtoniens, ce qui n'est pas le cas du sang puisque sa viscosité peut changer selon les conditions physiologiques. De plus les vaisseaux sanguins n'ont pas une valeur fixe du rayon, même en un site donné, et les propriétés rhéologiques du sang sont étroitement liées à l'activité vasomotrice.

5. La Loi de Laplace

Un fluide contenu dans une cavité à paroi élastique, d'épaisseur et diamètre donnés, exerce sur celle-ci par sa pression une certaine tension (T). Considérant les vaisseaux sanguins, la *loi de Laplace* établit une relation entre la différence de pression intra et extravasculaire (Δp , pression transmurale) et le rayon (r) (Ashton, 1975) :

$$(8) \quad T = \Delta p \times r$$

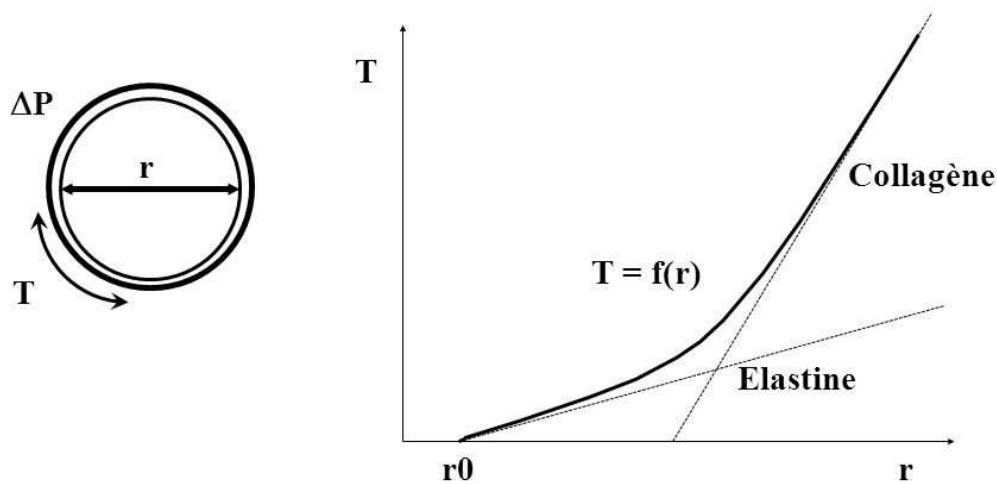
On note que pour un même gradient Δp , la tension est d'autant plus forte sur la paroi que le rayon (r) sera grand. Ainsi d'après la *Loi de Laplace*, la tension peut être considérée comme une fonction linéaire du rayon dont la pente est égale au gradient transmural de pression (*la droite de Laplace*). Le rayon est modulé par la capacité vasculaire à se dilater et se contracter.

Les capillaires et artères à faible rayon vasculaire arrivent à supporter des valeurs de forte pression (une diminution du rayon r induit une diminution de la tension).

Deux phénomènes s'appliquent au niveau de la paroi d'une artère :

- le gradient de pression transmural tend à dilater l'artère
- Les propriétés élastiques de l'artère tendent à réduire la lumière de l'artère. l'artère.

Ainsi dans les vaisseaux la relation devient plus complexe et on obtient la courbe tension-rayon (Figure 9).



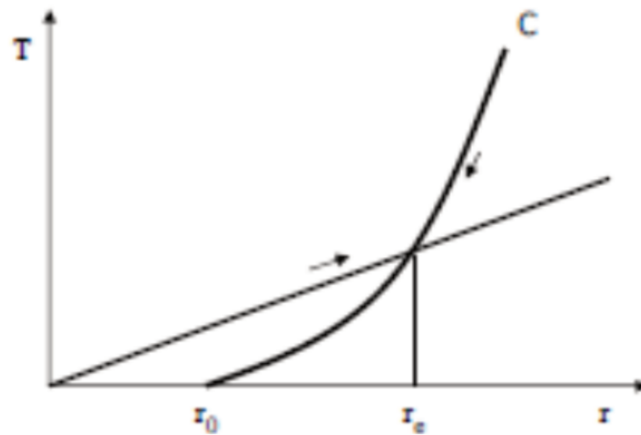
Vicaut 2013www.tsp7.n

Figure 9. Courbe tension - rayon des vaisseaux à parois élastiques

r_0 , est le rayon de base quand il n'existe aucune pression transmurale de pression. La paroi est composée de fibres d'élastine et de collagène qui suivent chacune *la loi de Hook* (l'allongement d'une structure dans une direction est proportionnel à la force appliquée dans cette direction), mais dans l'ensemble la relation devient plus complexe (courbe foncée). A faible pression et donc à faible rayon la tension augmente doucement. Seules les fibres d'élastine sont sollicitées et sont sous tension. Aux pressions plus élevées (donc pour un rayon plus grand) la tension augmente rapidement car seules les fibres collagènes moins élastiques sont sollicitées.

Finalement lorsqu'on représente la droite de Laplace et la courbe ci-dessus, les courbes se coupent au niveau de r_e , c'est le rayon d'équilibre (Figure 10). La vasomotricité vasculaire, et

par conséquent son influence directe sur le débit sanguin et la pression sanguine, permettent de maintenir un rayon d'équilibre :



Vicaut 2013, www.tsp7.net

Figure 10. La droite de Laplace et la courbe C de la relation tension - rayon

Avec r_0 , le rayon de base, r_e , le rayon d'équilibre et r le rayon pour une tension donnée

Pour un $r > r_e$, les fibres collagènes sont sollicitées et se contractent, ainsi on revient vers r_e

Pour un $r < r_e$, les fibres d'élastines sont sollicitées, l'artère se dilate et on revient vers r_e

Ce modèle est applicable pour les différents lits vasculaires mais peuvent varier un peu (selon la pression appliquée) en contenant à la fois deux points d'intersection ou aucun (c'est le cas lorsque Δp est trop faible).

Il existe encore d'autres lois hémodynamiques qui interviennent dans la caractérisation de l'écoulement sanguin représentant la complexité et la coordination de la régulation circulatoire. Pour résumer, la réserve vasomotrice est essentielle pour contrôler le débit sanguin, pour maintenir une pression sanguine adéquate et pour réguler la distribution sanguine aux tissus périphériques en fonction des besoins.

I.4 Vasodilatation et vasoconstriction des vaisseaux sanguins

La vasomotricité représente la capacité des vaisseaux sanguins d'adapter leur diamètre en fonction du comportement de l'écoulement sanguin par les mécanismes de vasoconstriction (diminution du calibre vasculaire) et de vasodilatation (augmentation du calibre vasculaire). Elle joue un rôle primordial au sein du réseau artériel et concerne particulièrement les artères musculaires et surtout les artérioles. La vasomotricité vasculaire est la relaxation (vasodilatation) ou la contraction (vasoconstriction) du muscle lisse situé dans la média (tunique moyenne). La relaxation / contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) résulte de la diminution / augmentation de la concentration de calcium intracytoplasmique (Figure 11).

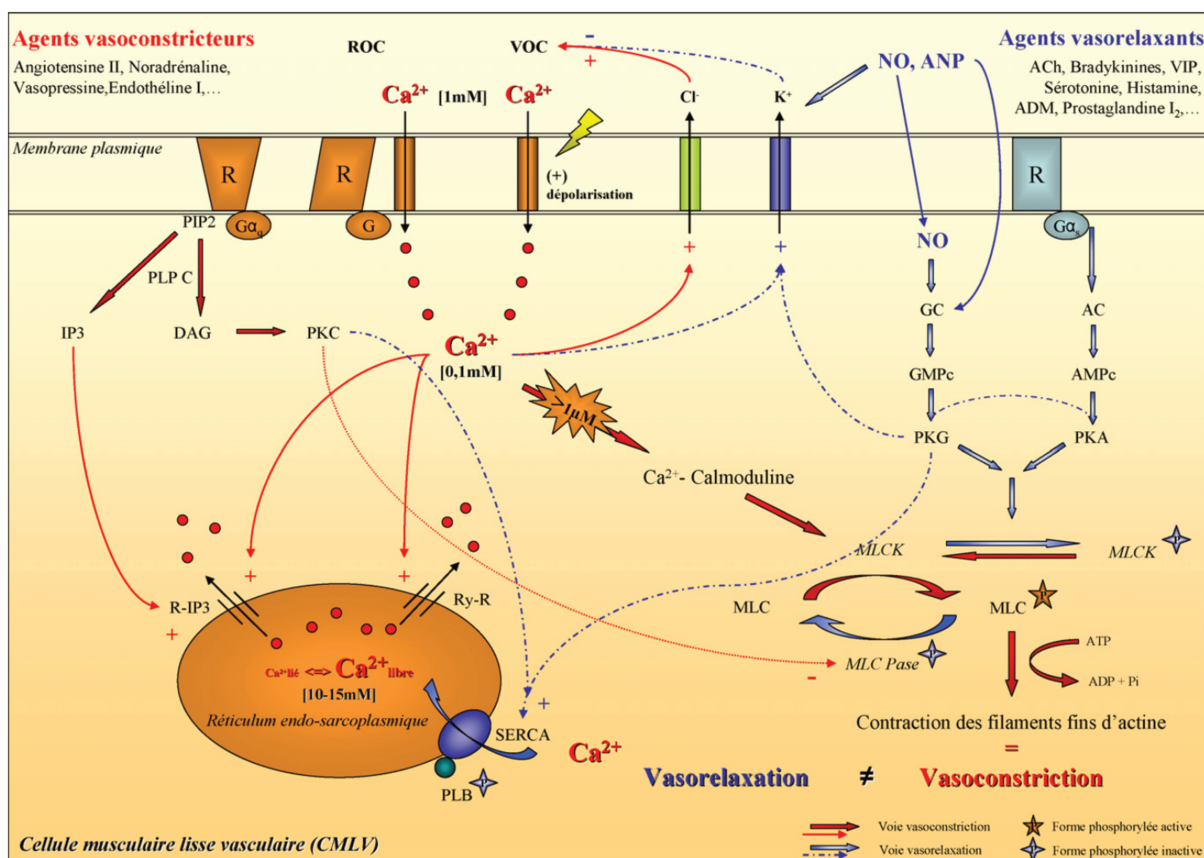


Figure 11. Relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire

Mécanismes de la relaxation (*en bleu*) et contraction (*en rouge*) de la cellule musculaire lisse vasculaire. D'après (Collin & Levy, 2008).

AC, adénylate cyclase ; ACh, acétylcholine ; ADM, adrénomédulline ; ADP, adénosine diphosphate ; AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; ANP, peptide natriurétique atrial ; ATP, adénosine triphosphate ; DAG, diacylglycerol ; Gaq, protéine G/sous-unité alpha de type q ; Gα_s, protéine G/sous-unité alpha de type s ; GC, guanylate cyclase ; GMPc, guanidine monophosphate cyclique ; IP3, inositol trisphosphate ; MLC, chaîne légère de myosine (Myosine Light Chain) ; MLCK, kinase de la chaîne légère de myosine (Myosine Light Chain Kinase) ; NO, monoxyde d'azote ; Pi, phosphate inorganique ; PIP2, phosphatidylinositol biphosphate ; PKA, protéine kinase A ; PKG, protéine kinase G ; PKC, protéine kinase C ; PLB, phospholamban ; R, récepteur couplé à une protéine G ; R-IP3, récepteur à l'IP3 ; ROC, canaux récepteur-dépendants (Receptor Operated Channels) ; Ry-R, récepteur à la ryanodine ; Serca, pompes de recaptage du calcium cytoplasmique (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases) ; VIP, peptide inhibiteur vasoconstriction (Vasoactive Inhibitor Peptide) ; VOC, canaux voltage-dépendants (Voltage Operated Channels).

Le système nerveux autonome sympathique détermine le tonus vasculaire de repos en innervant directement les muscles lisses vasculaires. Il envoie en continu un influx nerveux qui permet de garder un certain degré de constriction et assure le maintien d'une pression sanguine suffisante. La noradrénaline se lie au récepteur α -adrénergique des CMLV provoquant une vasoconstriction. Diverses molécules vasoactives d'origine nerveuse (noradrénaline, acétylcholine, VIP (*vasoactive intestinal polypeptide*), l'histamine, les purines, la sérotonine, la substance P, CGRP (*calcitonin gene related peptide*) et les enképhalines), d'origine hormonale (vasopressine, angiotensine II et l'hormone ANF, *facteur natriurétique auriculaire*) ou d'origine sanguine influencent ce niveau d'activité contractile de repos. Ce sont soit des facteurs intrinsèques de contrôle local, importants dans le couplage du débit avec les besoins métaboliques, soit il s'agit des facteurs de contrôle extrinsèques, importants pour la redistribution du sang entre les organes et pour la régulation de la pression sanguine à l'échelle systémique (Sherwood *et al*, 2016).

Le contrôle intrinsèque décrit l'autorégulation du débit sanguin. Il s'agit de l'ajustement local et automatique du débit sanguin en fonction des besoins métaboliques (Wilmore *et al*, 2009).

Cette régulation dépend

- de l'activité métabolique (diminution du contenu en oxygène (O₂), augmentation des concentrations en dioxyde de carbone (CO₂), en ions hydrogène H⁺, en acide lactique).

Le débit sanguin augmente proportionnellement avec augmentation du métabolisme dans un organe (hyperémie).

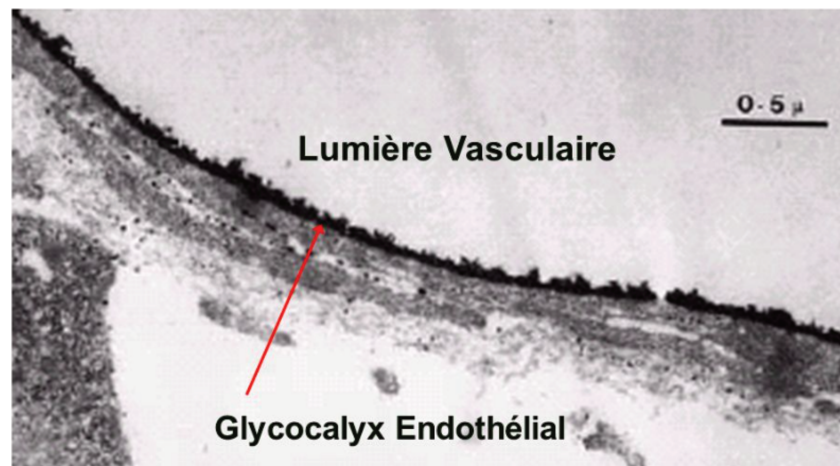
- des variations de la pression artérielle
- des contraintes de cisaillement (*shear stress*) contre l'endothélium, stimulant la libération de NO, d'adénosine triphosphate (ATP) ou du facteur hyperpolarisant endothélial, EDHF.
- de l'inflammation, stimulant la libération d'hormones et d'autres facteurs notamment l'histamine, la sérotonine, le facteur d'activation plaquettaire ou le NO.

Les cellules endothéliales de la paroi vasculaire ont une importance considérable dans le contrôle de la vasomotricité des CMVL.

1. La régulation vasculaire endothélium-dépendante

La régulation de la vasomotricité par les cellules endothéliales vasculaires a été mise en évidence par Furchgott et Zawadzki (Furchgott & Zawadzki, 1980). Il s'agit d'un tissu constitué d'une monocouche de cellules tapissant la surface interne (intima) des vaisseaux sanguins représentant une barrière perméable entre la circulation sanguine et les tissus. L'endothélium a des fonctions paracrines, endocrines et autocrines. Il réagit aux modifications chimiques, physiques et humorales de son environnement par la synthèse et la libération de nombreux facteurs impliqués dans l'angiogenèse, l'inflammation, l'hémostase, la vasomotricité et la perméabilité vasculaire (Félétou & Vanhoutte, 2006). Il maintient l'équilibre entre la vasoconstriction et la vasorelaxation, prévention et stimulation de l'adhérence et de l'agrégation plaquettaire, coagulation et fibrinolyse, et finalement il contribue à l'homéostasie du système cardiovasculaire (Figure 13). L'endothélium est recouvert d'une structure dynamique nommée le glycocalyx (Figure 12). Il est composé de divers glycoprotéines, des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes (Coquerel *et al*, 2013)

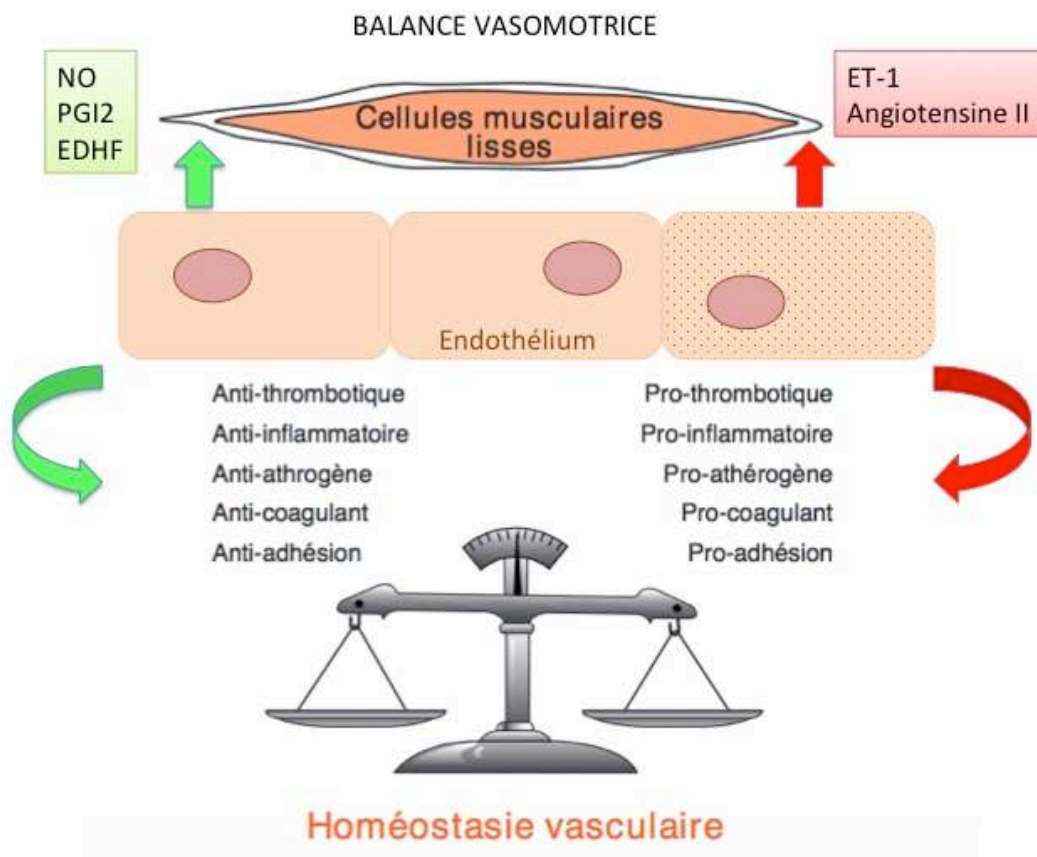
qui sont au contact direct avec le sang et les molécules circulantes et peut détecter en permanence les variations de contrainte de cisaillement.



<http://slideplayer.fr/slide/10686999/>

Figure 12. Le glycocalyx des cellules endothéliales vasculaires en microscopie électronique

Le glycocalyx transmet les informations aux cellules sous-jacentes pour répondre aux changements environnementaux locaux et joue également un rôle dans le contrôle de la perméabilité endothéliale, de l'adhérence cellulaire et de la coagulation (Reitsma *et al*, 2007; Coquerel *et al*, 2013). Le glycocalyx a des propriétés vasoprotectrices via la fixation des médiateurs anticoagulants et des cytokines circulantes et par sa capacité à capter et transformer les espèces radicales (Coquerel *et al*, 2013). Ce faisant, il permet de réduire le stress oxydatif vasculaire, d'assurer la biodisponibilité du NO et de limiter la dysfonction endothéliale. Il est à noter que l'épaisseur du glycocalyx vasculaire serait réduite dans certaines pathologies, dont la Drépanocytose (Van Beers *et al*, 2008).



D'après *Réalités Cardologiques N215, Cahier 1, 2006*

Figure 13. Contribution de l'endothélium vasculaire dans l'homéostasie vasculaire

NO, monoxyde d'azote ; PGI₂, prostacycline ; EDHF, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, ET-1, endothéline

I.5 Le NO et ses propriétés vasculaires

En 1989, Furchgott et Zawadzki démontraient que la relaxation des CMLV en réponse à l'acétylcholine était endothélium dépendante (Furchgott & Zawadzki, 1980). Ils ont évoqué l'*Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF). Ensuite l'EDRF a été identifié comme étant le NO, le radical libre gazeux qui joue un rôle important dans la vasorelaxation. Le NO est un radical constitué d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène liés par une double liaison. Il est produit via des réactions d'oxydation catalysées par des enzymes appelées NO synthases (NOS). Il existe trois formes de NOS, mais dans ce travail on s'intéresse principalement à la

NOS endothéliale (eNOS, *endothelial Nitric Oxide Synthase*), responsable de la synthèse de NO dans les cellules endothéliales. Cette synthèse peut être indirectement stimulée via des nombreux médiateurs comme la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, l'acétylcholine et l'adénosine triphosphate, l'acétylcholine et des hormones comme l'insuline mais elle est stimulée également directement par les contraintes mécaniques (contraintes de cisaillement) contre le glycocalyx endothélial (Figure 14).

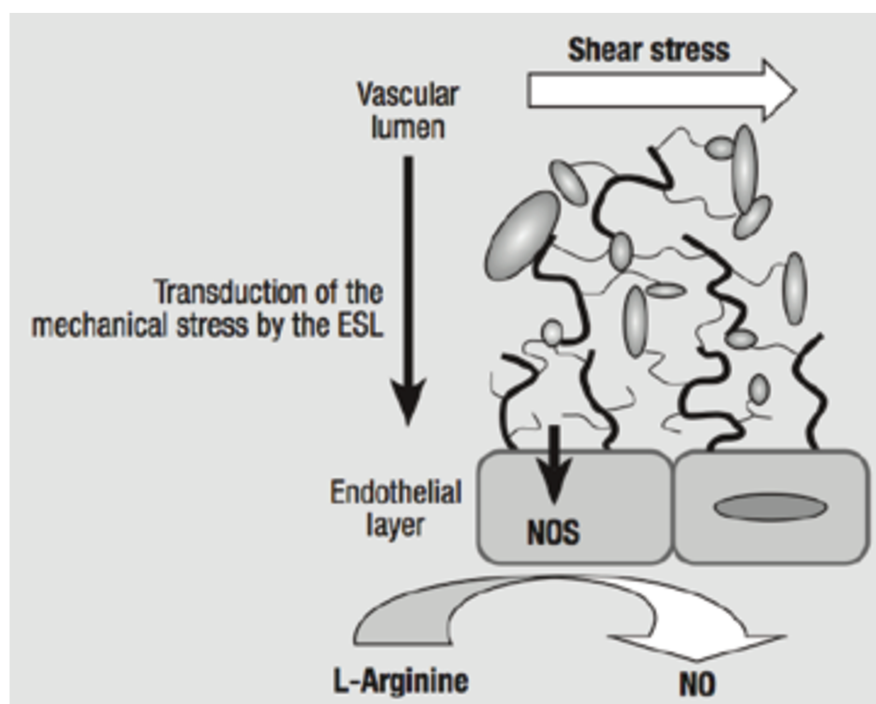


Figure 14. La synthèse de monoxyde d'azote par l'endothelium vasculaire

La synthèse de monoxyde d'azote (NO) endothéliale dépendante stimulée par les contraintes de cisaillement (*shear stress*) qui sont détectés par la couche endothéliale de surface (ESL) ou aussi nommée le glycocalyx. D'après Gori *et al*, in (Baskurt & Hardeman, M. R., Rampling, 2007).

Le frottement du flux sanguin contre l'endothélium vasculaire est proportionnel à la vitesse sanguine et à la viscosité sanguine, et inversement proportionnel au calibre artériel. Des mécanorécepteurs (Garcia-Cardena *et al*, 1998), les intégrines (Tzima *et al*, 2005) et les canaux ioniques (Schwarz *et al*, 1992) sont sensibles à la contrainte de cisaillement. Ils traduisent le stimulus mécanique en stimulus chimique augmentant l'activité de la NOS

endothéliale. L'activation de la eNOS nécessite soit une contrainte de cisaillement, soit la présence d'un cofacteur comme le tetrahydrobioptérine (BH₄), l'hème ou le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Alderton *et al*, 2001; Avogaro *et al*, 2006). Ainsi, le NO est généré localement par les cellules endothéliales (Collin & Levy, 2008) par l'oxydation de la L-arginine, qui est transformée en L-citrulline. Le NO diffuse rapidement vers les CMLV pour y entraîner une relaxation localisée des CMLV. Il active la guanylate-cyclase du muscle lisse entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire de l'acide guanosine monophosphate cyclique et d'adénosine monophosphate cyclique (GMPc et AMPc) (via la guanylate cyclase et l'adénylate cyclase) (Ignarro *et al*, 1987), qui par la suite activent des protéines kinases (PKG et PKA) (Figure 11). Par conséquent, les pompes ATPases de calcium (Ca²⁺) dépendantes du réticulum sarcoplasmique s'activent en diminuant la concentration intracellulaire en calcium ce que induit une relaxation de la CMLV (Figure 11). En outre, les protéines kinases PKG et PKA vont également phosphoryler et inactiver la *Myosin Light Chain Kinase* MLCK, ce qui inhibe la contraction des filaments d'actine et contribue à la relaxation de la CMLV et à la vasorelaxation.

Les rôles principaux du NO sont la régulation du tonus vasculaire (Furchgott, Jothianandan, 1991), l'inhibition de l'activation plaquettaire (Moncada *et al*, 1988) et l'inhibition de l'expression de molécules d'adhérence vasculaire comme VCAM-1 (Radomski *et al*, 1993; Godin *et al*, 1993; Naseem, 2005). Le NO a des effets protecteurs anti-oxydant et anti-inflammatoire, et inhibe la synthèse d'endotheline 1 (De Caterina *et al*, 1995; Ataga *et al*, 2012). Plus récemment, il a été montré que le NO jouait un rôle clef sur la modulation des propriétés rhéologiques des globules rouges de part ses effets sur certaines protéines du cytosquelette en favorisant leurs S-nitrosylation (Simmonds *et al*, 2014).

Cependant la demi-vie du NO est très courte et ses effets vasculaires sont transitoires et locaux (Nathan, 1992; Nathan & Xie, 1994; Moncada, S., & Higgs, 1993). Le NO réagit

notamment très vite avec l'hémoglobine pour former du nitrate et de méthémoglobine. Le fait que normalement l'hémoglobine soit encapsulée dans les globules rouges, réduit cette voie de neutralisation du NO. Néanmoins, l'instabilité du NO explique le fait qu'il est capté facilement par des protéines comme l'hémoglobine libre ou par des radicaux dérivé de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$). Sa capture par les ROS peut déclencher la formation des autres radicaux nitrooxygénés très réactives et agressives augmentant le stress oxydant et nitrosatif (Chapitre III). L'altération de la biodisponibilité du NO (soit par une réduction de sa production soit par une augmentation de sa dégradation) est la cause majeure du dysfonctionnement vasculaire compte tenu de ses implications diverses dans les fonctions régulatrices de l'endothélium et dans le maintien de l'homéostasie et de la protection vasculaire.

I.6 Le dysfonctionnement endothélial

La dysfonction endothéliale est définie comme l'altération de la régulation et du fonctionnement endothélial contribuant à l'apparition de certaines pathologies. La plupart des maladies cardiovasculaires comme le diabète, l'hypertension artérielle, l'obésité et la drépanocytose sont corrélées à une dysfonction du métabolisme du NO et de la voie de eNOS (Poredoš, 2002). Des facteurs environnementaux et comportementaux comme une mauvaise alimentation, l'inactivité physique, le tabagisme ainsi que l'âge sont des facteurs de risque de développement d'altérations et des pathologies vasculaires. Cette dysfonction endothéliale se traduit par un déséquilibre dans la production des facteurs vasodilateurs ou vasoconstricteurs, dans la synthèse des facteurs pro-coagulants et pro-inflammatoire, de l'adhérence vasculaire et de l'agrégation plaquettaire, par une perte de la perméabilité endothéliale, mais également par des modifications structurelles comme la prolifération des cellules musculaires lisses et le développement des thromboses (Figure 15).

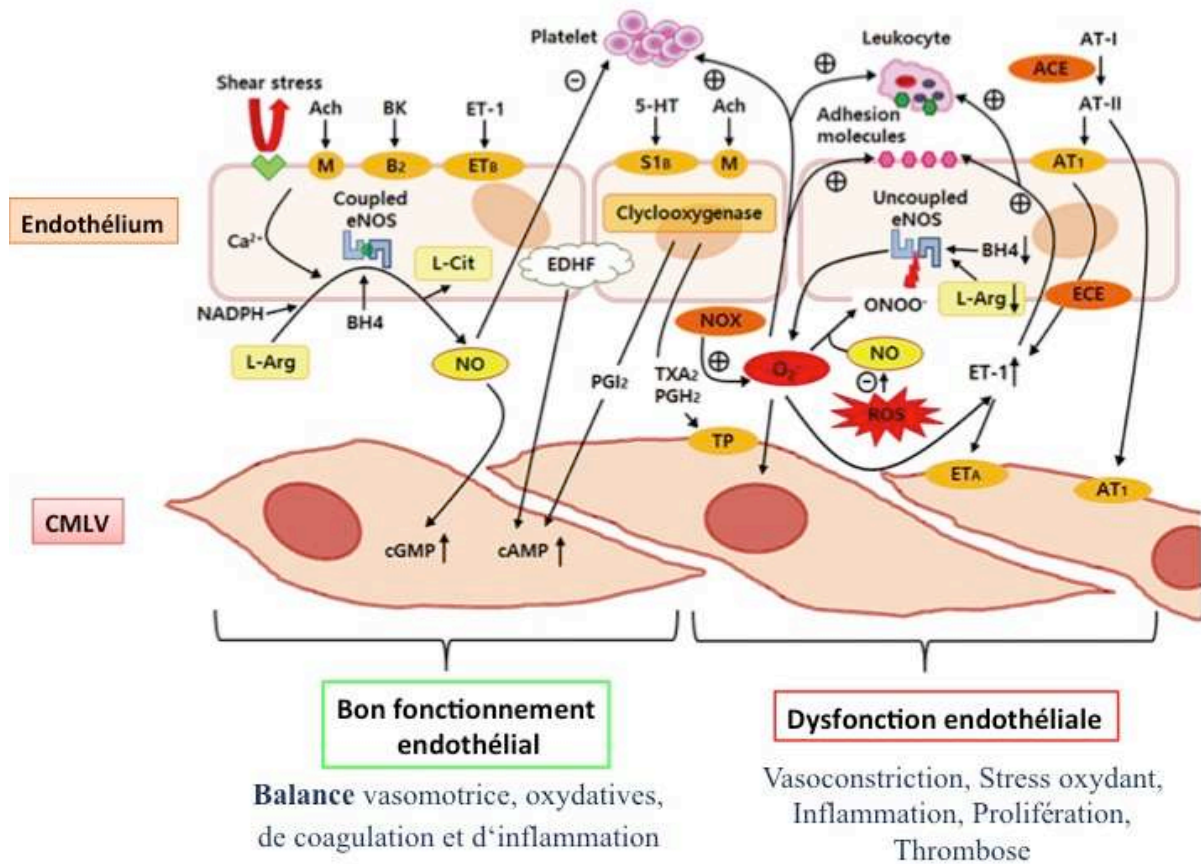


Figure 15. La dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale causée par l'altération de la biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO), l'augmentation du stress oxydant et l'inflammation. D'après (Park, K. H. & Park, 2015).

A gauche « homéostasie vasculaire », le NO est généré par la eNOS en réponse aux *contraintes de cisaillement* ou aux autres médiateurs et réalise son rôle de vasodilatateur et protecteur vasculaire.

A droite, « dysfonction endothéliale », l'implication du stress oxydant dans la perturbation du métabolisme de NO. La dégradation / ou l'augmentation de la capture précoce du NO ou l'altération de l'expression / ou de l'activité / ou un découplage de la eNOS provoquent une baisse de la production du NO et une augmentation de la production des vasoconstricteurs entraînant un déséquilibre de la balance du tonus vasculaire en faveur des facteurs vasoconstricteurs. Par ailleurs, la eNOS découplé est capable de produire de l'anion superoxyde, majorant ainsi le stress oxydant.

La capacité vasomotrice du réseau vasculaire joue un rôle primordial dans la régulation du débit sanguin en contrôlant les résistances vasculaires. La coordination et l'interaction entre les facteurs rhéologiques du sang et les facteurs vasculaires sont essentiels pour un bon

fonctionnement du système cardiovasculaire. Une dysfonction endothéliale entraîne un dysfonctionnement vasculaire ce qui diminue la perfusion tissulaire favorisant le développement des maladies cardiovasculaires. L'affection du système cardiovasculaire est en lien direct avec le fonctionnement des autres systèmes humains.

La Drépanocytose a été longtemps considérée strictement comme une maladie rhéologique du sang. Au cours de la dernière décennie, plusieurs équipes de recherches ont démontré que la perturbation du métabolisme du NO est un mécanisme physiopathologique important de la Drépanocytose (Mack & Kato, 2006).

II. LA DREPANOCYTOSE : UNE PATHOLOGIE COMPLEXE

DREPANOCYTOSE : GENERALITES

La Drépanocytose, également appelée hémoglobinoïse S, sicklémie ou anémie à cellules falciformes est une maladie génétique qui affecte l'hémoglobine des globules rouges. Une mutation ponctuelle conduit à la synthèse d'une hémoglobine anormale, nommée l'hémoglobine S (HbS). L'HbS désoxygénée polymérise provoquant ainsi la déformation des globules rouges en forme de faucille, phénomène appelé la falciformation, conduisant à de nombreuses altérations circulatoires et tissulaires aiguës et chroniques (*grec δρέπανον* (faucille) κύτος (cellule)).

II.1 Découverte et rapide historique de cette pathologie

Cette histoire fait partie de celles qui n'ont évidemment pas de fin, mais aussi pas de commencement.

Il s'agit d'une présentation des points forts de l'histoire de cette pathologie mais c'est seulement l'une des briques d'un grand mur. L'activité de plusieurs chercheurs, leur passion et leurs collaborations, nous permettent d'arriver aux connaissances de nos jours.

La Drépanocytose « une maladie des tropiques »

Les tribus d'Afrique de l'Ouest la désignent sous des noms spécifiques dont certaines appellations font écho aux cris des malades lors des crises douloureuses. La tribu Ga l'a nommée *chwecheechwe*, la tribu Twi : *ahututuo*, la tribu Ewe : *nuidudui* et la tribu Fante : *nwiwii* (Konotey-Ahulu, 1968). La Drépanocytose est connue certainement depuis des

générations dans les régions africaines mais ce n'est que vers la fin du XIX siècle qu'elle y a été évoquée dans des écrits identifiés.



Figure 16. James Africanus
Beale Horton (1835 - 1883)

James A.B. Horton, un chirurgien et soldat nigérien a publié en 1874 son travail, intitulé « *the diseases of tropical climates and their treatment* », sur les maladies tropicales (Horton, 1874). Il est un des premiers qui prenait note de la survenue des crises douloureuses et des anomalies sanguines récurrentes pendant la saison des pluies.

Quelques années plus tard en 1889, l'hématologue français Georges Hayem observe en Afrique sous microscope des globules rouges en forme de « demi-lune » et conclut faussement qu'il s'agit d'une variation structurelle normale des globules rouges (Hayem, 1889).

La Drépanocytose « une maladie des globules rouges falciformés »

La première véritable description de la Drépanocytose date de 1904. Elle a été faite par le cardiologue James B. Herrick (1861-1954) à Chicago. Un jeune étudiant, Walter Clement Noel, provenant de Grenade était hospitalisé pour vertiges, toux, fièvre, anémie et des palpitations et essoufflement répétitifs. L'examen sanguin, analysé par le collègue de Dr. Herrick, Ernst Irons, montrait des hématies inhabituelles en forme de faucille. Noel s'est senti mieux après un mois d'hospitalisation et a continué ses études. Il est décédé de pneumonie (*aujourd'hui connue comme syndrome thoracique aigu*) à l'âge de 32 ans, à Grenade.

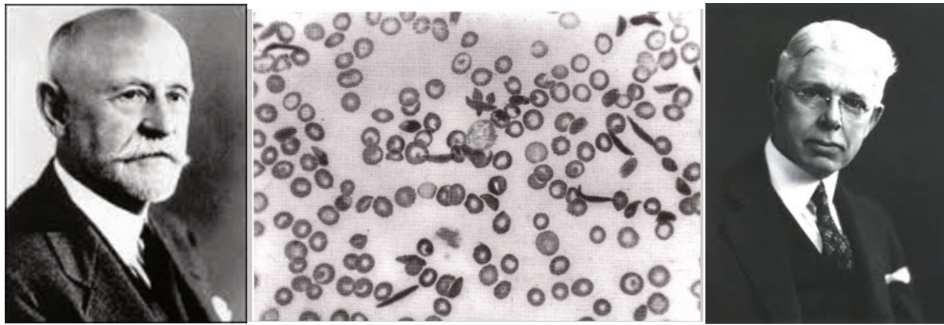


Figure 17. La Drépanocytose, une maladie des globules rouges falciformés

James Herrick (à gauche) & Ernst Irons (à droite) et le frottis sanguin de Walter Noel montrant des globules rouges normaux et en forme de faucille. D'après Herrick, 1910 (Herrick, 2001).

Trois mois plus tard, suite à la publication de Herrick (Herrick, 1910), s'est présenté en Virginie le deuxième cas décrit par Washburn, 1911 (Serjeant, 2001) : Ellen Anthony souffrant d'une douleur abdominale sévère.

Le troisième cas, une jeune femme africaine de 25 ans, hospitalisée à Washington pour un ulcère de jambes, a attiré l'attention de Victor Emmel (Emmel, 1917) : trois enfants de la famille sont décédés d'anémie. Le frottis sanguin de son père (asymptomatique) et d'elle-même n'ont pas montré d'anomalies. Cependant quelques jours plus tard se sont formées des cellules en forme de faucille. Emmel fut le premier à avoir suggéré un lien héréditaire et à avoir introduit *le test de falciformation*.

La description du quatrième cas a conduit à l'introduction du terme « *sickle cell anemia* » utilisé pour désigner l'ensemble des symptômes, l'anémie et la présence des globules rouges en forme de croissants (Mason, 1922).

La Drépanocytose « une hémoglobinopathie récessive »

Hahn & Gillespie (1927) (Hahn & Gillespie, 1927) ont démontré que les globules rouges se déforment lorsque la pression partielle en oxygène baisse en dessous de 45mm/Hg et que ce phénomène est réversible lors de la reoxygénation. Cependant les cellules fantômes dépourvues d'hémoglobine n'ont pas changé de forme soulignant l'implication de l'hémoglobine dans la déformation des globules rouges.

Diggs a donné une première explication des manifestations cliniques : *« une explication possible de l'engorgement capillaire est que les cellules allongées et pointues s'emboîtent et passent plus difficilement les obstacles que les cellules normales »* (Diggs et al, 1933). Ils furent les premiers à différencier les cas symptomatiques des cas asymptomatiques, appelés *« sickle cell trait »*.

Après avoir étudié 42 familles, Neel a proposé que la transmission de la maladie suit un mode mendélien récessif : les individus hétérozygotes ne présentent généralement pas de manifestation clinique de la maladie (*les connaissances d'aujourd'hui permettent de dire que ce n'est pas toujours le cas*) alors que les homozygotes développent les symptômes (Neel, 1949).

Linus Pauling et ses collaborateurs ont observé par électrophorèse la migration anormale de l'hémoglobine (Figure 18), qu'ils ont nommé *hémoglobine S* (*S, sickle hemoglobin*). Il confirme l'hypothèse de Neel en démontrant que les globules rouges des porteurs du trait drépanocytaire contiennent de l'hémoglobine S et de l'hémoglobine A (hémoglobine normale).

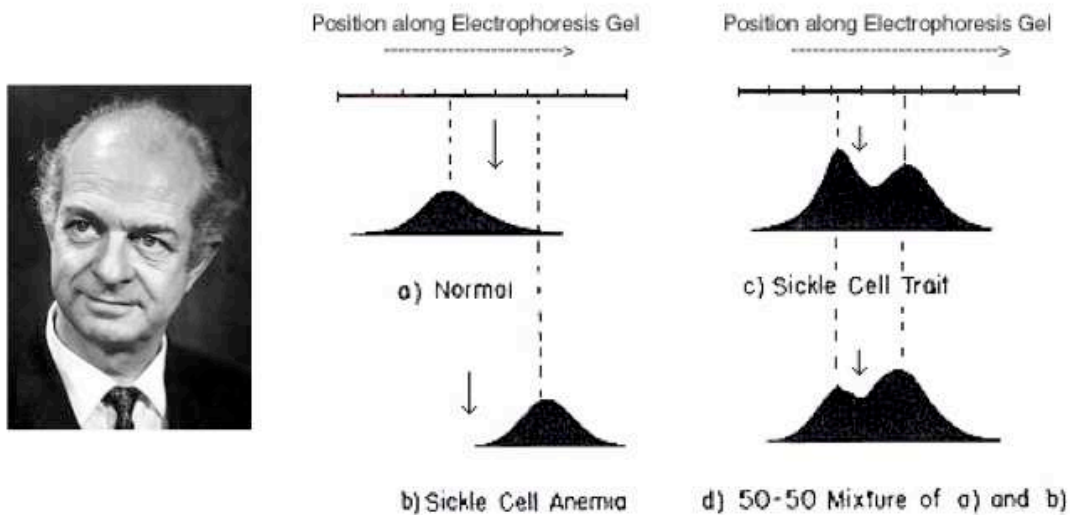


Figure 18. Linus Pauling et la migration anormale de l'HbS (Pauling *et al*, 1949)

La Drépanocytose « une maladie moléculaire monogénique autosomique récessive »

La formation de l'hémoglobine S résulte d'une mutation ponctuelle au niveau du sixième codon du gène codant pour la chaîne β globine, situé sur le chromosome 11, dans laquelle la base nucléique adénine est remplacée par la thymine ce qui entraîne le remplacement de l'acide aminé glutamique par la valine (Figure 19) (Ingram, 1957). Cette dernière est caractérisée par une faible charge positive et une faible solubilité. Les travaux d'Ingram montrent que la Drépanocytose est la première maladie génétique dont le défaut moléculaire a été identifier.

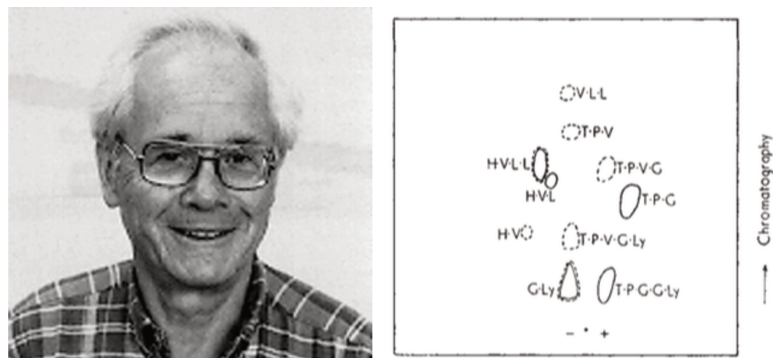


Figure 19. « Finger prints » découvert par Ingram, 1957

Migrations des extractions peptidiques « finger prints » de l'hémoglobine A (*ligne entière*) et de l'HbS (*ligne hachurée*) avec threonyl-prolyl-glutamyl-glutamyl-lysine 5 pour l'HbA et threonyl-prolyl-valyl-glutamyl-lysine pour l'HbS (Ingram, 1957).

Les technologies de ces jours permettent de comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de cette maladie et de développer des nouvelles thérapies.

II.2 Apparition et Répartition géographique

1. Haplotypes de la mutation β^S

La drépanocytose concerne plus de 50 millions de personnes à l'échelle du globe. C'est la maladie génétique la plus répandue dans le monde. Elle touche plus particulièrement les populations originaires d'Afrique équatoriale et tropicale et celles qui en sont issues (Antilles, Etas Unis, etc.). Sa fréquence peut atteindre les 40% chez certaines populations en Afrique centrale mais elle est également fréquente en Inde, au Moyen Orient et dans le bassin Méditerranéen. Elle est caractérisée par une grande variabilité phénotypique. Les études sur l'haplotype du gène β^S suggèrent que la mutation se développait simultanément dans cinq endroits indépendants (Figure 20). En Afrique, on peut distinguer quatre haplotypes (nommés d'après la région de découverte) : Sénégal, Benin, Bantu et Cameroun et en Asie on compte

un haplotype Arabo-Indien englobant le Pakistan et l'Iran (Kulozik *et al*, 1986; Lapoumèroulie *et al*, 1992; Nagel *et al*, 1985). Certains haplotypes comme le Bantu sont associés à des formes plus sévères alors que d'autres sont généralement plus modérés. C'est le cas de l'haplotype arabo-indien (Steinberg *et al*, 1995; Jastaniah, 2011).

Les migrations volontaires ou liées aux événements historiques (guerre, traite des esclaves etc.) ou climatiques (sécheresse, périodes glaciaires) ont fait propager cette mutation dans le monde et ont favorisé l'expansion des haplotypes.

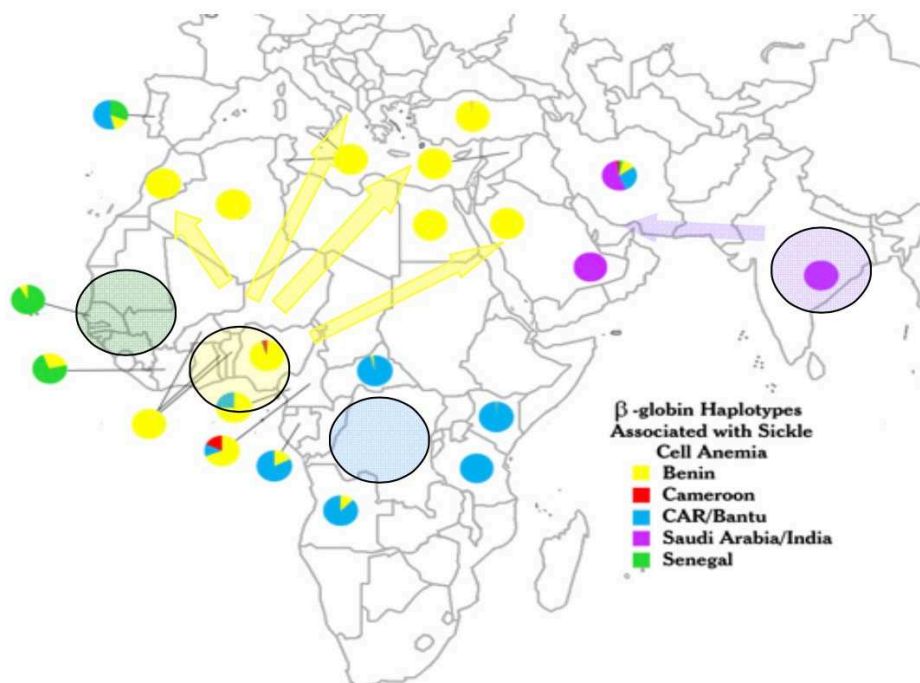


Figure 20. La distribution géographique des haplotypes

La distribution géographique des haplotypes du gène β^S , établi selon les résultats des études épidémiologiques et génétiques (Powars *et al*, 1990; Rahimi *et al*, 2003; Oner *et al*, 1992; Nagel & Ranney, 1990; Monteiro *et al*, 1989). D'après (Gabriel, A., & Przybylski, 2010). Chaque haplotype est représenté par couleur distincte

CAR, République d'Afrique Centrale

2. La mutation β^s , un avantage sélectif?

Comment un gène récessif peut atteindre une telle fréquence (60-80%) dans certaines populations africaines et est complètement absente dans autres (Allison, 1954) ? « *In other words, there must be some factor which is tending to increase the number of sickle cell genes in the population* » (Livingstone, 1957). Si la mutation n'a pas une fréquence très élevée (Vandepitte *et al*, 1955), le gène muté devrait donner un avantage sélectif aux porteurs du trait drépanocytaire (Neel, 1949). Il a été proposé dans un premier temps que cette mutation pourrait être accompagnée d'une meilleure fertilité (Foy *et al*, 1954; Allison, 1954) ou d'un taux de survie supérieur (Raper, 1949). Dans ce contexte, une superposition très forte a été observée (Haldane, 1949; Allison, 1954; Beet, 1946) entre les zones géographiques de la répartition de la drépanocytose et celle du paludisme (une infection parasitaire tropicale ou le parasite *Plasmodium Falciparum* est transmis à l'homme par les moustiques du genre Anophèle). Selon Haldane (Haldane, 1949), il s'agit d'un exemple typique de la sélection naturelle donnant à l'hémoglobine S sous sa forme hétérozygote un avantage protecteur vis à vis du paludisme et dont la sélection se fait ainsi en faveur des individus hétérozygotes qui par la suite transmettent le gène mute β^s d'une génération à l'autre. Plusieurs études longitudinales ont essayé de comprendre les mécanismes protecteurs sous-jacents. Il semblerait que la protection des porteurs du trait drépanocytaire face à la malaria *plasmodium falciparum* implique principalement deux mécanismes (Cyrklaff *et al*, 2016) :

- il apparait que la polymérisation inhibe le développement intra-érythrocytaire du parasite *Plasmodium Falciparum* (Luzzatto *et al*, 1970; Allison, 1957; Roth *et al*, 1978).
- Les érythrocytes parasités et falciformés sont reconnus et éliminés rapidement par le système immunitaire qui est plus actif chez les patients drépanocytaires (Edozien *et al*, 1962; Smith *et al*, 1988; Cabrera *et al*, 2005).

La présence de la mutation drépanocytaire β^s diminue le risque d'infection chez les patients drépanocytaires porteur du trait (AS) et les patients drépanocytaires homozygotes (SS) comparés aux sujets sains AA (Figure 21). En revanche en cas d'infection le taux de mortalité des sujets drépanocytaires homozygotes est bien supérieur à celui des sujets sains à cause du taux élevé de falciformation (Williams & Obaro, 2011) (Figure 21).

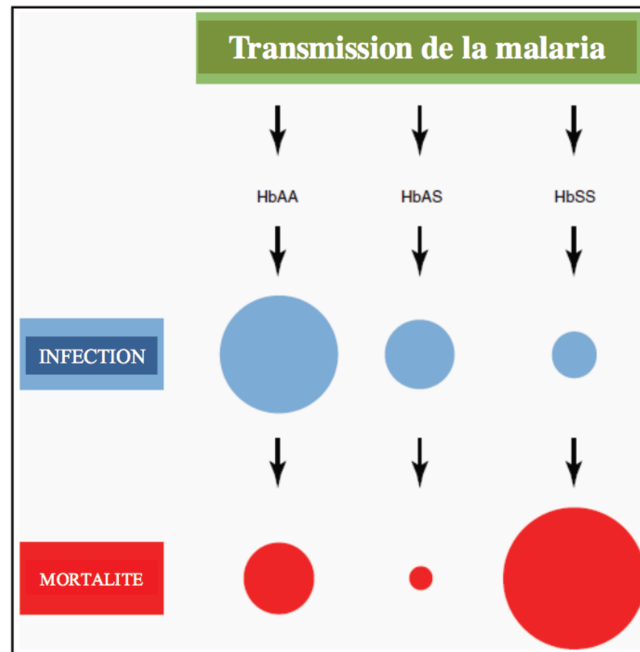


Figure 21. Risque relatif d'infection et de mortalité associés à la malaria

Risque relatif d'infection et de mortalité associés à la malaria chez les enfants africains sains (HbAA), porteurs du trait drépanocytaire (HbAS) et drépanocytaires homozygotes (HbSS).

D'après (Williams & Obaro, 2011) extrait de la thèse de Camille Faes.

3. La diversité génotypique de la drépanocytose

Les programmes de dépistage et diagnostic ont permis d'identifier des formes génétiques drépanocytaires diverses créant une maladie polymorphe avec une remarquable diversité phénotypique.

Des mutations ponctuelles du gène β peuvent toucher différents endroits conduisant à des hémoglobinopathies autres que celle liée strictement à l'HbS. Ces autres variétés du gène β

peuvent s'associer à la mutation β^S en formant des formes hétérozygotes composites. Diverses combinaisons sont possibles. Elles aboutissent à des génotypes drépanocytaires plus ou moins sévères (Hb SC, Hb SE, Hb SD_{Pujab}, Hb SO_{Arab}, etc.). L'HbS peut également s'associer à des défauts quantitatifs de synthèse de chaînes α ou β , nommé respectivement α / β thalassémie.

Le terme « syndrome drépanocytaire majeur » (SDM) a été introduit pour regrouper ces formes hétérozygotes composites et la forme homozygote. Les principaux génotypes sont la forme homozygote SS et la forme hétérozygote composite SC (les patients SC ont à la fois de l'hémoglobine S et de l'hémoglobine C).

Cette remarquable diversité génotypique aboutit à une grande variété phénotypique qui fait de la drépanocytose une pathologie extrêmement complexe et multifactorielle.

4. Dépistage ciblé de la Drépanocytose

Chaque année plus de 300.000 nouveau-nés dans le monde sont atteints de cette maladie. Dans certains pays en développement, le taux de mortalité infantile est élevé, principalement en raison d'infections, avec les conséquences de septicémie et séquestration splénique, le tableau clinique s'aggravant d'autant plus en cas de manque de prise en charge. L'amélioration de la prise en charge, la création des centres spécialisés, le dépistage prénatal et néonatal, l'antibiothérapie prophylactique et les vaccinations anti-pneumococciques réduisent significativement le taux de mortalité et de morbidité des enfants de moins de 5 ans (Conférence, 1987). La prise en charge précoce par des médecins spécialisés est essentielle dans la mesure où elle réduit l'incidence des complications graves de la petite enfance. Cependant l'insuffisante efficacité du ciblage actuellement repose sur la notion erronée que la drépanocytose ne touche que les personnes d'origine africaine ayant la peau foncée.

Dans les départements d'outre-mer, un dépistage généralisé a été mis en place progressivement dès 1985. En France hexagonale, le dépistage (introduit progressivement à

partir de 1995) concerne seulement les enfants à risque en raison de l'origine de leurs parents. Les prélèvements sanguins sont faits après la 72^{ème} heure de vie par prélèvement capillaire au talon.

5. La Drépanocytose en France et en Guadeloupe

La Drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente en France. La prévalence du type drépanocytaire varie d'un département à l'autre en fonction de la composition de la population. Aux Antilles française la population est composée de plus de 70% d'afro-caribéens comparativement à la Guyane où on retrouve principalement les groupes ethniques asiatiques, amérindiens ou sud-américains ou de la Réunion d'où les origines indiennes et européennes dominent.

Selon le rapport de l'AFDPHE (*Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant*) de 2015, 335 360 nouveau-nés ont bénéficié du dépistage de la drépanocytose (295 951 en Métropole, 39 409 en Outre Mer).

Au total 466 nouveau-nés portant un SDM ont été repérés dont :

- 387 SDM en **métropole** (281 SS, 14 Sβ⁺ ou Sβ[°] thal et 92 SC) soit une incidence de 1/ 765 des nouveau-nés testés et de 1/1969 sur l'ensemble des nouveaux-nés.
Toutefois cette prévalence est beaucoup plus importante en région parisienne (1/874) où se concentrent les populations à risque.
- 79 SDM dans les **DOM** (55 SS, 2 Sβ⁺ ou Sβ[°] thal et 22 SC) soit une incidence de 1/499.

En Guadeloupe 12% de la population porte le trait drépanocytaire (Alexendre *et al*, 1997).

Depuis 1990, la prise en charge médicale, sociale, le dépistage et la recherche sont réalisés par l'Unité Transversale de la Drépanocytose (UTD) à Pointe-à-Pitre. Environ 1500 patients sont

suivis à l'Unité Transversale de la Drépanocytose à Pointe-à-Pitre. Les principaux SDM dépistés sont les formes SS, SC S β -thalassemique et SD_{punjab}.

II.3 Physiopathologie de la Drépanocytose

1. Propriétés de l'hémoglobine S et l'hémoglobine C

a) La polymérisation de l'hémoglobine S

La mutation ponctuelle conduit à la formation d'une Hb anormale, l'HbS, et par conséquent à des changements structuraux et fonctionnels du globule rouge qui deviennent cependant visibles seulement en condition hypoxiques. La présence de la valine hydrophobe rend l'HbS plus hydrophobe que l'HbA ce qui a pour conséquence de diminuer la solubilité de l'HbS (Perutz *et al*, 1951). Les sites hydrophobes de valine sur la β -globine peuvent interagir et se lier à d'autres molécules β globine (la phénylalanine 85 et la leucine 88) entraînant la formation de longues chaînes de polymères, appelé **polymérisation** (Figure 22). 14 polymères peuvent s'assembler (Eaton & Hofrichter, 1987) pour former une hélice de 20-22mm de diamètre (Crepeau *et al*, 1978) (Figure 22). Une seule sous-unité de β globine est impliquée dans la formation du contact entre les différentes molécules au niveau de la poche hydrophobe qui n'est apparente que dans certaines conditions (Figure 22).

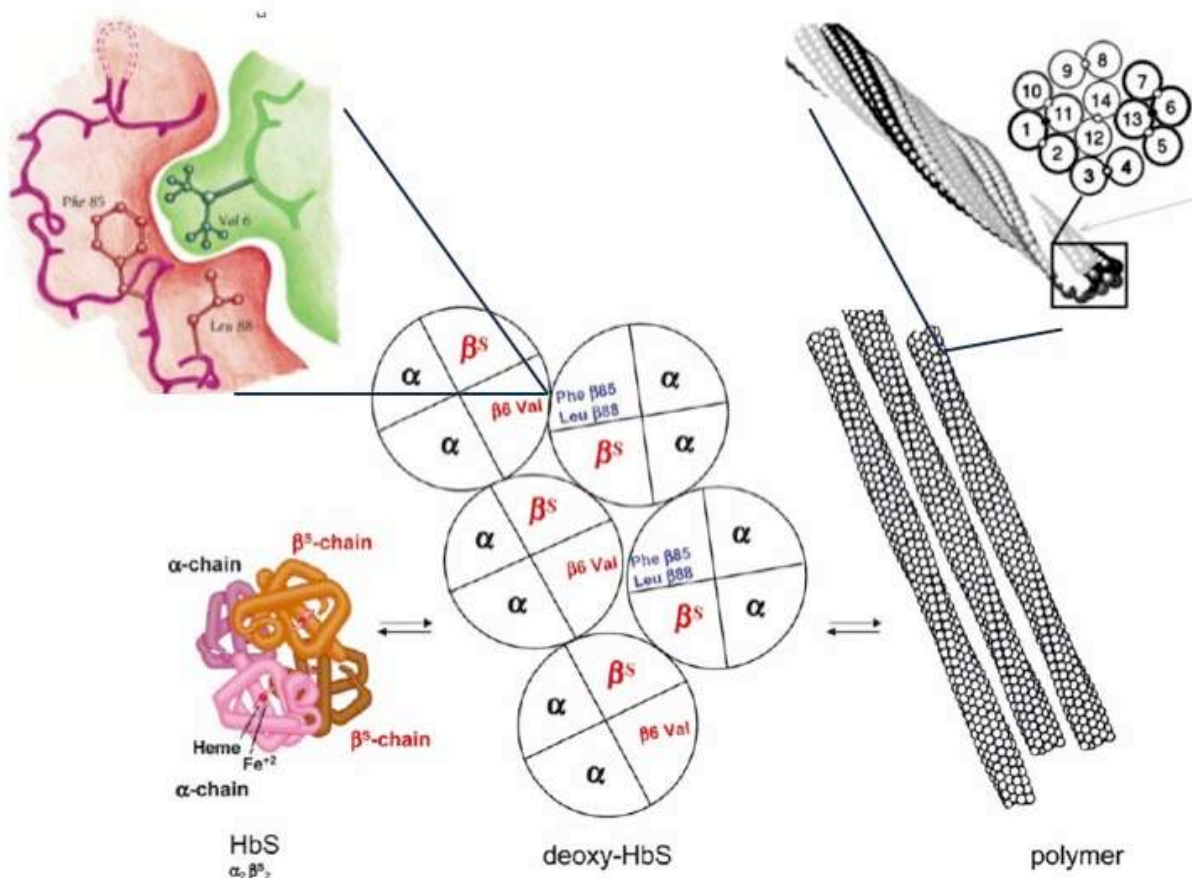


Figure 22. La polymérisation de l'HbS

Elle joue un rôle initial dans les mécanismes physiopathologiques de la Drépanocytose.

La polymérisation se réalise en condition de désoxygénation (Hahn & Gillespie, 1927; Lange *et al*, 1951). Le stress, une diminution du potentiel hydrogène (pH) (Hahn & Gillespie, 1927; Lange *et al*, 1951; Greenberg *et al*, 1957), une déshydratation associée à l'acidification, et l'activation du cotransport membranaire de potassium (K^+) chloride (Cl^-) faisant suite à l'oxydation de groupes sulfhydriles et liée aux effets de l'HbS (Brugnara *et al*, 1989), ou une augmentation de la température (Sydenstricker *et al*, 1923), ou des concentrations élevées en Ca^{2+} et en cations de magnésium (Gibson *et al*, 1998) peuvent favoriser la désoxygénation et ainsi la formation des polymères.

La cinétique de la polymérisation est marquée par un certain délai. En effet, il existe un temps de latence entre le moment où l'HbS est désoxygénée et la formation des fibres (Ferrone *et al*, 1985; Christoph *et al*, 2005). Un nombre critique de molécules doit être assemblé pour que le

processus s'initie (nucléation homogène), ensuite à partir de ces premières formations, la fibre peut s'allonger et la formation de fibres secondaires sur la fibre préexistante se réalise (nucléation hétérogène) (Ferrone *et al*, 1985, 2002). Ce délai dépend de la quantité d'HbS intracellulaire (Cao & Ferrone, 1996; Hofrichter, 1986), de la saturation partielle en oxygène (Eaton & Hofrichter, 1987), du pH, de la température et du contenu en HbF (Goldberg, 1977).

b) De la polymérisation à la falciformation

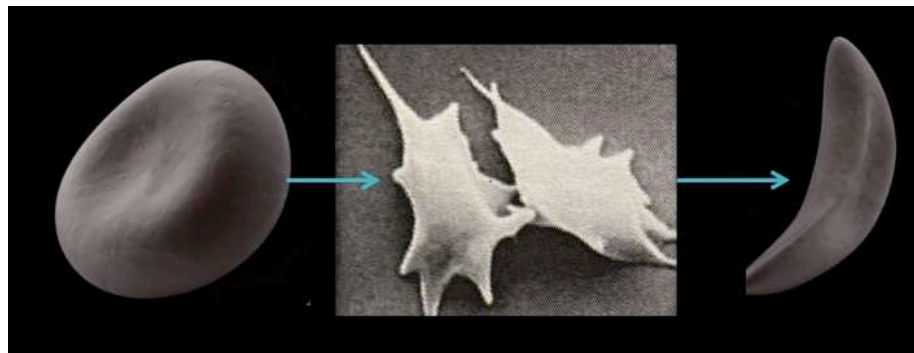


Figure 23. De l'érythrocyte au drépanocyte

La polymérisation de l'HbS provoque des changements structuraux et fonctionnels du globule rouge avec des conséquences directes sur les propriétés érythrocytaires (déformabilité, affinité en oxygène) et vasculaires (contrainte de cisaillement, activation endothéliale).

La formation des polymères à l'intérieur des globules rouges provoque un étirement de la membrane érythrocytaire conduisant à la déformation érythrocytaire typique en forme de faucille. La formation du drépanocyte est appelée **falciformation**.

La polymérisation et la falciformation sont des processus réversibles, quand les conditions redeviennent favorables (reoxygénation). Cependant après plusieurs cycles de polymérisation/dépolymérisation, les fibres de l'HbS ne peuvent plus se dépolymériser formant des globules rouges irréversiblement falciformés (Bertles & Döbler, 1969; Lux *et al*, 1976). La répétition des cycles polymérisation-falciformation / dépolymérisation-

défauciformation provoque de nombreux dommages irréversibles au niveau de la membrane érythrocytaire et affecte la structure du cytosquelette et sa composition (Lux *et al*, 1976). La formation des polymères provoque une perte de la symétrie des phospholipides membranaires avec externalisation des phospholipides de la face interne (Lubin *et al*, 1981) activant la phagocytose par les macrophages et donnant un potentiel pro-adhésif et pro-coagulant aux érythrocytes. La genèse endogène des espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde, radical hydroxyle ou peroxyde d'hydrogène) conduit à des altérations métaboliques et membranaires (Rank *et al*, 1985). Par ailleurs la perméabilité aux cations augmente anormalement via une activation du co-transport membranaire des ions K^+ et Cl^- et l'ouverture du canal Gardos qui est activé par le calcium (Eaton *et al*, 1973)) et participe à la déshydratation érythrocytaire (Glader & Nathan, 1978) suivies d'une augmentation de la concentration en HbS intracellulaire et ainsi du taux de polymérisation de l'HbS.

Les globules rouges deviennent plus rigides et ils perdent leur capacité à se déformer limitant la perfusion sanguine et l'oxygénation tissulaire (Palek *et al*, 1977). La déformabilité des GRs à l'état oxygéné est déjà très réduite (stress oxydant accru et altération de la biodisponibilité en NO) mais elle diminue dramatiquement en condition désoxygénée (Ballas & Mohandas, 2004). Une réduction de seulement 15% de la déformabilité érythrocytaire conduit à une augmentation de la résistance vasculaire de plus de 75% (Baskurt *et al*, 2004a). La perte de la déformabilité érythrocytaire augmente également la contrainte de cisaillement contre la paroi endothéliale favorisant le développement de sa dysfonction (surexpression des molécules d'adhérence, augmentation du stress oxydant). Le changement de configuration répété rend les érythrocytes plus fragiles conduisant à une destruction prématurée (hémolyse) (Embury, 1986; Conran *et al*, 2009). Leur durée de vie est plus courte : 15 jours (McCurdy & Sherman, 1978) contre 120 jours pour un GR normal contenant de l'hémoglobine A (Wood *et al*, 2008).

La falciformation entraîne également une rigidification érythrocytaire responsable des occlusions au niveau de la microcirculation (Ballas & Mohandas, 2004; Marossy *et al*, 2009) favorisant ainsi la survenue d'occlusions vasculaires et de phénomènes ischémiques.

c) Les propriétés de l'hémoglobine C (HbC)

Les globules rouges des patients SC contiennent de l'HbC et HbS. La formation d'HbC résulte de la substitution de l'acide glutamique par la lysine à la position 6 de la sous-unité β -globine. L'hémoglobine C ne polymérise pas. Une des particularités de l'hémoglobine C est sa capacité à former des cristaux tetragonaux intra-érythrocytaires

(Figure 24) conduisant à une augmentation de la densité du globule rouge et de la déshydratation de celui-ci (Serjeant, 2001; Mitton, 2014).

Ces phénomènes favorisent la polymérisation de l'HbS. Les mécanismes sous-jacents de la cristallisation ne sont pas encore bien connus.

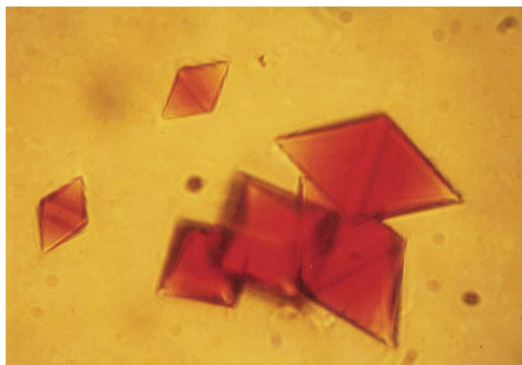


Figure 24. Cristallisation de l'HbC. (Nagel *et al*, 2003)

Les patients SC ont un profil clinique généralement plus modérés (hémolyse et survenue des crises vaso-occlusive (CVO) moins fréquents) que les sujets homozygotes SS. Les complications cliniques majeures plus fréquentes dans cette population sont l'ostéonécrose (Lionnet *et al*, 2012), les troubles otologiques et les rétinopathies prolifératives (Lemaire *et al*, 2013) et sont en particulier dues à une viscosité sanguine plus élevée comparativement aux sujets sains et aux patients drépanocytaires SS (Tripette *et al*, 2009). La durée de vie moyenne

des érythrocytes contenant l'HbSC est de 28,9 jours contre 15 jours pour les érythrocytes homozygotes HbS (McCurdy & Sherman, 1978). En outre, une falciformation irréversible des érythrocytes HbSC est moins fréquente que pour les érythrocytes HbSS. En revanche les globules rouges SC ont un volume globulaire moyen diminué et une concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine plus importante que les globules rouges SS ou normaux en raison de la déshydratation cellulaire chronique causée par l'activation du co-transporteur K^+-Cl^- (Nagel *et al*, 2003).

II.4 La drépanocytose, une hémoglobinopathie aux complications multiples

1. La drépanocytose, une pathologie multifactorielle

Dans le modèle classique, les processus de la désoxygénation-polymérisation-falciformation sont définis comme des événements clés des occlusions vasculaires. Cependant le modèle classique est insuffisant pour expliquer

- la variabilité de l'expression clinique d'un patient à l'autre, dans le temps mais aussi entre les génotypes (Stuart & Nagel, 2004).
- l'apparition des phénomènes vaso-occlusifs car le délai de polymérisation de l'HbS en condition désoxygénée est supérieur au temps de transit érythrocytaire dans la microcirculation (Hofrichter, 1976; Eaton & Hofrichter, 1987; Kaul & Fabry, 2004).

Ainsi pour que la polymérisation de l'HbS soit possible, il faut l'intervention d'autres facteurs contribuant au ralentissement circulatoire.

a) La crise vaso-occlusive

L'occurrence périodique d'épisodes vaso-occlusifs aigus et douloureux est la caractéristique clinique majeur de la drépanocytose. Il s'agit d'une obstruction vasculaire, en particulier au niveau des veinules post-capillaires, provoquée par les GRs falciformés conduisant à l'hypoxie et aux dommages tissulaires responsables d'épisodes très douloureux, appelés crises vaso-occlusives. L'intensité, la durée (pendant des heures, jours, rarement des semaines) et la fréquence des crises sont un indice de la sévérité de la maladie. Les CVOs peuvent survenir dans tous les lits vasculaires de l'enfance jusqu'à l'âge adulte.

De multiples facteurs sont impliqués dans le ralentissement sanguin et ainsi le temps de transit des globules rouges dans la microcirculation (Hebbel, 1991; Embury *et al*, 2004). Les facteurs de risque impliqués dans le ralentissement du flux sanguin et le développement des occlusions vasculaires sont l'altération des propriétés rhéologiques des GRs (particulièrement une faible déformabilité des GRs et une viscosité sanguine élevée) (Ballas & Mohandas, 2004; Tripette *et al*, 2009), l'inflammation et l'activation endothéliale favorisant les interactions entre les cellules circulantes et l'endothélium (Switzer *et al*, 2006) (Figure 25).

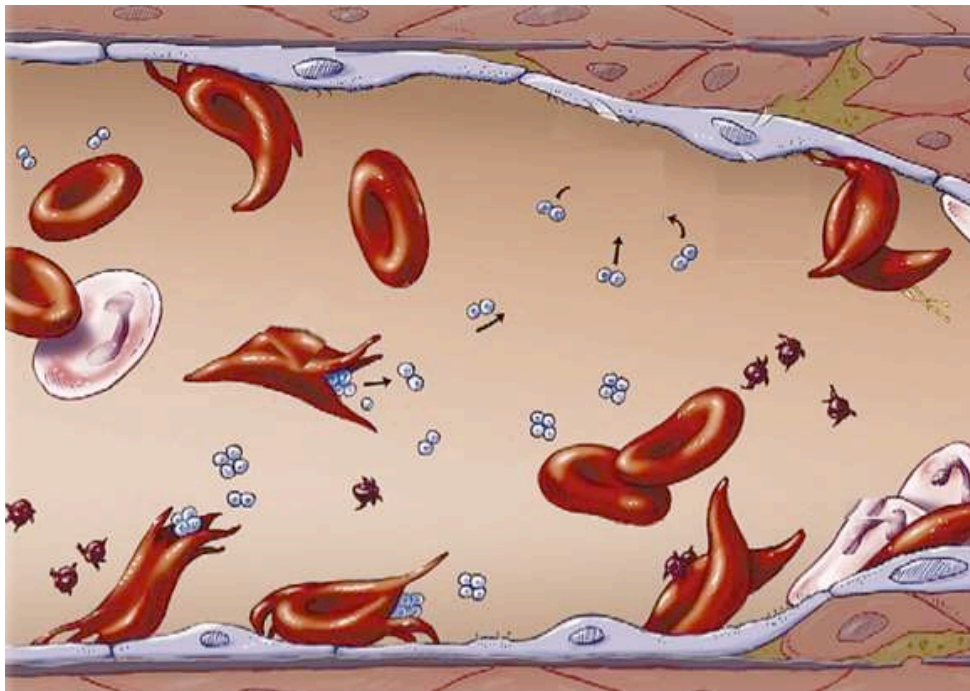


Figure 25. Mécanismes impliqués dans le développement des occlusions vasculaires

Adapté d'après (Switzer *et al*, 2006).

La présence des GRs très adhésifs et denses peuvent augmenter la viscosité sanguine (Chien *et al*, 1970) et bloquer les vaisseaux de faible diamètre. Les capillaires et veinules postcapillaires font partie des principaux sites d'occlusion vasculaires dans la drépanocytose (Kaul *et al*, 2009). Les faibles vitesses de cisaillement au niveau de ces sites associés à une viscosité augmentée (Chien *et al*, 1970) ralentissent dramatiquement le flux sanguin et favorisent l'agrégation érythrocytaire (Barabino *et al*, 2010). L'accumulation des GRs denses falciformés obstrue la microcirculation causant l'occlusion vasculaire. Dans les gros vaisseaux les zones d'agrégation et d'accumulation cellulaire vont induire la formation des zones de sténose avec augmentation du temps de transit des GRs ce qui va augmenter le risque d'adhésion et de falciformation des GRs. A la sortie de cette zone de sténose, le flux devient turbulent causant des dommages endothéliaux tels que l'activation endothéliale ou la génération des espèces réactives de l'oxygène. Les zones de sténoses semblent être impliquer dans le développement d'accident vasculaire cérébral (Adams *et al*, 1998).

b) L'hémolyse

L'hémolyse intravasculaire décrit la lyse précoce des GRs dans la lumière vasculaire qui a pour conséquence de réduire le taux de globules rouges et de libérer l'hémoglobine dans le plasma. Cette lyse est liée aux altérations membranaires fragilisant l'érythrocyte. Dans la

Drépanocytose, l'hémolyse joue un rôle important dans la diminution de la biodisponibilité en NO (Reiter & Gladwin, 2003; Morris *et al*, 2005b; Gladwin *et al*, 2003) probablement responsable de la dysfonction endothéliale et la perte de la réactivité vasculaire (Kato *et al*, 2007; Morris, 2008; Teixeira *et al*, 2017; Kato *et al*, 2017). Elle sera également responsable de l'anémie sévère et on parle aussi de l'anémie hémolytique. L'hémolyse extravasculaire est un processus naturel d'élimination des GRs défectueux ou des drépanocytes denses, déshydratés et irréversiblement falciformés par la phagocytose. Une élimination importante peut éventuellement provoquer des complications telles que des séquestrations spléniques (Pearson *et al*, 1969).

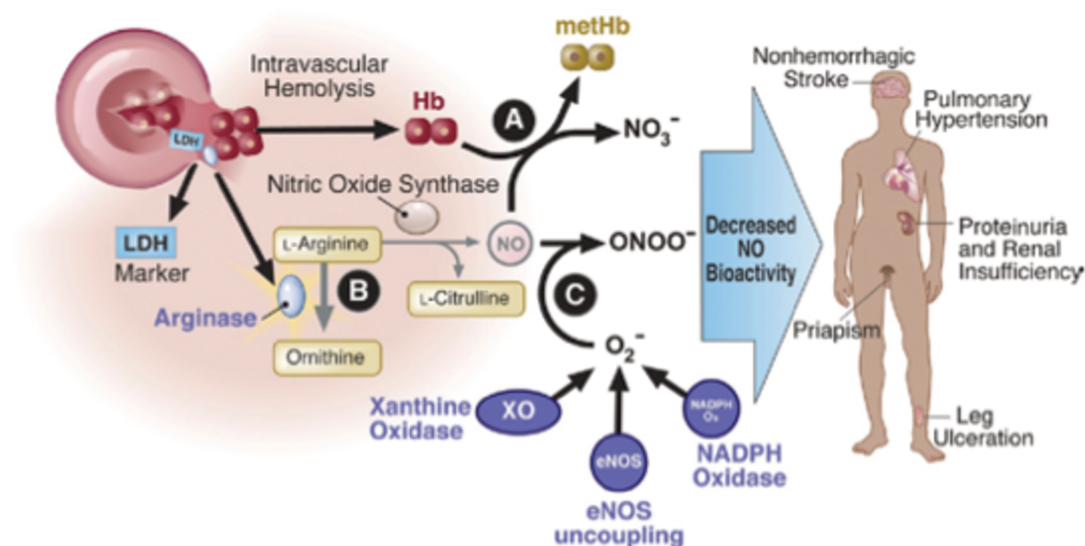


Figure 26. L'hémolyse intravasculaire

L'hémolyse intravasculaire et les mécanismes impliqués dans la diminution de la biodisponibilité en NO avec les complications associées. D'après (Kato *et al*, 2007).

Hb, hémoglobine ; LDH, lactate déshydrogénase ; metHb, méthémoglobine ; NO, monoxyde d'azote ; NO_3^- , nitrate ; $\text{O}_2^{\cdot -}$, anion superoxyde ; ONOO^- , peroxynitrite.

Au cours de l'hémolyse l'enzyme arginase est libérée dans le plasma. Cette enzyme utilise le substrat nécessaire à la formation du monoxyde d'azote, la L-arginine, pour la transformer en ornithine et urée (Morris *et al*, 2005b) (Figure 26). L'activité de l'arginase est corrélée au taux de lactate déshydrogénase (LDH) et d'hémoglobine plasmatique (Morris *et al*, 2005b) et est

ainsi considérée comme un marqueur classique de l'hémolyse. La lactate déshydrogénase est un marqueur hémolytique indirect. Il est cependant souvent utilisé comme marqueur hémolytique majeur dans le cadre de la drépanocytose car l'essentiel de la LDH plasmatique provient de la lyse des globules rouges (Kato *et al*, 2013). Le taux d'hémolyse est également estimé par le taux de bilirubine et de l'aspartate aminotransférase (AST). L'AST est une transaminase qui intervient dans la néoglucogénèse. Elle est présente en quantité importante dans les globules rouges. Ainsi un taux élevé d'AST plasmatique est supposé être représentatif d'une destruction érythrocytaire précoce.

La durée de vie des globules rouges dans le cadre de la drépanocytose est plus courte. Le renouvellement érythrocytaire continu se traduit par un taux de réticulocytes plus élevé. Ainsi le pourcentage de réticulocytes (Hebbel, 2011) est également utilisé comme un marqueur d'hémolyse. L'indice hémolytique est un indicateur proposé par Nourraie (Nourraie *et al*, 2013). Il est calculé par une analyse en composante principale incluant 4 paramètres hémolytiques : la LDH, l'AST, la bilirubine et le pourcentage de réticulocytes.

D'autre part, la lyse des globules rouges conduit à la libération de l'hémoglobine dans le plasma qui consomme rapidement le NO en produisant de la méthémoglobine et du nitrate (NO_3^-) (Reiter *et al*, 2002; Belcher *et al*, 2010) (Figure 26). Cela se traduit par une réduction dramatique du NO circulant limitant ainsi les capacités vasculaires vasodilatrices et conduisant à l'augmentation du stress oxydant comme nous le verrons dans le chapitre III. Les espèces réactives de l'oxygène agissent directement sur le NO libre et le rendent inactif en formant d'autres radicaux. L'anion superoxyde réagit avec le NO pour former le peroxynitrite (ONOO^-).

Par conséquent, la eNOS est découplée et impliquée dans la formation des radicaux notamment aussi le peroxynitrite (Morris *et al*, 2005b), capable d'inhiber le BH_4 (Wood *et al*, 2006; Cosentino & Katusiá, 1995) qui est nécessaire pour l'activation de la eNOS. Le découplage de la eNOS s'amplifie créant un cercle vicieux.

Cette réduction de NO entraîne un dysfonctionnement endothélial avec l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérences vasculaires telles que VCAM-1 et la E-sélectine, et l'augmentation d'endothéline 1 produit (Rother *et al*, 2005). La perte de la vasomotricité réduit la capacité vasculaire à s'adapter aux perturbations du flux sanguin contribuant au ralentissement du flux local et à l'augmentation du temps de transit ce qui favorise les processus de la polymérisation et falciformation. Il apparaît que l'hémolyse et ses conséquences sur la biologie du NO sont à l'origine du développement d'une vasculopathie chronique chez les patients drépanocytaires touchant à la fois la microcirculation et les gros vaisseaux artériels (Connes *et al*, 2013b; Kato *et al*, 2017; Gladwin & Vichinsky, 2008). L'hémolyse chronique associée à l'anémie sévère est généralement plus marquée chez les patients SS que SC et souvent encore plus accentué lors des CVOs (Ballas & Marcolina, 2006). En revanche, la présence de l' α -thalassémie diminue la sévérité de l'hémolyse, de l'anémie et des complications associées (Embury *et al*, 1984).

Le renouvellement continu d'érythrocytes et proportionnel au taux des GRs détruits consomme beaucoup d'énergie et augmente le métabolisme de base (Buchowski *et al*, 2001, 2002b).

c) L'inflammation

Les périodes d'ischémie et de reperfusion, les altérations hémorhéologiques et endothéliales, la perte de vasomotricité, l'augmentation de la contrainte de cisaillement et la récurrence des CVOs créent un état d'inflammation chronique (Solovey *et al*, 1997). L'inflammation augmente les interactions adhésives entre endothélium-érythrocyte-leucocyte particulièrement dans les veinules post-capillaires en raison de l'état activé de ces cellules. Les cytokines pro-inflammatoires activent l'expression des diverses molécules d'adhérence sur la membrane érythrocytaire, leucocytaire et l'endothélium (Figure 27).

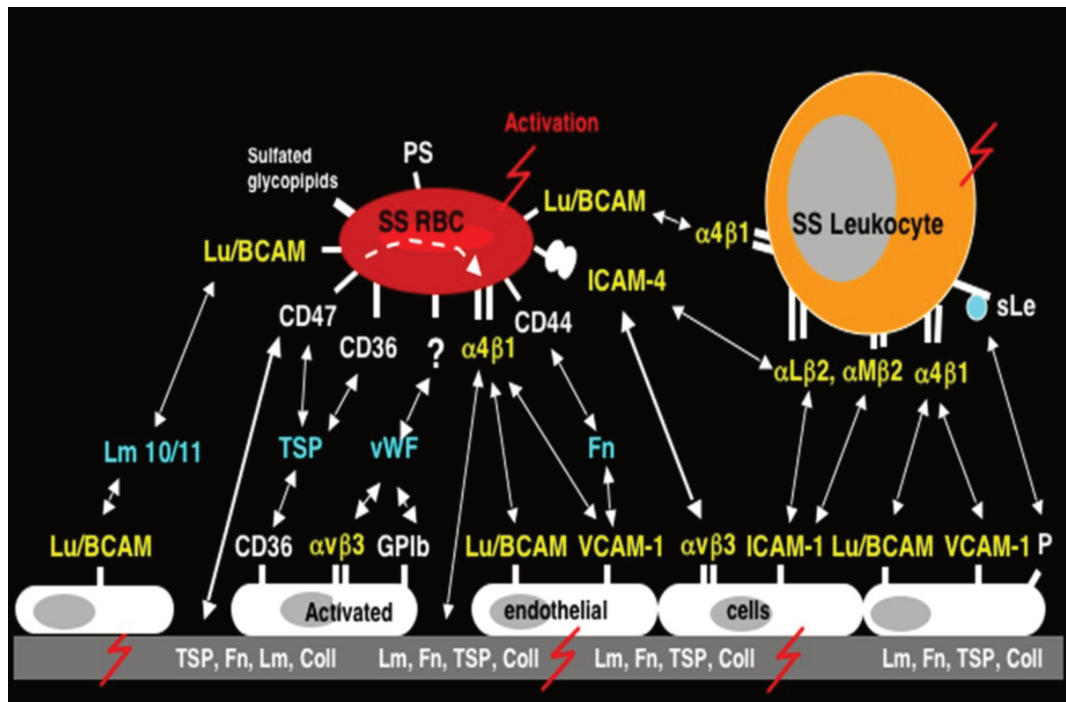


Figure 27. L'inflammation et l'adhérence dans la drépanocytose

D'après Cartron & Elion, projet SCADHESION

Interactions multiples indirectes et directes entre les cellules circulantes activées et les cellules endothéliales. Les molécules d'adhérence vasculaire se divisent en deux grandes familles : les sélectines (exprimées sur les leucocytes, L- sélectine ; les plaquettes, P- sélectine et l'endothélium vasculaire, E- et P- sélectine) et la famille des super immunoglobulines, qui sont exprimées à la surface d'endothélium vasculaire activé. Ces molécules peuvent interagir avec les intégrines exprimées à la surface des cellules adhérentes (Shephard *et al*, 2000).

D'abord on remarque un roulement des molécules circulantes au niveau de la paroi vasculaire via les sélectines et ensuite une adhérence ferme de celles-ci via les superIg (immunoglobulines) de la famille des CAMs *Cell Adhesion Molecule* (Figure 27 / 28). Cette adhérence initie la sécrétion des cytokines (IL-1 β , IL-8, TNF- α) qui vont activer l'endothélium vasculaire en créant un état d'inflammation et une surexpression des molécules d'adhérence vasculaire telles que P-sélectine, ICAM-1, VCAM-1 (Luster, 1998).

Les acteurs de l'adhérence cellulaire jouent un rôle dans l'initiation des occlusions vasculaires (Frenette & Atweh, 2007) et réduisent de manière importante le flux sanguin dans la microcirculation (Rees *et al*, 2010) mais également dans les artères plus larges comme les

artères pulmonaires et cérébrales. Les GRs rigides, denses et peu déformables augmentent le frottement contre l'endothélium et activent l'expression des molécules vaso-constrictrices comme l'endothéline-1 (Graido-Gonzalez, E., Doherty *et al*, 1998) et le facteur de transcription nucléaire- κ B (NF- κ B) (Belcher *et al*, 2006, 2005). L'amplification du stress oxydatif est également impliquée dans l'inflammation vasculaire.

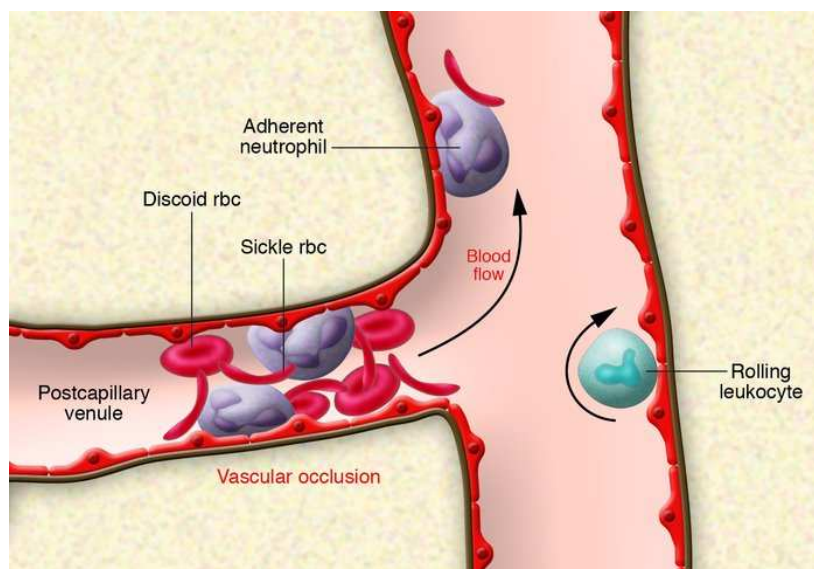


Figure 28. Schéma général de l'adhérence cellulaire dans la drépanocytose contribuant à l'occlusion vasculaire. D'après (Frenette & Atweh, 2007).

II.5 Aspects cliniques de la Drépanocytose

La Drépanocytose est caractérisée par une grande diversité d'expression clinique et la survenue de nombreuses complications. Les complications majeures de la Drépanocytose sont :

- les crises vaso-occlusives (CVO) (voir ci-dessus) douloureuses, osseuses, ostéo-articulaires ou abdominale dont la sévérité, la fréquence, la durée et la localisation diffèrent d'un patient à l'autre et d'une crise à l'autre. Le syndrome pied-main une manifestation vaso-occlusive de la petite enfance qui se manifeste entre 6-18 mois.

- *l'anémie hémolytique chronique* est une complication majeure de la maladie (voir ci-dessus). Les patients montrent une diminution du taux d'hémoglobine (entre 6 et 9.5 g/dl vs. 12-16 g/dl chez les sujets AA) et d'hématocrite (d'environ 24% contre 40%) et une augmentation du taux de réticulocytes.
- les *complications spléniques* (splénomégalie, la séquestration splénique aiguë) causées par le fonctionnement intensif de la rate (Habibi *et al*, 2005). Ces complications nécessitent souvent un traitement transfusionnel.
- le *syndrome thoracique aigu* (STA) regroupant les complications thoraciques et pulmonaires aiguës. Ce sont des phénomènes vaso-occlusifs localisés dans la microcirculation pulmonaire. Les symptômes comprennent une douleur thoracique, une accélération de la respiration, de toux et de la fièvre. D'autres complications pulmonaires chroniques sont l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et les thromboses artérielles pulmonaires, sachant que ces dernières peuvent conduire à une HTAP (Ataga *et al*, 2006; Gladwin *et al*, 2004).
- les *vasculopathies cérébrales* (l'accident vasculaire cérébrale (AVC) ischémique, hémorragique et silencieux ; le moyo-moyo etc.). Elles surviennent surtout chez les patients homozygotes SS (Ohene-Frempong, 1991) avec des conséquences potentiellement fatales et des dysfonctionnements cognitifs. La pathophysiologie est très complexe (Connes *et al*, 2013b).
- le *priapisme*, survient lors des occlusions vasculaires au niveau des corps caverneux du pénis provoquant une érection prolongée très douloureuse.
- les *ulcères de jambe*, sont des plaies cutanées chroniques. Les ulcères surviennent plus souvent chez les patients SS (Serjeant, 2001).
- *l'ostéonécrose*, causée par une réduction du flux sanguin de l'os ce qui conduit alors au développement d'une nécrose surtout au niveau de la tête fémorale et de l'humérus. Au stade ultime elle nécessite la pose d'une prothèse de hanche.

- la *rétinopathie proliférante*, affection de la rétine qui peut être suffisamment importante pour causer la cécité complète (Lutty *et al*, 1994). Cette complication est plus fréquente chez les patients SC (Cao *et al*, 1999).
- les *anomalies cardiaques* (Covitz *et al*, 1995)
- les *atteintes rénales* (hypertrophie organique, hypertension glomérulaire, insuffisance rénale chronique) causées par une augmentation du débit sanguin rénal et de la filtration glomérulaire (Etteldorf *et al*, 1955). Les atteintes rénales trouvent leur origine dans le paradoxe de la perfusion défini par une hyperperfusion corticale et une hypoperfusion au niveau de la médulla.

Certaines complications affectent spécifiquement certaines populations de patients selon leur génotype, l'âge et leur sexe. Ainsi, même si les patients SS et SC partagent des nombreux symptômes cliniques, la fréquence des complications varie d'un groupe à l'autre (Tableau 1).

Tableau 1 Comparaison de la prévalence de quelques complications cliniques chroniques entre les patients adultes SC et SS

Condition	Patients with data available	HbSC N. patients (%)	SCA % patients
Retinopathy	163	114 (70)	43
PSR treated by laser	163	81 (50)	ND
Otological disorders	179	52 (29)	ND
Renal involvement	174	23 (13)	84
Osteonecrosis	179	22 (12)	26
TRJV > 2.5 m/sec.	159	6 (4)	30
TRJV ≥ 2.9 m/sec.	159	0	9
Stroke	179	2 (1)	24
Leg ulcer	179	1 (0.6)	10

*HbSC, hemoglobin SC disease;
ND: not done; PSR: proliferative sickle cell retinopathy; SCA: sickle cell anemia; TRJV: tri-cuspid regurgitant jet velocity.*

Tandis que les vasculopathies sont plus fréquentes chez les patients SS, les patients SC sont plus susceptibles de développer des complications otologiques et ophtalmologiques comme les

rétinopathies prolifératives (Lemaire *et al*, 2013) et l'ostéonécrose (Lionnet *et al*, 2012) associés à la viscosité sanguine plus élevée (Lionnet *et al*, 2012). D'après (Lionnet *et al*, 2012).

Complications drépanocytaires : classification en deux phénotypes

Des études physiopathologiques (Ballas, 1991; Embury, 1986) ont permis d'observer que les patients SS qui développaient des CVOs n'étaient pas forcément les mêmes que ceux qui développaient des complications chroniques. Visant l'objectif de comprendre la complexité et la diversité physiopathologiques de la Drépanocytose, un nouveau modèle a été proposé par Kato *et al* (Kato *et al*, 2007, 2009) et Gladwin & Vichinsky (Gladwin & Vichinsky, 2008) dans lequel les auteurs regroupent la variabilité des complications cliniques en deux sous-phénotypes (Figure 29) : les complications chroniques semblent être liées d'une part à l'anémie hémolytique avec altération du métabolisme de NO (hypertension pulmonaire, ulcère de jambe, priapisme, vasculopathie cérébrale) ou d'autre part aux phénomènes vaso-occlusifs (crises douloureuses, syndrome thoracique aigu et ostéonécrose). En réalité, ces deux phénotypes ne sont pas exclusifs et tous ces phénomènes sont présents chez les patients mais on a souvent un phénotype biologique et clinique dominant (Kato *et al*, 2007). Ce modèle s'applique essentiellement pour la forme SS de la Drépanocytose.

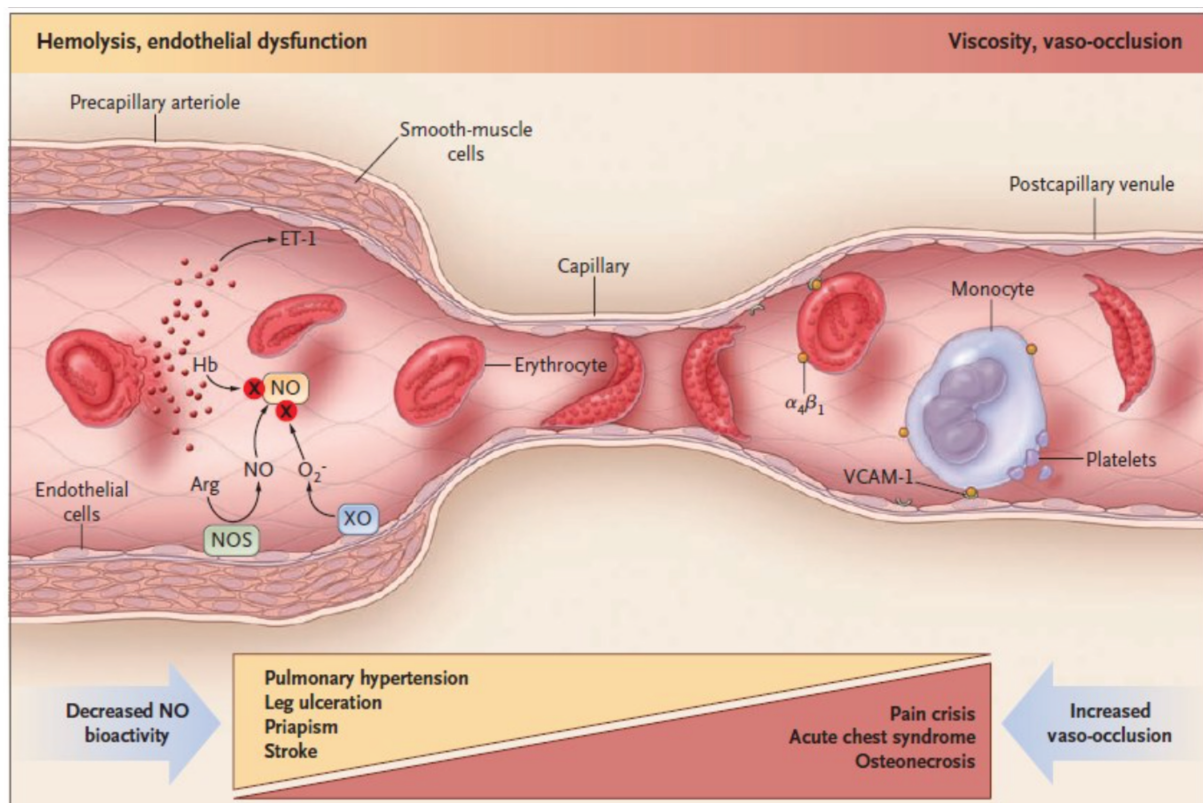


Figure 29. Modèle physiopathologique hypothétique des sous-phénotypes cliniques de la Drépanocytose. D'après (Gladwin & Vichinsky, 2008).

ET-1 : endothéline-1, NO : monoxyde d'azote, Hb : hémoglobine, NOS : oxyde nitrique synthase, Arg : arginine, $O_2^{\cdot -}$: anion superoxyde, VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule 1*, XO : xanthine oxydase

A gauche le sous-phénotype hémolytique avec une dysfonction endothéliale marquée liée à l'hémolyse qui conduit à la détérioration du NO par plusieurs voies (*détaillée plus haut*), à un stress oxydant exacerbée et à une perte de vasomotricité.

A droite le sous-phénotype visqueux-vaso-occlusif caractérisé par l'activation endothéliale et l'expression des molécules d'adhérence vasculaire augmentant l'interaction entre les cellules circulantes (plaquettes, leucocytes, érythrocytes) et l'endothélium.

Ainsi les patients drépanocytaires anémiques avec une hémolyse marquée semblent prédisposés à développer une hypertension artérielle pulmonaire, des ulcères de jambe, du priapisme, une glomérulopathie et des vasculopathies cérébrales tandis que ceux avec une hémolyse moindre ont plus de risque de développer des CVOs douloureuses, des STA aigus et une ostéonécrose. Sachant que l'implication de la viscosité dans les complications associées au phénotype visqueux-vaso-occlusif, notamment dans le STA et l'ostéonécrose est discutée (Lamarre *et al*, 2012b), il apparaît que ces complications sont associées à un taux de globules blancs, un hémocrite et un taux d'hémoglobine élevé et un faible taux d'HbF. L'alpha-thalassémie serait un facteur protecteur vis-à-vis des complications dites hémolytiques mais un facteur aggravant vis-à-vis des complications vaso-occlusives.

Cependant, en réalité la physiopathologie de la Drépanocytose est plus complexe et le modèle peut encore être affiné. Il ne prend pas en compte la contribution de la rhéologie sanguine et de l'activité du système nerveux autonome (Connes & Coates, 2013) qui peuvent moduler le contrôle vasculaire mais aussi l'inflammation (Nebor *et al*, 2011; Tracey, 2002).

III. LES EFFETS DU STRESS OXYDANT DANS LA DREPANOCYTOSE

LE STRESS OXYDANT ET LES DEFENSES ANTIOXYDANTES

À l'état physiologique, il existe un équilibre entre la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) nommés aussi espèces réactives de l'oxygène, ERO et les systèmes de défense antioxydante. Les ROS sont des éléments extrêmement réactifs qui présentent un (des) électron(s) non apparié(s) dit(s) célibataire. Une fois produits, ils vont oxyder différents composés cellulaires. Les antioxydants regroupent toutes les substances capables d'inhiber et contrôler l'activité des ROS permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire. Lorsqu'une production et une activité des ROS exagérée est couplée à un déficit de la capacité de défense antioxydante il peut apparaître un déséquilibre et des dommages oxydatifs cellulaires et tissulaires (Baudin, 2006). On parle alors de **stress oxydant**. C'est en particulier ce qui se passe dans certaines pathologies cardiovasculaires mais également dans des conditions physiologiques stressantes telles que l'exercice intense (Banerjee *et al*, 2003; Ji, 1999), l'hypoxie (Chandel *et al*, 1998), l'âge (Finkel & Holbrook, 2000), le stress physique et mental, l'alimentation, les radiations, l'exposition au soleil, l'alcool ect. (Monaghan *et al*, 2009).

III.1 Les espèces oxygénées réactives

L'oxygène est indispensable à la vie humaine mais il peut devenir toxique par lui-même et par la formation des radicaux libres. Lors du métabolisme aérobie, l'oxygène sert dans les mitochondries à la production d'ATP via la phosphorylation oxydative (respiration) et le transport d'électrons. L'oxygène est ensuite réduit en eau (Wilmore *et al*, 2009). Entre 0.4 et 4% des électrons s'échappent et réagissent directement avec l'oxygène dans le cytoplasme via des enzymes comme la NO synthase ou la NAD(P)H oxydase. De plus, à la fin de la chaîne

du transport d'électrons, la réduction incomplète de l' O_2 conduit à la formation des ROS comme l'anion superoxide (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^\bullet$) (Schieber & Chandel, 2014; Valko *et al*, 2007) (Figure 30). Néanmoins, ces radicaux libres ne sont en réalité pas uniquement des sous-produits délétères. Une quantité minimale est nécessaire pour des processus biologiques et physiologiques : les ROS interviennent dans les réactions redox (d'oxydation ou de réduction) et dans la régulation de l'expression des gènes, la réponse immunitaire et la signalisation cellulaire (Schieber & Chandel, 2014). Cependant, une quantité trop élevée conduit à des dommages protéiques, lipidiques et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ainsi, les radicaux libres ont un rôle paradoxal qui peut s'avérer délétère en fonction de leur concentration. Ils sont essentiels à la régulation des fonctions cellulaires d'un côté et de l'autre il s'agit de sous-produits métaboliques potentiellement « toxiques ».

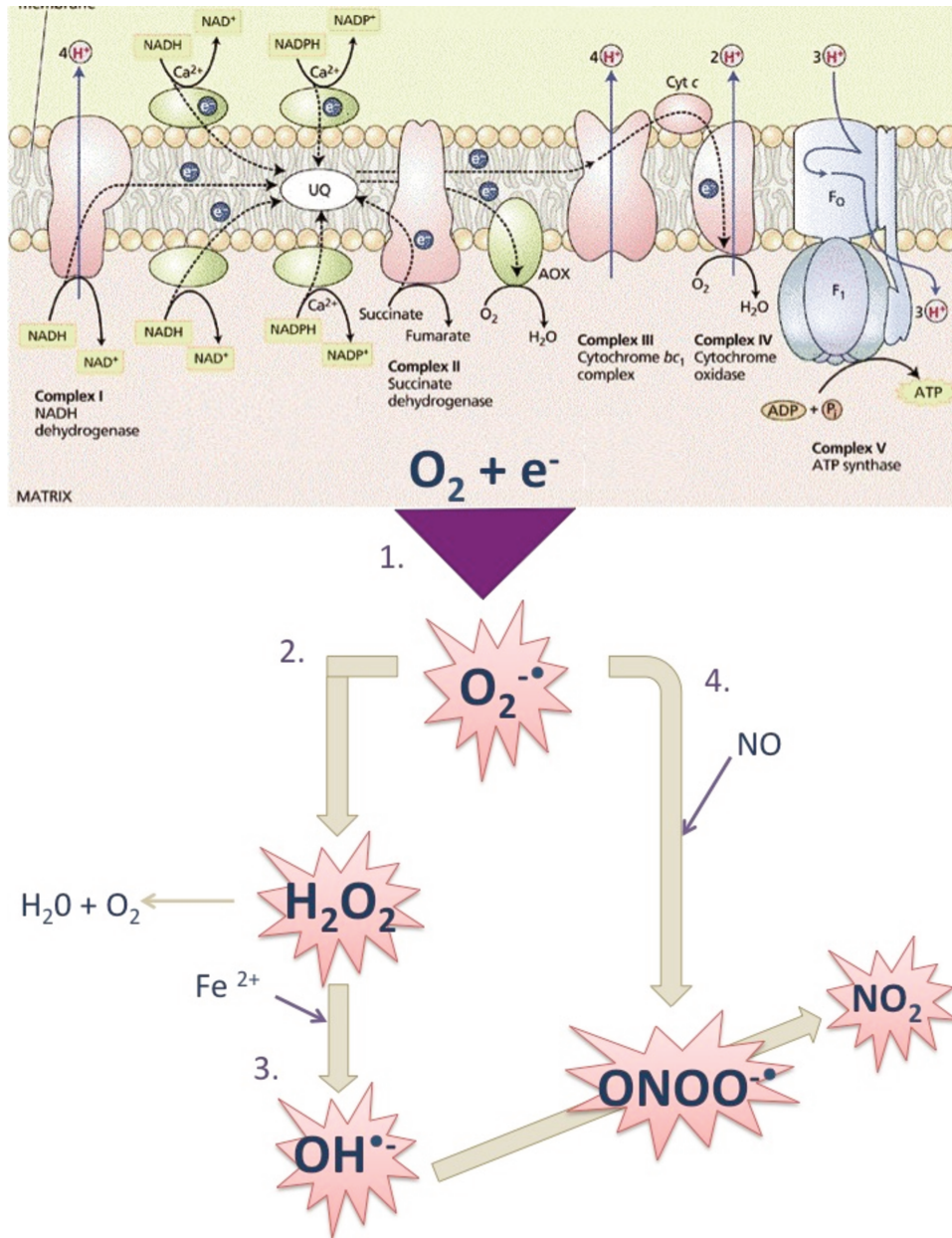


Figure 30. La formation des principales espèces oxygénées réactives

La formation des principales espèces oxygénées réactives par la chaîne de réduction de l'oxygène et par réaction avec le NO.

1. La réaction de l'oxygène (O_2) avec des électrons échappés de la chaîne respiratoire conduit à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).
2. La durée de vie de $O_2^{\bullet-}$ est très courte et il est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par dismutation : $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical mais appartient aux espèces réactives de l'oxygène). Le H_2O_2 est très toxique notamment à cause de sa capacité à diffuser facilement à travers la membrane et ses capacités d'oxydation à

faible concentration contribuant aux dommages protéiques, à la libération de fer et à l'oxydation d'ADN. Il peut également donner naissance à d'autres ROS. Néanmoins en absence de fer le H_2O_2 se décompose lentement en H_2O et O_2 .

3. Réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\circ + OH^\circ + Fe^{3+}$. En présence des ions métalliques le H_2O_2 formé peut donner naissance au ions ferriques (Fe^{3+}) radical hydroxyle OH° très agressif pour l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides (Salgado *et al*, 2013).

L'ensemble des réactions 1-3 est appelé cycle d'Haber-Weiss (Haber & Weiss, 1934).

4. O_2° peut également réagir avec l'oxyde nitrique (NO) en formant un oxydant puissant et diffusable, le peroxynitrite ($ONOO^-$) qui peut, sous sa forme gazeuse, selon l'effet de cage, proposé par Pryor (Pryor & Squadrito, 1995) se dégrader rapidement en OH° et le dioxyde d'azote (NO_2°), qui est impliqué dans l'oxydation des acides gras (Beckman *et al*, 1990). Une autre voie de décroissance de peroxynitrite est l'isomérisation en nitrate.

III.2 Les systèmes antioxydants

Dans les conditions normales, les systèmes d'antioxydant constituent une défense efficace capable de neutraliser les radicaux libres en excès. Il existe des mécanismes antioxydants de prévention qui inhibent la formation des ROS en limitant les molécules ou l'activité des enzymes impliqués dans les réactions d'oxydo-réduction. L'objectif du deuxième système de défense est l'élimination des ROS. En général, on distingue les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Les antioxydants enzymatiques agissent directement en neutralisant les ROS et les transforment en espèces neutres. Trois enzymes sont principalement impliquées : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPX) (Figure 31).

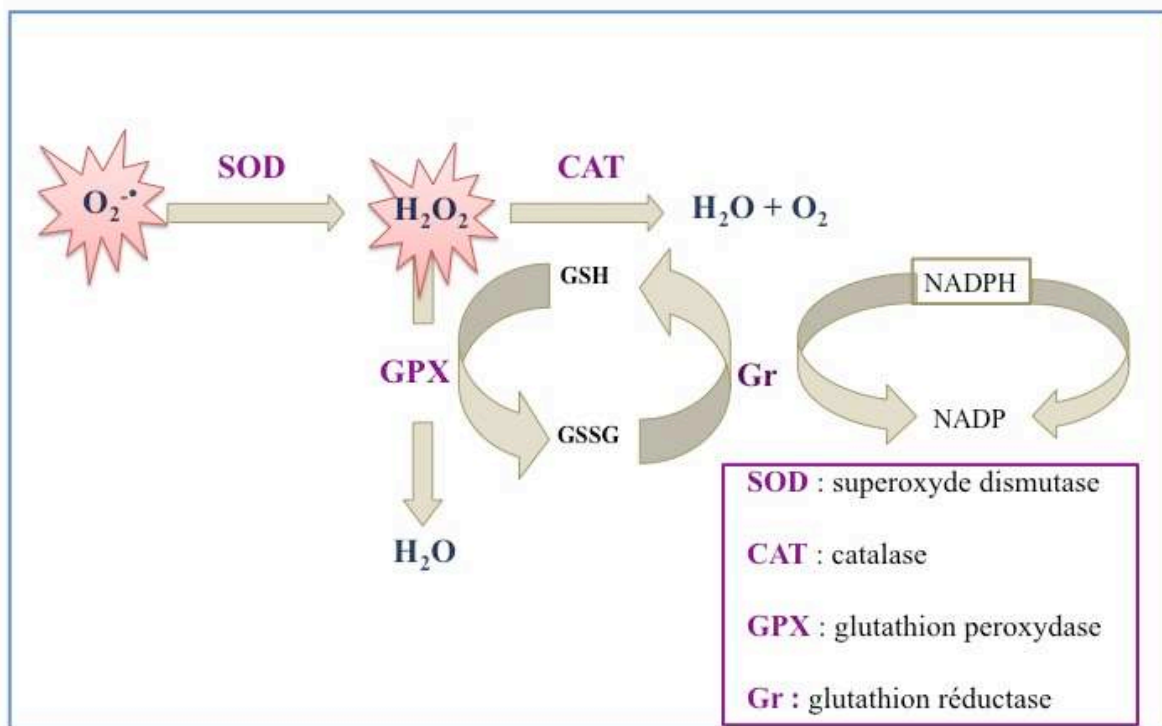


Figure 31. Les systèmes de défense antioxydante enzymatique

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines (à cuivre, zinc ou manganèse) responsables de la dismutation spontanée du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elles se trouvent dans le cytoplasme ou dans les mitochondries. Le H_2O_2 formé peut être éliminé et transformé en eau (H_2O et O_2) par deux enzymes : la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX). La catalase est une hémoprotéine composée de quatre chaînes polypeptidiques. Elle est localisée dans les peroxysomes, les mitochondries et le cytosol et permet la réduction de H_2O_2 en H_2O et O_2 . La GPX est une peroxydase dépendante du sélénium qui a une forte affinité pour le H_2O_2 ce que permet d'intervenir à des concentrations plus faibles comparativement à la catalase qui catalyse la dismutation de H_2O_2 à des fortes concentration de H_2O_2 . L'activité de la GPX nécessite la régénération du glutathion (GSH) qui est synthétisé par la glutathion réductase (Gr). La Gr nécessite le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) lui même régénéré par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Ces réactions aboutissent à la formation de H_2O et de glutathion oxydé (GSSG) (Kohen & Nyska, 2002).

L'expression, l'activation et l'induction des enzymes antioxydantes sont contrôlées par le facteur de transcription Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) qui est localisé majoritairement dans le cytoplasme des cellules. Au repos la protéine *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) inhibe le facteur de transcription. Lorsqu'il reçoit des stimuli comme l'hypoxie, le stress oxydant et des concentrations élevées de NO, le complexe Nrf2-

KEAP1 se dissocie et coordonne l'expression d'enzymes telles que la SOD, catalase et la GPX (Ma, 2013).

La plupart des antioxydants non-enzymatiques sont apportés par un régime alimentaire caractérisé par un apport suffisant en fruit et légumes, notamment riche en vitamines C (acide ascorbique) (Fain, 2004), A (caroténoïdes) et E (tocophérols), ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque (Haleng *et al*, 2007). On les retrouve dans les légumes, les fruits et le poisson. On trouve d'autres réducteurs comme l'acide urique, la mélanine, les oligoéléments et le sélénium.

Quelques exemples d'activité antioxydants non enzymatiques :

Le **glutathion** est un tripeptide, constitué de trois acides aminés, acide glutamique-cystéine-glycine). Il s'agit d'un thiol qui est présent majoritairement sous forme réduite (GSH). Le rapport entre GSH / GSSG est un marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'estimer le niveau du stress. Ce rapport tend à diminuer au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense. Il a de nombreuses propriétés antioxydantes : donneur d'électrons, cofacteur de la GPX, chélateur des métaux de transition et régénérateur des vitamines E et C (Haleng *et al*, 2007).

L'**acide urique** est un produit terminal du métabolisme des purines tels que la xanthine et l'hypoxanthine. L'acide urique peut réagir avec OH° pour produire un radical urée stable. Il est également un capteur de fer et de cuivre en inhibant leur implication dans les oxydoréductions.

L'homme ne peut pas synthétiser la **vitamine C**. Il doit assurer un apport suffisant via une alimentation riche en fruits. Elle est un puissant réducteur des ROS (OH° et $\text{O}_2^{\circ-}$) et inhibe également la peroxydation lipidique en recyclant la vitamine E. De plus, la vitamine C est connue pour sa capacité immunitaire, son implication dans la synthèse de collagène et des globules rouges et dans le métabolisme de fer (Haleng *et al*, 2007).

La **vitamine E** désigne la famille des tocophérols. Ce sont des antioxydants lipophiles et hydrophobes ce qui leur permet de s'insérer dans les membranes plasmiques en protégeant les phospholipides et empêchant la peroxydation lipidique. La vitamine E se retrouve en quantité variable dans les huiles (soja, maïs, olive) et dans les noix et noisettes. L'apport journalier recommandé est de 10 mg. C'est la vitamine E qui protège la peau des dommages cutanés des radicaux libres.

Les caroténoïdes, avec la **vitamine A** comme forme majeure, se retrouvent dans les fruits et les légumes. Parmi les plus connus sont le lycopène (pigment rouge des tomates et pamplemousses) et le β carotène, contenu dans l'abricot, le melon, la carotte, les légumes verts (épinards, laitue...). L'apport journalier recommandé est de 1 à 5 mg (Haleng *et al*, 2007). Ils renforcent les défenses antioxydantes, anti-infectieuses et protègent contre les maladies cardio-vasculaires.

Les **polyphénols** sont également une famille importante d'antioxydants qui sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le chocolat, les pommes et les oignons. Ce sont des piègeurs des radicaux libres et ils empêchent le dépôt de graisses dans les vaisseaux et facilitent la circulation sanguine.

Les travaux récents indiquent que **l'entraînement régulier** peut stimuler l'activité des enzymes antioxydantes (Di Francescomarino *et al*, 2009). L'activité physique aigue intense a un effet prooxydant transitoire mais l'activité physique chronique a un effet global antioxydant. Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon les habitudes alimentaires, son mode de vie (tabagisme, activité physique), ses caractéristiques génétiques ou l'environnement (Pincemail *et al*, 2002).

Les systèmes de défense et la production des ROS sont généralement en équilibre. Le stress oxydant résulte de la situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux qui deviennent alors toxiques.

III.3 Le stress oxydant dans la Drépanocytose

1. Formation des espèces réactives à l'oxygène dans la Drépanocytose

Divers processus impliqués dans la physiopathologie de la drépanocytose dont l'hémolyse, l'auto-oxydation de l'hémoglobine S, l'inflammation, les occlusions vasculaires, l'adhésion et les épisodes d'hypoxie et de reperfusion contribuent au développement d'un stress oxydatif. La source de la formation des ROS dans la drépanocytose est multifactorielle.

a) L'auto-oxydation de l'hémoglobine S

En condition aérobie, l'auto-oxydation de l'hémoglobine conduit à la production de méthémoglobine, d'anion superoxyde et d'ion ferrique (Fe^{3+}). Contrairement à l'hémoglobine A, l'oxydation d'HbS est très rapide (Hebbel *et al*, 1988) et la production des $\text{O}_2^{\bullet-}$ ainsi d' H_2O_2 est plus importante. Des études démontrent que l'auto-oxydation d'HbS est 1.7 fois plus rapide que celle de l'HbA (Wood *et al*, 2008; Hebbel *et al*, 1988). L' H_2O_2 produit peut former l' $\text{OH}^{\bullet}$. Les globules rouges contenant l'HbS ont une quantité en $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et $\text{OH}^{\bullet}$ plus élevée que des globules rouges sains.

b) Ischémie et reperfusion

L'altération de la perfusion sanguine et la survenue d'épisodes d'ischémie et de reperfusion sont fréquents chez les patients drépanocytaires. Des radicaux libres peuvent être produits lors de l'hypoxie et pendant la reperfusion. Sous les conditions hypoxiques, l'adénosine triphosphate (ATP) est convertie en adénosine monophosphate (AMP) ce qui contribue à la formation de l'hypoxanthine et xanthine et à l'activation de la xanthine oxydase. Lors de la

phase de réoxygénation, la xanthine oxydase catalyse la réaction de l'O₂ et de l'hypoxanthine en acide urique et O₂^{•-} (Szocs, 2004). Une augmentation de l'activité de la xanthine oxydase est associée aux marqueurs de l'inflammation comme les cytokines (TNF- α , IL-1 β et IFN γ) qui promouvoir l'adhérence des cellules circulantes à l'endothélium (Kanczler *et al*, 2003; Flanders *et al*, 1997; Lappas *et al*, 2010). Les périodes d'hypoxie favorisent la falciformation et l'interaction des cellules circulantes avec la paroi vasculaire via VCAM-1 et ICAM-1, augmentant ainsi l'adhérence vasculaire et le risque d'occlusion vasculaire (Solovey *et al*, 2001).

c) L'état pro-inflammatoire chronique : le rôle de la NADPH oxydase

En normoxie, la NADPH oxydase joue un rôle primordial dans la production des ROS (Bedard & Krause, 2007). La NADPH oxydase est localisée dans l'endothélium, les neutrophiles polymorphonucléaires et les monocytes. Lors de l'activation métabolique respiratoire la NADPH oxydase catalyse la réduction de l'oxygène en formant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺), l'O₂^{•-} et H⁺. Le stress oxydant conduit à la mise en place d'une réponse inflammatoire avec l'augmentation du nombre de plaquettes et de leucocytes via la stimulation de cytokines (Afshar-Kharghan & Thiagarajan, 2006; Luster, 1998). Par conséquent, l'activité de la NADPH oxydase augmente. En outre, l'activation des cytokines pro inflammatoires se caractérise également par une surexpression de molécules d'adhérences de la famille des immunoglobuline et des sélectines (Wood *et al*, 2006; Kato *et al*, 2005; Galley & Webster, 2004) qui activent les cytokines et contribuent à l'obstruction vasculaire et l'hypoxie et ainsi à la formation des ROS engendrant un cercle vicieux.

d) L'hémolyse

L'hémolyse diminue fortement l'activité et la disponibilité en NO via la libération d'hémoglobine et d'arginase dans le plasma. En outre, elle contribue au stress oxydatif dans la Drépanocytose. Le fer contenu dans l'hème et l'hémoglobine libre peut jouer le rôle de

catalyseur pour la réaction de Fenton conduisant à des phénomènes de peroxydations lipidiques et protéiques (Aslan *et al*, 2000), à l'activation des cellules endothéliales et à l'altération de la structure et des fonctions membranaires (Jeney *et al*, 2002). En absence de BH₄ et de L-arginine, eNOS est découplée et peut générer l'O₂^{•-}. Le O₂^{•-} produit peut réagir avec le NO pour former du peroxynitrite.

Ainsi dans la Drépanocytose l'hémolyse intravasculaire (*Chapitre II.4*) et le stress oxydant altèrent fortement la biodisponibilité du NO (Figure 32).

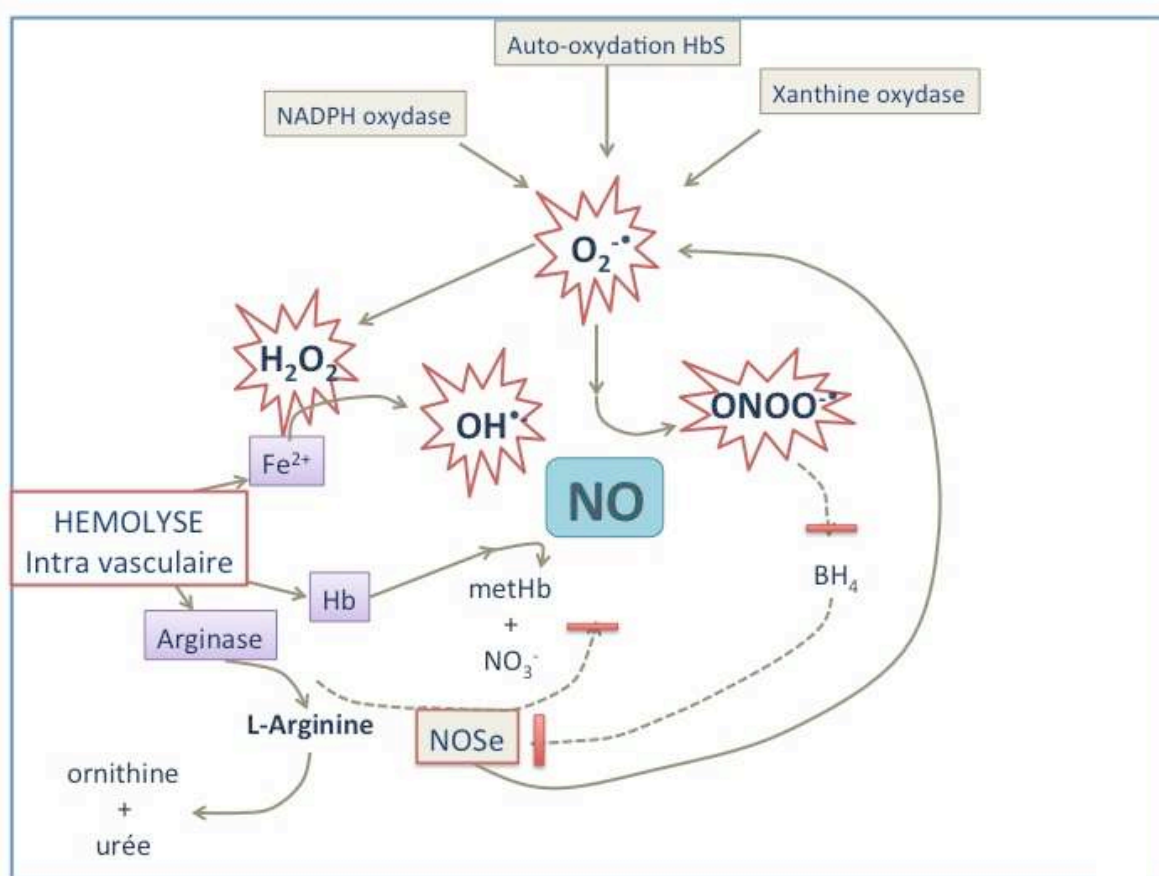


Figure 32. Altération de la biodisponibilité du NO par l'hémolyse intravasculaire et le stress oxydant

L'arginine, la tétrahydrobioptérine (BH₄) et la eNOS sont nécessaires pour synthétiser le NO. L'hémolyse et la formation des radicaux libre interfèrent avec le métabolisme du NO. Le NO diminue par des voies multiples (Chirico & Pialoux, 2012) :

- L'hémolyse libère l'enzyme Arginase dans le plasma qui transforme le L-Arginine en ornithine et urée aboutissant au découplage de la eNOS.

- L'hémoglobine libre plasmatique piège le NO pour former du nitrate (NO_3) et de la méthémoglobine (metHb)
- L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) provenant de l'auto-oxydation d'HbS, de l'activité de la xanthine oxydase et de la NADPH oxydase, et de la eNOS découplé (Morris *et al*, 2005b) réagit avec le NO pour former du peroxynitrite (ONOO^-) qui inhibe la BH_4 (Cosentino & KatusiĆ, 1995). Le eNOS se retrouve alors encore une fois découplé.
- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) issu de la dismutation spontanée d' $\text{O}_2^{\circ-}$ peut réagir avec le fer par la réaction de Fenton en produisant le radical hydroxyl (OH°).

Le NO est un important modulateur de la fonction vasculaire. La diminution de la biodisponibilité du NO favorise la vasoconstriction et le développement de la vasculopathie.

La production des ROS dans la Drépanocytose a deux conséquences principales :

- (1) activation endothéliale avec surexpression des molécules endothéliales d'adhérence, et une inflammation causant une augmentation du temps de transit érythrocytaire, diminuant la perfusion microvasculaire et favorisant l'hypoxie, la falciformation et la survenue des occlusions vasculaires (Kaul *et al*, 2009).
- (2) perturbation du métabolisme du NO en diminuant extrêmement sa biodisponibilité, ce qui provoque une altération de la fonction microvasculaire et de la réactivité vasculaire NO-dépendante (Kato *et al*, 2017).

2. Altération des mécanismes de défenses antioxydantes dans la Drépanocytose

En plus d'un stress oxydant élevé, les mécanismes de défense antioxydante se retrouve limitée dans la Drépanocytose. Cela inclut les antioxydants enzymatiques mais aussi les défenses non enzymatiques (Natta *et al*, 1990).

Quelques études ont démontré que l'activité de la GPX (Das & Nair, 1980), de la catalase (Das & Nair, 1980; Goswami & Ray, 2011) et de la SOD (Schacter *et al*, 1988) étaient plus faible chez les patients probablement à cause d'une surconsommation ou une inactivation par l'excès en radicaux libres. Une activité de la GPX et de la catalase réduite induit une

augmentation en H₂O₂. De plus, l'activité de la GSH, le cofacteur de la GPX, semble être plus faible (Morris, 2008; Amer *et al*, 2006). Néanmoins, d'autres études ont aussi montré une activité enzymatique plus élevée (Manfredini *et al*, 2008; Das & Nair, 1980) qui correspondrait à une adaptation en réponse à l'augmentation du stress oxydatif. Chez les patients drépanocytaires, l'hémolyse chronique entraîne une sur-expression de la hème oxygénase (Belcher *et al*, 2010). Cette enzyme contribue au catabolisme de hème en bilirubine et en monoxyde de carbone et en ion fer. Elle permet d'inhiber le NF-κB, l'activation endothéliale et de contrôler l'hypoxie / reperfusion.

La réduction des concentrations plasmatiques en vitamine E (Gizi *et al*, 2011) a été montrée comme inversement corrélée au pourcentage d'érythrocytes falciformes (Klings & Farber, 2001). Les concentrations plasmatiques en vitamine A et C apparaissent également réduites (Gizi *et al*, 2011). Pour synthétiser, une augmentation de l'activité antioxydante est souvent interprétée comme une adaptation en réponse au stress oxydant et une activité plus faible représenterait la saturation de la capacité antioxydante.

III.4 Hémolyse, stress oxydant et dysfonction vasculaire dans la Drépanocytose

Chez les patients drépanocytaires, l'augmentation du débit cardiaque (Covitz *et al*, 1995) couplée aux altérations hemorhéologiques augmentent le stress mécanique (contrainte de cisaillement) appliqué aux parois vasculaires, ce qui conduit à une stimulation continue de la eNOS (Kaul *et al*, 2000; Topper & Gimbrone, 1999; Uematsu *et al*, 1995). L'activité continuellement augmentée de la eNOS (Kaul *et al*, 2000; Bank *et al*, 1996; Osei *et al*, 1996) engendre une production de NO sans arrêt et ce faisant, une relaxation vasculaire importante au repos (Belhassen *et al*, 2001). Cet ajustement du diamètre vasculaire permet de normaliser la contrainte de cisaillement. Cependant, la réserve vasculaire vasodilatrice en cas de besoins

supplémentaires se retrouve alors limitée et le NO surproduit est rapidement désactivé à cause du stress oxydatif exacerbé et l'hémolyse chronique (Kato *et al*, 2007; Chirico & Pialoux, 2012). Ainsi, les patients drépanocytaires montrent une diminution de la biodisponibilité et de la bioactivité du NO (Reiter & Gladwin, 2003; Morris *et al*, 2005b) entraînant la formation des ROS et un dysfonctionnement endothélial et vasculaire (Chirico & Pialoux, 2012). Il s'installe un déséquilibre entre pro-oxydants / antioxydants augmentant la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines membranaires contribuant aux dysfonctionnements cellulaires (Lazzaretti *et al*, 2008; Aslan *et al*, 2000). Les globules rouges deviennent alors plus fragiles favorisant l'hémolyse (Lazzaretti *et al*, 2008). La diminution de la biodisponibilité en NO favorise la vasoconstriction et le développement de la vasculopathie, la surexpression endothéliale des molécules d'adhérence vasculaire et l'activation plaquettaire (Gladwin & Vichinsky, 2008). Ces anomalies biologiques semblent être impliquées dans le développement de l'HTAP (Gladwin *et al*, 2004), de la glomérulopathie (Nebor *et al*, 2010), des ulcères de jambes (Kato *et al*, 2006b), du priapisme (Kato *et al*, 2006b) et des vasculopathies cérébrales (Connes *et al*, 2013b; Bernaudin *et al*, 2008). On note le développement d'une vasculopathie chronique touchant à la fois la microcirculation et les gros vaisseaux artériels (Connes *et al*, 2013b; Bernaudin *et al*, 2008; Kato *et al*, 2009).

L'hémolyse et la génération des radicaux chronique forme un cercle vicieux affectant considérablement le métabolisme de NO et par conséquent la vasomotricité de la micro (Grau *et al*, 2015a) et de la macrocirculation (Belhassen *et al*, 2001; Blum *et al*, 2005; Aessopos *et al*, 2007) augmentant par conséquent la survenue de diverses complications drépanocytaires (Chirico & Pialoux, 2012).

IV. DRÉPANOCYTOSE ET EXERCICE

IV.1 Activités physiques : Généralité

Depuis plusieurs années un intérêt particulier a été accordé au rôle de l'activité physique dans la promotion de la santé (Norgan, 1992). Cependant une grande partie des travaux concernent les adultes. L'industrialisation, la mondialisation et les changements de mode de vie ont fait que beaucoup de gens (adultes et enfants) adoptent une vie trop sédentaire. Les activités sédentaires incluent les activités comme le sommeil, regarder la télévision, parler au téléphone, travailler/jouer à l'ordinateur. En France, selon *le programme national nutrition santé*, PNNS un adolescent sur 2 ou 3 passe en moyenne plus de 3 heures par jour devant un écran et 40-50% des filles / 25-35% des garçons ne font pas d'activité physique structurée en dehors des cours obligatoires d'éducation physique et sportive (EPS) à l'école. On considère aujourd'hui que la sédentarité est le quatrième facteur de risque de mortalité, de cause cardiovasculaire, au niveau mondiale (OMS 2010). Un faible niveau d'activité physique est associé à une augmentation du risque de diabète de type 2, d'hypertension artérielle, de certains cancers et des troubles psychologiques (anxiété, dépression, manque en estime de soi). L'activité physique intervient dans le contrôle du poids (Blair *et al*, 1996; Sothorn). L'activité physique est fondamentale pour maintenir un équilibre énergétique. La dépense énergétique comprend l'énergie consacrée au métabolisme de base et aux activités physiques (Horton, 1983) :

Le *métabolisme de base*, correspond à la dépense d'énergie nécessaire pour les fonctions vitales telles que la thermorégulation, la circulation sanguine, la respiration, l'activité nerveuse et le renouvellement des cellules.

L'activité physique est définie comme tout mouvement musculo-squelettique entraînant une augmentation de la dépense d'énergie au dessus de la dépense de repos

(Caspersen *et al*, 1985). Les activités qui peuvent augmenter la dépense énergétique sont les activités professionnelles, domestiques, les transports et les activités de loisirs.

L'entraînement physique est l'activité physique planifiée structurée, répétée dont le but est d'améliorer ou de maintenir les capacités physiques et déterminant *l'aptitude physique* d'un individu.

L'aptitude physique décrit la capacité globale cardiorespiratoire, ostéomusculaire et psychologique d'un individu à réaliser une activité physique donnée. L'adaptation à l'effort est souvent altérée au cours des maladies cardiovasculaires. Ceci se traduit par des symptômes comme la dyspnée et la fatigue précoce.

L'activité physique est caractérisée par son intensité, sa fréquence, sa durée et sa forme. La combinaison de ces composantes détermine l'effet de l'activité physique sur la santé.

Niveau recommandé d'activité physique pour la santé des enfants/adolescents de 5 à 17 ans

Pour cette classe d'âge l'activité physique englobe notamment le jeu, les sports, les déplacements et l'éducation physique dans le contexte familial, scolaire ou communautaire. Pour réduire le risque des maladies cardiovasculaires et pour améliorer l'endurance cardiorespiratoire, la forme musculaire et l'état osseux, il est recommandé que les enfants et les jeunes accumulent au moins 60 minutes par jour d'activité physique d'intensité modérée (OMS, 2010). Très peu d'étude ont étudié le niveau d'activité physique et la condition physique chez les enfants drépanocytaires. Ainsi, à ce jour, il n'existe pas de recommandations pour ces patients.

IV.2 Effets de l'exercice aigu et chronique sur les paramètres hématologiques / hémorheologiques, le stress oxydant, la biodisponibilité du NO et l'adhésion vasculaire

1. Effet d'un exercice aigu chez les sujets sains

L'exercice aigu augmente la demande cardiovasculaire et métabolique. Le métabolisme doit faire face aux divers changements tels que l'acidose, l'hyperthermie, la déshydratation, des épisodes d'hypoxie tissulaire (Wilmore *et al*, 2017), l'augmentation temporaire du stress oxydant (Tessier, F., & Marconnet, 1995) par l'augmentation de la concentration d'O₂ dans les mitochondries et des dysfonctions immunitaires transitoires via une élévation des cytokines et des hormones circulantes (hormones de croissance, cortisol, adrénaline, catécholamines etc.) (Gleeson, 2007; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Les systèmes s'adaptent pour pouvoir fournir les substrats énergétiques et l'oxygène. L'ajustement métabolique dépend du fonctionnement intégré de nombreux systèmes : le système squelettique qui assure la transformation de l'énergie biochimique en travail mécanique, l'appareil endocrinien et nerveux qui coordonnent et dirigent l'ensemble des fonctions et de la réponse à l'effort, le système cardiovasculaire et respiratoire qui transport l'oxygène et les nutriments et assure l'élimination des déchets et la thermorégulation en collaborant avec le système tégumentaire et le système urinaire qui maintient l'équilibre des électrolytes. Ces ajustements s'observent aux niveaux tissulaire, cellulaire et moléculaire.

Los d'un exercice aigu des nombreuses adaptations cardiovasculaires permettent d'améliorer les échanges entre le sang et les muscles actifs. Ces adaptations impliquent des changements de la fréquence cardiaque, du volume d'éjection systolique, du débit cardiaque, de la pression artérielle, du débit sanguin et du sang (Figure 33).

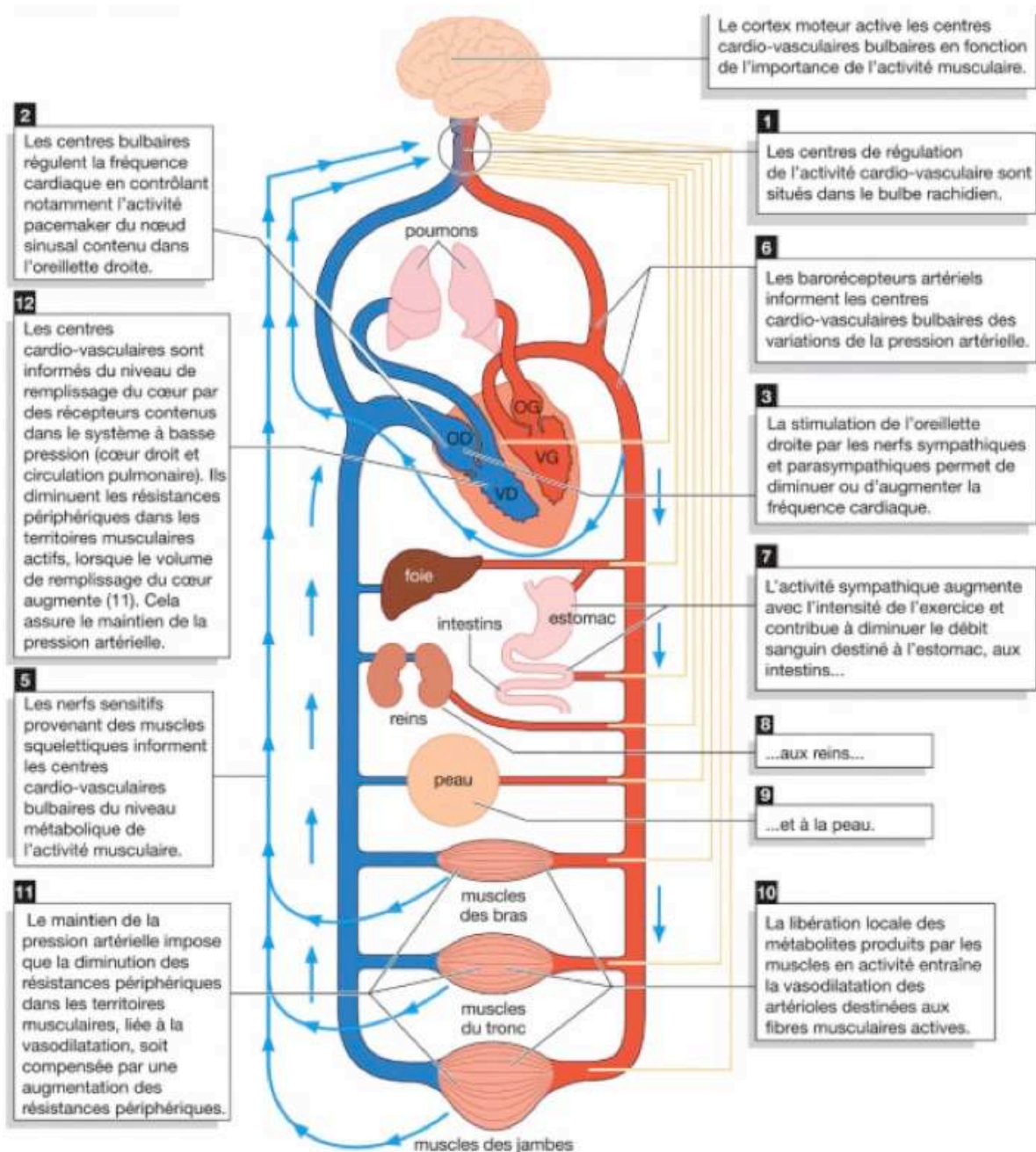


Figure 33. Vue générale des adaptations cardiovasculaires à l'exercice. D'après (Coyole, 1991)

a) sur les paramètres hémodynamiques

Lors d'un effort, la circulation générale est accélérée. L'augmentation de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique élèvent le débit cardiaque et par conséquent la pression artérielle systolique augmente (Wilmore *et al*, 2009). À l'inverse, la pression artérielle diastolique donc la pression de base qui règne dans le système vasculaire change généralement peu. L'augmentation du débit sanguin est liée en majeure partie à la redistribution sanguine par le système sympathique vers les muscles. Cependant, lors d'un effort très intense, la température centrale croissante nécessite une déviation du sang vers la peau pour éliminer de la chaleur, ce qui peut limiter le travail possible des muscles et la performance.

b) sur les paramètres hématologiques et hémorhéologiques

Les exercices prolongés induisent des pertes d'eau importantes ce qui peut diminuer le volume plasmatique, augmenter la viscosité sanguine, l'hématocrite apparente et l'hémoglobine et ralentir le débit sanguin (Costill *et al*, 1974 ; El Sayed *et al*, 2005).

L'effet de l'exercice aigu sur l'agrégation est discuté avec des observations diverses qui dépendent de la forme, de la durée et d'intensité de l'activité pratiquée et de la capacité physique de départ. Tandis que (Connes *et al*, 2007) ont remarqué pas d'impact, (Ernst, 1987) ont observé une augmentation et (Yalcin *et al*, 2003) une diminution tardive.

La déformabilité des globules rouges semble diminuer (Brun, J.F. *et al*, 1993; Ernst, 1987; Galea & Davidson, 1985; Gueguen-Duchesne, M., Durand *et al*, 1987; Yalcin *et al*, 2003) ce qui est probablement liée au taux croissant de lactate sanguin (Brun, J.F. *et al*, 1993). D'autres études ont constaté une variation de la déformabilité (Neuhaus *et al*, 1992) ou une amélioration de la déformabilité (Gürcan *et al*, 1998).

c) sur l'adhésion vasculaire et l'inflammation

L'augmentation du débit sanguin par l'exercice renforce le *shear stress* contre la paroi vasculaire ce qui active l'endothélium et stimule la libération des molécules pro-inflammatoires avec l'élévation du nombre des plaquettes circulantes, du nombre des leucocytes (Gleeson, 2007; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000) et des cytokines impliqués dans les mécanismes d'adhésion (Moldoveanu *et al*, 2001). L'hypoxie induit par l'exercice peut également stimuler la réponse inflammatoire. L'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules circulantes augmente particulièrement quelques heures après l'exercice via l'activation des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, P-, E-, L-sélectines) (Bartzeliotou *et al*, 2007; Nielsen *et al*, 1999). L'ampleur des effets sur le système immunitaire reflète l'intensité et la durée d'un exercice. Ainsi la réponse immunitaire semble être spécifique à chaque type d'exercice.

d) sur le stress oxydant

Lors d'un exercice aigu et intense la formation des espèces oxygénées réactives augmente principalement par l'augmentation du métabolisme aérobie et de l'activité mitochondriale (Tessier, F., & Marconnet, 1995). D'autres mécanismes inclus sont apparemment l'activité des enzymes d'oxydases (xanthine oxydase et de la NADPH oxydase) (Bloomer *et al*, 2005), l'auto-oxydation des catécholamines et la chaîne des réactions redox des radicaux libres (Powers & Jackson, 2008). Les radicaux libres dérivés de l'oxygène diffusent et induisent des réactions de peroxydation et peuvent réagir avec le NO en formant le peroxynitrite (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Par conséquent, il s'installe un stress oxydant (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009) et un stress nitrosatif (Di Francescomarino *et al*, 2009). Cependant pour qu'il y ait un stress oxydant, il faut que la formation des radicaux libres domine la défense antioxydante (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). Ceci n'est pas toujours le cas et le niveau du stress oxydant semble être dépendant de l'intensité (Goto *et al*, 2003) et

de la durée (Bloomer *et al*, 2007) de l'activité physique. Lors des activités physiques de faible intensité et durée, la défense antioxydante est capable de normaliser la production des espèces oxygénées. Pourtant lorsque l'intensité / durée de l'exercice augmente, le stress oxydant croît progressivement et le système de défense n'est plus suffisant entraînant facilement des dommages tissulaires (Knez *et al*, 2007). D'autres facteurs influencent également la capacité de défense antioxydante y compris l'âge (Sacheck *et al*, 2006), l'aptitude physique (Elosua *et al*, 2003; Fatouros *et al*, 2004) et la nutrition (Watson *et al*, 2005). Les résultats sont très discordants en fonction du protocole appliqué et des biomarqueurs étudiés.

e) sur le métabolisme de NO et la fonction vasculaire

Au niveau des tissus peu actifs pendant l'exercice, le système nerveux sympathique induit une vasoconstriction qui permet la redistribution du sang vers les territoires plus actifs au niveau desquels la vasodilatation domine. Les modifications physico-chimiques stimulent pareillement la vasodilatation dans les territoires en activité par les mécanismes d'autorégulation du débit sanguin.

L'élévation des forces de cisaillement stimule proportionnellement les cellules endothéliales et l'activité de la eNOS ce qui augmente la biodisponibilité en NO (Goto *et al*, 2007). Le NO avec sa capacité vasodilatrice locale permet de normaliser les contraintes de cisaillement (Pellegrin *et al*, 2009). Notamment, l'exercice est considéré comme activateur de la eNOS et de la NOS erythrocytaire qui joue un rôle sur la déformabilité des globules rouges (Suhr *et al*, 2012). Dans ce cas, l'augmentation de la viscosité sanguine permet d'activer la fonction vasculaire nécessaire pour maintenir la perfusion tissulaire.

Un exercice aigu induit des nombreuses changements physiologiques qui varient selon le type et l'intensité d'exercice et la population concernée (l'âge, niveau d'entraînement, état de santé...).

2. Effets d'un exercice chronique chez les sujets sains

L'activité physique régulière apportera des bénéfices tant chez des sujets sains que chez des patients atteints des pathologies chroniques via la mise en place des adaptations, pour autant que les caractéristiques de cette activité soient adaptées à la condition de la personne. Ces adaptations en réponse à l'entraînement surviennent dans les différents systèmes ce qui permettent d'améliorer la condition physique et la performance

La répétition régulière de l'exercice a usuellement des effets :

a) sur les paramètres musculaires et circulatoires

L'entraînement régulier induit généralement le développement des fibres musculaires (Holloszy, 1967) avec l'augmentation du nombre des myofibrilles et des filaments d'actine et de myosine. Normalement, la taille comme le nombre des mitochondries et l'activité des enzymes oxydatives augmentent (Morgan *et al*, 1971). L'ensemble des adaptations aboutit à l'amélioration du système neuromusculaire et de l'oxygénation tissulaire qui contribuent à l'augmentation de la force musculaire (El-Sayed *et al*, 2005; Wilmore *et al*, 2009). De plus, on remarque souvent une augmentation du contenu en myoglobine (Harms & Hickson, 1983) et du nombre de capillaires dans les muscles des sujets entraînés.

Les systèmes cardiovasculaires et respiratoires s'en trouvent améliorés et le transport et l'extraction d'oxygène deviennent plus efficaces (Wilmore *et al*, 2009; Holloszy, 1967). La répétition d'exercices devrait induire une augmentation du volume d'éjection systolique (Clausen, 1977). La fréquence cardiaque au repos diminue (Clausen, 1977) probablement à cause de l'augmentation de l'activité parasympathique et de la diminution de l'activité sympathique des nerfs cardiaques. Il s'ajoute une diminution de la durée de récupération cardiaque.

b) sur les paramètres hématologiques et hémorhéologiques

L'entraînement aérobie permet d'augmenter le volume sanguin total par l'augmentation du volume plasmatique (Wilmore *et al*, 2009; Brun, 2002; Brun *et al*, 1998; Ernst, 1987). L'augmentation du volume plasmatique résulte de l'élévation de la concentration des protéines plasmatiques et de la production d'hormone antidiurétique et d'aldostérone, favorisant la rétention d'eau et du sodium (Wilmore *et al*, 2009). L'entraînement favorise une diminution d'agrégation et une amélioration de la déformabilité des globules rouges (Ernst, 1987; Kilic-Toprak *et al*, 2012). Ces facteurs améliorent la fluidité sanguine et se traduisent par une diminution de la viscosité plasmatique et sanguine (Brun *et al*, 1998; Romain *et al*, 2011; Kilic-Toprak *et al*, 2012). C'est le phénomène d'auto-hémodilution (Brun, 2002; El-Sayed *et al*, 2005). Ces changements semblent être plus marqués chez les sujets initialement sédentaires que chez les sujets entraînés (Smith *et al*, 1999; Ernst, 1987). La fluidité du sang évolue apparemment en fonction du niveau d'entraînement (Ernst, 1987; Brun *et al*, 2000). Une surentraînement est associé à des effets inverses avec une augmentation de l'hématocrite de > 44.6%, de la viscosité plasmatique et ainsi de la viscosité sanguine (Brun *et al*, 2000). L'effet de l'entraînement sur ces paramètres hématologiques paraît d'autant plus marqué que le niveau d'aptitude physique de départ est bas. Cependant les résultats des différentes études, s'intéressant aux adaptations hématologiques et hémorhéologiques en réponse à l'entraînement, montrent une grande hétérogénéité (Romain *et al*, 2011).

c) sur l'adhésion vasculaire et l'inflammation

La pratique d'une activité physique régulière améliore probablement la réponse anti inflammatoire (Kasapis & Thompson, 2005) et diminue l'expression des molécules d'adhésion vasculaire, qui interviennent dans les interactions entre les cellules sanguines et l'endothélium. Des études démontrent une relation inverse entre l'aptitude physique et le taux en protéine C-réactive, un marqueur inflammatoire (Kasapis & Thompson, 2005). On note

aussi une diminution des globules blancs et du fibrinogène (Geffken *et al*, 2001) et une réduction de sVCAM-1 (Adamopoulos *et al*, 2001). L'amélioration de la défense antioxydante par l'activité physique régulière permet de diminuer l'inflammation et le développement de la dysfonction endothéliale (Kasapis & Thompson, 2005; Witztum, 1997). L'effet bénéfique de l'entraînement vers une diminution d'inflammation via la réduction des niveaux de sVCAM-1 (Adamopoulos *et al*, 2001), sICAM-1 (Adamopoulos *et al*, 2001; Ribeiro *et al*, 2010; Strohacker *et al*, 2013) et de P- et E-sélectine (Zoppini *et al*, 2006) est particulièrement visible lors d'un programme de réentraînement chez les patients atteints des pathologies vasculaires (hypertension, diabète de type 2, athérosclérose, obésité).

d) sur le stress oxydant

La stimulation régulière de la production des ROS améliore généralement la défense antioxydante enzymatique (Pialoux *et al*, 2009; Gomez-Cabrera *et al*, 2008), de la capacité mitochondriale et des processus des réparations cellulaires (Radak *et al*, 2001). Elle stimule l'expression des gènes codant pour les enzymes de la défense du stress oxydant (Gomez-Cabrera *et al*, 2008). Cette régulation apparaît de dépendre de la quantité de pratique et de l'intensité de l'activité physique (Covas *et al*, 2002). A l'inverse, un exercice trop faible ne suffira pas pour induire des adaptations bénéfiques (Radak *et al*, 2008). Ainsi l'intensité et la durée de la pratique semblent être des facteurs clés qui sont à doser pour la mise en place d'un programme de réentraînement et d'amélioration de la défense antioxydante.

e) sur le métabolisme de NO et la fonction vasculaire

L'entraînement permet une augmentation de la biodisponibilité et de l'activité biologique du NO à cause de la stimulation endothéliale répétitive de la eNOS (Clarkson *et al*, 1999; McAllister & Laughlin, 2006a). Une corrélation négative entre des marqueurs d'oxydation

lipidique, de l'ADN et de la nitration des protéines et l'aptitude physique a été observée chez les femmes entraînées (Pialoux *et al*, 2009). Il apparaît qu'une réduction du stress oxydant permet une amélioration de la biodisponibilité en NO. Un minimum de 10 semaines minimums d'entraînement semble nécessaire pour améliorer la vasodilatation endothéliale dépendante chez des hommes jeunes et sains (Clarkson *et al*, 1999). A l'inverse chez les sujets ayant déjà un déficit de NO au départ, des bénéfices de santé ont été obtenus après 4 semaines d'entraînement (Hambrecht *et al*, 2003). Par contre, un exercice d'intensité trop élevée altère plutôt la vasodilatation NO-dépendante à cause du fort stress oxydant (Goto *et al*, 2003; Iemitsu *et al*, 2000). Un surentraînement paraît d'augmenter le risque de remodelages vasculaires avec augmentation du diamètre des vaisseaux sans amélioration de la fonction endothéliale (Di Francescomarino *et al*, 2009; Green *et al*, 2012).

L'effet de l'activité physique sur la santé suit une relation dose (quantité d'activité physique) / réponse (conséquence sur la santé). Selon les résultats de plusieurs travaux cette relation entre le niveau d'activité physique et les bénéfices de santé obtenue, peut être décrite à l'aide de trois courbes (Figure 34) (Bouchard, 2001) :

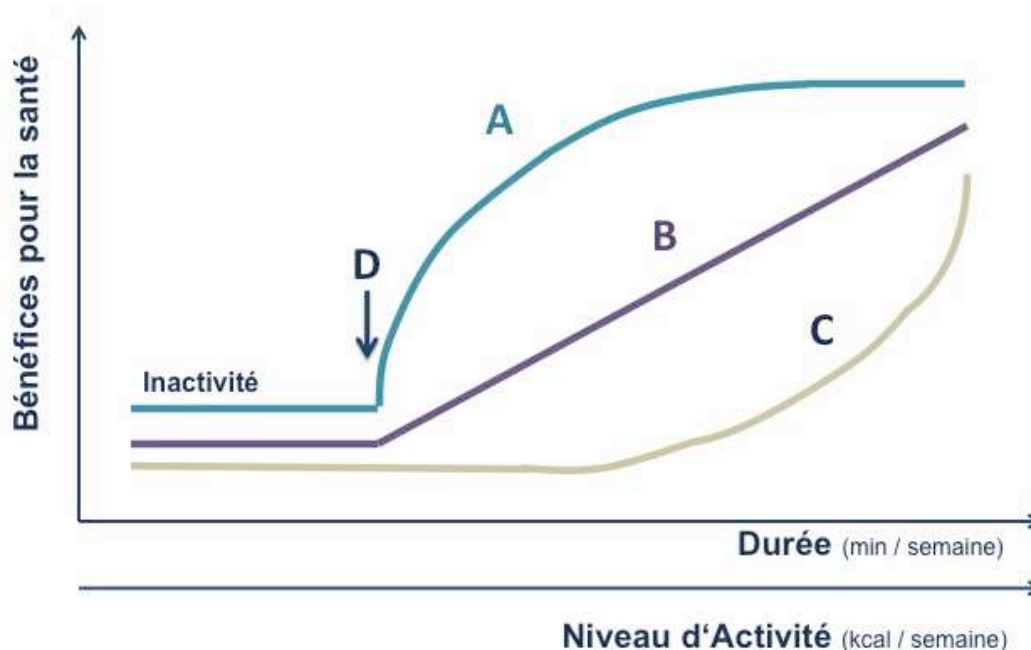


Figure 34. Courbes théoriques dose - réponse des effets du niveau d'activité physique sur la santé.

Adapté d'après (Bouchard, 2001).

La courbe **B** établit une relation linéaire entre la quantité d'entraînement et le bénéfice pour la santé. Plus la quantité d'activité physique augmente, meilleur est l'effet sur la santé. Ceci décrit l'amélioration de l'aptitude physique par l'entraînement régulier.

Selon la courbe **A** des niveaux modérés d'activité physique apportent un bénéfice physiologique substantiel. Le gain est plus grand chez les sujets inactifs qui deviennent modérément actifs (150 min/semaine d'activité physique modérée) que chez les sujets déjà actifs.

La courbe **C** présente un gain de bénéfice de santé uniquement pour les activités physiques intenses et prolongées. Ceci concerne par exemple l'augmentation du réseau capillaire cardiaque. Cependant ces activités doivent être mises en relation avec les risques de blessure qui augmentent avec l'intensité de la pratique physique.

Le point **D** représente la quantité d'activité physique minimale nécessaire permettant d'obtenir un bénéfice. Ce point n'est pas défini avec précision et dépend de la population concernée.

Ce qu'on peut retenir de cette approche est que les bénéfices en terme de santé apportés par la pratique d'une activité physique régulière dépendent de l'intensité, de la durée et de la fréquence de l'exercice et également de la population concernée (Clarkson & Thompson, 2000), et sont généralement plus importants que les risques liés à la pratique. De plus, la

réponse métabolique, hormonale, immunologique et hémorhéologique à l'activité physique peuvent varier d'un individu à l'autre.

IV.3 Exercice et Drépanocytose

1. Problématique de la pratique d'une activité physique aiguë chez les patients drépanocytaires

Chez les patients atteints de la Drépanocytose, l'ensemble des modifications physiologiques issues d'une activité physique aiguë (relargage d'oxygène par l'Hb, augmentation de la lactatémie, la déshydratation et hyperthermie) sont considérées comme facteurs de risque de polymérisation de l'HbS, de la falciformation des GRs, de l'activation et l'inflammation endothéliale, et par conséquent de l'occurrence des CVO.

Chez les patients drépanocytaires, la circulation de repos est déjà accélérée et très sollicitée avec une fréquence cardiaque généralement plus élevée (Alpert *et al*, 1984; Braden *et al*, 1996). L'anémie hémolytique est un mécanisme clé de cette pathologie. Le faible taux en hématocrite et hémoglobine limitent drastiquement la saturation artérielle en oxygène expliquant la récurrence de la fatigue précoce et l'hypoxie chez ses patients lors de la pratique. Les patients qui montrent une hypoxémie au repos sont susceptibles de développer une chute de la SpO₂ à plus de 3% (Campbell *et al*, 2009) même lors des activités d'intensité modérée et légère comme par exemple le test de marche (Waltz *et al*, 2013). En général la transition du métabolisme aérobie et anaérobie se déroule plus tôt et les patients démontrent un faible premier seuil ventilatoire. Il s'ajoute des anomalies au niveau des échanges gazeux (Callahan *et al*, 2002; Delclaux *et al*, 2005). De plus, les changements du pH, de la température corporelle et la diminution en oxygène pendant l'effort intensifient le relargage d'oxygène (Figure 35). Ainsi, la demande supplémentaire en oxygène lors de l'activité physique par des

mitochondries ne peut pas être complètement satisfaite, favorisant la production des radicaux oxygénés libre et une diminution de la performance.

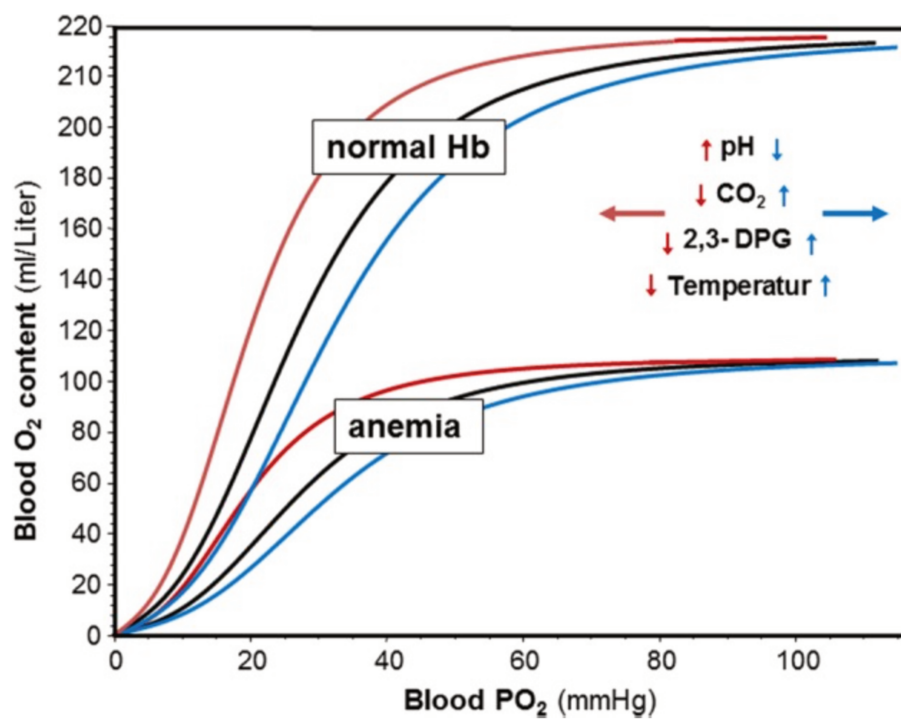


Figure 35. La saturation sanguine en oxygène et l'affinité l'hémoglobine pour l'oxygène

L'effet du taux d'hémoglobine, du pH, de la température et de la concentration en dioxyde de carbone (CO_2) et 2,3-biphosphoglycérate (DPG) sur la saturation sanguin en oxygène et l'affinité l'hémoglobine pour l'oxygène. D'après (Mairbäurl, 2013).

Ainsi un faible taux en hémoglobine diminue la performance (Ledingham, 1977; Carroll, 2006). Les cellules musculaires actives libèrent des ions H^+ , du CO_2 , du lactate et de la chaleur ce qui entraîne une diminution rapide de l'affinité des globules rouges pour l'oxygène.

Un exercice aigu très intense est susceptible de renforcer les altérations hémorheologiques, hématologiques et hémodynamiques, qui sont déjà présents au repos, avec des conséquences de santé nefastes (Platt, 1982). La viscosité sanguine et plasmatique risquent d'accroître et la déformabilité des GRs de diminuer lors des efforts trop longs ou trop intenses (Connes *et al*, 2013a). La viscosité sanguine alors augmentée, associée à la dysfonction vasculaire préexistante sont susceptibles de provoquer un accroissement des contraintes de cisaillement, de l'activation endothéliale, de l'inflammation et de l'expression des molécules d'adhésion

(Gleeson, 2007; Pyne, 1994). Par conséquent, l'écoulement sanguin ralentit favorisant la polymérisation de l'HbS et l'ischémie tissulaire. Les mécanismes sous-jacents de l'ischémie et de reperfusion sont impliqués dans la production des radicaux libres.

Ainsi, il est fortement recommandé aux patients drépanocytaires de respecter les précautions suivantes :

- *éviter la pratique intense de sports avec des sauts répétés sollicitant trop le système articulaire et augmentant le risque de nécrose vasculaire de la tête fémorale (particulièrement en ce qui concerne les sujets atteints de l'ostéonécrose)*
- *éviter les sports de contact en cas de splénomégalie (Jama et al, 2002)*
- *éviter la pratique d'une activité en altitude (< 1500m)*
- *éviter l'apnée et la plongée*
- *éviter les variations de température (ni trop chaud, ni trop froid)*
- *garder toujours une bonne hydratation*
- *éviter les efforts intenses d'endurance à cause d'acidose, hyperthermie, déshydratation (pas > de 20 min.)*
- *éviter la pratique sportive en période d'infection/ d'inflammation*
- *arrêter l'exercice lors des premiers signes de fatigue ou d'essoufflement*

Lorsque les patients drépanocytaires ne suivent pas les précautions ou lorsqu'ils pratiquent un exercice de durée et d'intensité non adaptées, le stress oxydant et l'hémolyse risquent d'augmenter favorisant le développement des complications cliniques.

Depuis quelques années, plusieurs équipes de recherche s'intéressent à déterminer les effets de l'exercice ponctuel sur les mécanismes physiopathologiques impliquées dans la drépanocytose, qui nous amènent aujourd'hui à ne plus placer l'exercice comme un risque mais plutôt comme un nouveau moyen thérapeutique de prévention et de protection. Cependant il n'existe aucune précision concernant la forme, l'intensité et la fréquence d'activité physique recommandées aux patients atteints de cette maladie. Les effets d'un

programme de réentraînement ou d'une activité physique chronique ont été très peu étudiées et testées chez les patients drépanocytaires homozygotes (Barbeau *et al*, 2001). En raison du manque de recommandation précise jusqu'à ce jour, on conseille une activité physique régulière d'intensité très modérée, pratiquée avec beaucoup de précautions mais qui est suffisante pour induire des bénéfices sur la santé.

2. Bénéfices de santé induits par l'activité physique chronique chez les patients drépanocytaires

Peu d'études existent concernant le réentraînement des patients drépanocytaires homozygotes. Néanmoins de récentes études menées chez la souris drépanocytaire (souris Townes et souris SAD) suggèrent qu'une activité physique régulière pourrait conduire à une amélioration du stress oxydant (Charrin *et al*, 2014), de l'inflammation (Aufradet *et al*, 2014; Charrin *et al*, 2017; Aufradet *et al*, 2010) et du profil hémorhéologique (Diaw *et al*, 2015; Faes *et al*, 2015). Quelques études suggèrent que certaines formes d'exercice (gymnastique, ergocycle, marche à pied, thérapie aquatique dans l'eau chaude...) à l'intensité faible et de durée modérée (10-30 min) ne sont pas dangereuses pour les patients et apporteraient même des bénéfices sur le plan clinique (Alcorn *et al*, 1984; Balayssac-Siransy *et al*, 2011; Barbeau *et al*, 2001) tels que :

- une diminution du temps d'hospitalisation et de la douleur ressentie chez les enfants suite à des CVO (Alcorn *et al*, 1984),
- une amélioration de la force musculaire et de l'endurance respiratoire lors d'un entraînement de cinq semaines (Tinti *et al*, 2010)
- augmentation de la biodisponibilité en NO lors d'une activité physique de 30 min pendant trois jours à 70% de la fréquence cardiaque maximale (Barbeau *et al*, 2001)

- une diminution de la viscosité sanguine (Diaw *et al*, 2015; Faes *et al*, 2015) et de l'activation endothéliale (Aufradet *et al*, 2014, 2010)
- une amélioration de la défense antioxydante avec des effets probables sur le stress oxydant et le métabolisme de NO (Charrin *et al*, 2014; Clarkson & Thompson, 2000; Chirico *et al*, 2012). *Ces effets bénéfiques dépendent certainement du niveau hémolytique et de la production des ROS*

En général, on considère qu'une activité physique de 20 minutes à faible intensité (50% de VO_2 max) n'est pas dangereuse pour les patients drépanocytaires (Balayssac-Siransy *et al*, 2011). Un exercice de cette durée sur ergocycle à 50% de la puissance maximale n'a pas montré de modifications hémato-hémorhéologiques ou inflammatoires très importantes (Barbeau *et al*, 2001; Balayssac-Siransy *et al*, 2011).

La pratique régulière d'une activité physique pourrait ainsi avoir des effets bénéfiques sur les marqueurs physiopathologiques impliqués dans le cercle vicieux drépanocytaire et ainsi limiter l'occurrence des CVO. Cependant, jusqu'à présent, très peu d'études ont testé les effets d'un programme de réentraînement chez ces patients.

C. Contribution

Personnelle

*« All you need is Faith, Trust
and a little Pixie Dust »*

Peter Pan

I. GENERALITES DE HYPOSNAD

I.1 Problématique

C'est la circulation sanguine qui répond aux multiples besoins des cellules en ce qu'elle leur fournit les nutriments et l'oxygène nécessaires pour former et renouveler leurs structures et pour produire de l'énergie, et en ce qu'elle permet l'évacuation de leurs déchets métaboliques. Ainsi, les mécanismes de régulation de la fonction vasculaire, aux échelles micro et macrovasculaire, sont vitaux et destinés à fonctionner continuellement. L'harmonie et la coordination parfaites de tout le système vasculaire sont indispensables pour maintenir les ajustements immédiats (Klabunde, 2005). Néanmoins, il existe des caractéristiques hémodynamiques différentes dans la micro et la macrocirculation (Safar & Struijker-Boudier, 2010). De plus, les systèmes micro et macrovasculaires ne disposent pas des mêmes structure et fonction, ni des mêmes mécanismes de contrôle (Safar & Struijker-Boudier, 2010). Pour cette raison, les effets d'un dysfonctionnement vasculaire dépendent probablement du lit vasculaire ou du système circulatoire concerné. Dans la population générale, la réserve vasomotrice est suffisante pour compenser des perturbations du flux sanguin et normaliser les résistances vasculaires (Baskurt *et al*, 2004b; Simmonds *et al*, 2014) quelles que soient les contraintes (exposition au froid, à la chaleur, exercice). Lorsqu'il apparaît une dysfonction vasculaire marquée par la perte du tonus vasomoteur, on assiste à la survenue de complications cliniques sévères tant chez les patients atteints de pathologies cardiaques (Bonetti *et al*, 2003; Heitzer *et al*, 2001; Perticone *et al*, 2001) que dans la population générale (Verma *et al*, 2003). Dans le cas de la Drépanocytose, plusieurs études ont montré que les patients drépanocytaires présentaient une réserve vasomotrice réduite au niveau de la micro (Tharaux *et al*, 2002; Grau *et al*, 2015b) et macrocirculation (Aessopos *et al*, 2007; Belhassen *et al*, 2001; Blum *et al*, 2005; Ranque *et al*, 2012, 2016). Néanmoins, la plupart des études concernent la fonction vasculaire chez des adultes atteints de la Drépanocytose

(Belhassen *et al*, 2001; Tharaux *et al*, 2002; Mohan *et al*, 2011; Gladwin *et al*, 2003). Peu d'éléments permettent actuellement de déterminer si la dysfonction vasculaire se développe déjà dans la petite enfance, et le cas échéant, d'identifier le compartiment vasculaire (micro ou macro) affecté prioritairement. De plus très peu d'études (Mohan *et al*, 2011) ont caractérisé la fonction vasculaire (micro et macro) chez les patients SC et plus particulièrement chez les enfants.

Il existe une grande hétérogénéité dans l'expression phénotypique de cette maladie et en dépit de très nombreux travaux, nous ne disposons pas à l'heure actuelle de marqueurs permettant d'identifier précocement les patients qui développeront les formes les plus sévères de la maladie. Si la relation entre la sévérité clinique du patient drépanocytaire et l'atteinte vasculaire s'avérait puissante, l'évaluation de la fonction vasculaire chez les patients drépanocytaires pourrait permettre de mieux identifier les patients les plus à risque ainsi que de mieux individualiser le suivi clinique de ces derniers.

Notre première partie du projet (nommé HYPOSNAD) visait donc à étudier les fonctions micro- et macrovasculaires et ses déterminants chez les enfants atteints de la Drépanocytose (génotypes SS et SC) en relation avec la sévérité clinique.

I.2 Objectifs de l'étude *Hyposnad*

1. Objectif principal :

Identifier la contribution des altérations micro- et macrovasculaires dans la survenue des complications vaso-occlusives chez les enfants/adolescents drépanocytaires antillais SS et SC). La sévérité clinique était déterminée sur la base (1) du nombre de CVO sur les deux années précédentes l'étude (sévere si $CVO \geq 3$ et non sévère si $CVO < 3$) ou (2) du nombre

de syndrome thoracique aigu (STA sur les 2 années précédentes l'étude (sévère si STA > 0 et non sévère si STA = 0).

2. Objectifs secondaires :

Etudier les déterminants de cette dysfonction vasculaire au niveau

- biologique : paramètres hémorhéologiques/hématologiques, marqueurs du stress oxydatif et du métabolisme du monoxyde d'azote.
- physiologique : activité du système nerveux autonome (SNA) (variabilité de la fréquence cardiaque) et oxygénation cérébrale/musculaire.
- aptitude physique évaluée par le test de marche de 6 minutes et un questionnaire d'activité physique.

Nous avons proposé de compléter le bilan annuel de patients drépanocytaires suivis en pédiatrie à l'Unité Transversale de la Drépanocytose du centre hospitalier universitaire (CHU) de Pointe-a-Pitre par une série d'examens physiologiques non invasifs (enregistrement de la variabilité de la fréquence cardiaque au repos, mesure de la vitesse de l'onde de pouls, évaluation de la vasomotricité périphérique et de l'oxygénation musculaire et cérébrale), un test de tolérance à l'effort (test de marche de 6 minutes) et des prélèvements sanguins capables de renseigner sur les marqueurs cellulaires et moléculaires précédemment cités.

I.3. Patients et critères d'inclusion

La recherche biomédicale HYPOSNAD était une sous étude du projet SAPOTILLE (Epidémiologie et mécanismes physiopathologiques de l'hypertension artérielle pulmonaire chez l'enfant drépanocytaire homozygote SS et hétérozygote SC en Martinique et en

Guadeloupe, suivi sur 3 ans d'une cohorte d'enfants âgés de 8 à 16 ans à l'inclusion ; accord CPP : 2009-A00211-56).

Le projet de recherche biomédicale HYPOSNAD était une étude prospective, monocentrique et transversale avec une période d'inclusion de 18 mois, qui a été proposé aux parents des enfants (10-18 ans), inclus dans l'étude SAPOTILLE, qui étaient suivis régulièrement depuis la naissance par l'Unité Transversale de la Drépanocytose de Pointe-à-Pitre, présentant les deux syndromes drépanocytaires majeurs des Antilles SS ou SC. Pour mieux identifier le niveau de la dysfonction vasculaire, 16 enfants non malades de génotype AA, ayant les caractéristiques anthropologiques comparable aux patients, ont été recruté supplémentaire pour les mesures physiologiques. 12 enfants AA participaient volontairement aux prélèvement sanguins, destinés pour les mesures du stress oxydatif et du métabolisme de NO.

L'étude se déroulait au cours d'une des visites prévue dans le cadre du projet SAPOTILLE, après l'obtention du consentement signé de l'enfant et de ses parents.

1. Critères d'inclusion

Il s'agissait des enfants drépanocytaires de génotypes SS ou SC inclus dans le projet SAPOTILLE, âgés entre 10 et 18 ans, résidant en Guadeloupe, ayant donné avec leurs parents, leur consentement écrit à l'étude HYPOSNAD, cliniquement à l'état de base (à plus d'un mois de toute complication et de trois mois de toute transfusion, n'ayant pas un traitement qui pourraient influencer l'hémorhéologie (en dehors du traitement par hydroxyurée).

2. Critères de non-inclusion

Les critères de non-inclusion restaient les mêmes que ceux définis dans le cadre du projet SAPOTILLE à savoir :

- Autres hémoglobinopathies

- Transfusion ou saignée récente (moins de 3 mois avant le début du protocole)
- Parents ou enfants n'ayant pas donné leur accord pour la participation aux études (SAPOTILLE et HYPOSNAD)
- Parents non affiliés à un régime de sécurité sociale

I. 4 Déroulement de l'étude

Les enfants inclus dans le projet SAPOTILLE ainsi que leurs parents étaient contactés par téléphone par l'un des médecins investigateurs du projet SAPOTILLE pour les pré-informer de la sous étude HYPOSNAD qui leur était proposée, lors de leur prochain passage en hôpital de jour de la pédiatrie du CHU de Pointe-à-Pitre pour le bilan annuel et la visite de suivi de l'étude SAPOTILLE de l'enfant. Lors de cette visite, si l'état de santé de l'enfant le permettait (après un examen médical complet généralement avec échocardiographie et l'exploration fonctionnelle respiratoire. Cependant selon l'état de santé de l'enfant, d'autres examens cliniques ont été ajouté) et si les critères d'inclusion et les critères d'éligibilité étaient favorables, le médecin investigateur informait l'enfant et ses parents des objectifs, du déroulement et des contraintes d'HYPOSNAD et répondait à leurs questions. Si l'enfant ainsi ses parents donnaient leur accord de participation, ils signaient le formulaire de consentement. La durée de participation était d'un jour. Après les examens de suivi, les échantillons sanguins étaient prélevés dans des tubes EDTA à jeun en position assise au niveau de la veine antécubitale. Ensuite, l'enfant prenait son repas et rencontrait une deuxième fois le médecin investigateur pour discuter les résultats cliniques. Ensuite, les enfants réalisaient un test de marche de 6 min et répondaient à un questionnaire d'activité physique. Ensuite, les enfants, accompagnés de leurs parents et d'un investigateur, se rendaient à l'unité transversale de la Drépanocytose pour effectuer les mesures physiologiques (*voir schéma ci dessous*) dans un

cadre sécurisé. La température de la salle a été contrôlée à l'aide d'une climatisation en gardant le confort de chaque patient.

Les caractéristiques cliniques suivantes déjà recueillies chez les patients inclus dans SAPOTILLE étaient utilisées dans l'étude HYPOSNAD :

- génétiques : syndrome drépanocytaire, déficit en G6PD, alpha-thalassémie
- morphométriques : poids, taille, âge, sexe.
- hématologiques : globules rouges, hémoglobine, hémoglobine fœtale, réticulocytes,
- biochimiques : bilirubine totale, lactate déshydrogénase, aspartate aminotransférase
- antécédents cliniques (fréquence, durée) : complications aiguës (CVO, STA, AVC en particulier), et complications chroniques (ostéonécrose, atteinte rénale, rétinopathie par exemple)
- traitements en cours dont l'hydroxyurée (HU)

Toutes les variables mesurées ont été présentées sous la forme moyenne $\pm$ écart type ou médiane (25^e et 75^e percentiles). Les variables, dont leur normalité et l'homogénéité de la variance étaient respectées, ont été comparées entre les sujets AA, SC et SS à l'aide d'une ANOVA à une voie suivie par le post-hoc de Newman-Keuls. Dans le cas échéant, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé. Les variables hématologiques et hémorhéologiques ont été comparées entre les sujets SS et SC à l'aide d'un test de Student. Si la normalité n'était pas respectée, un test de Mann-Whitney a été réalisé. Dans un second temps, la présence des corrélations entre les variables mesurées a été testée par le test de corrélation de Pearson et Spearman. Le seuil de significativité a été déterminé à 5% ce qui n'est normalement pas suffisant selon la correction de Benferroni ($P = 0.016$) en raison de notre petit effectif. Cependant on pourra indiquer des résultats préliminaires. Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du programme SPSS (v20, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL).

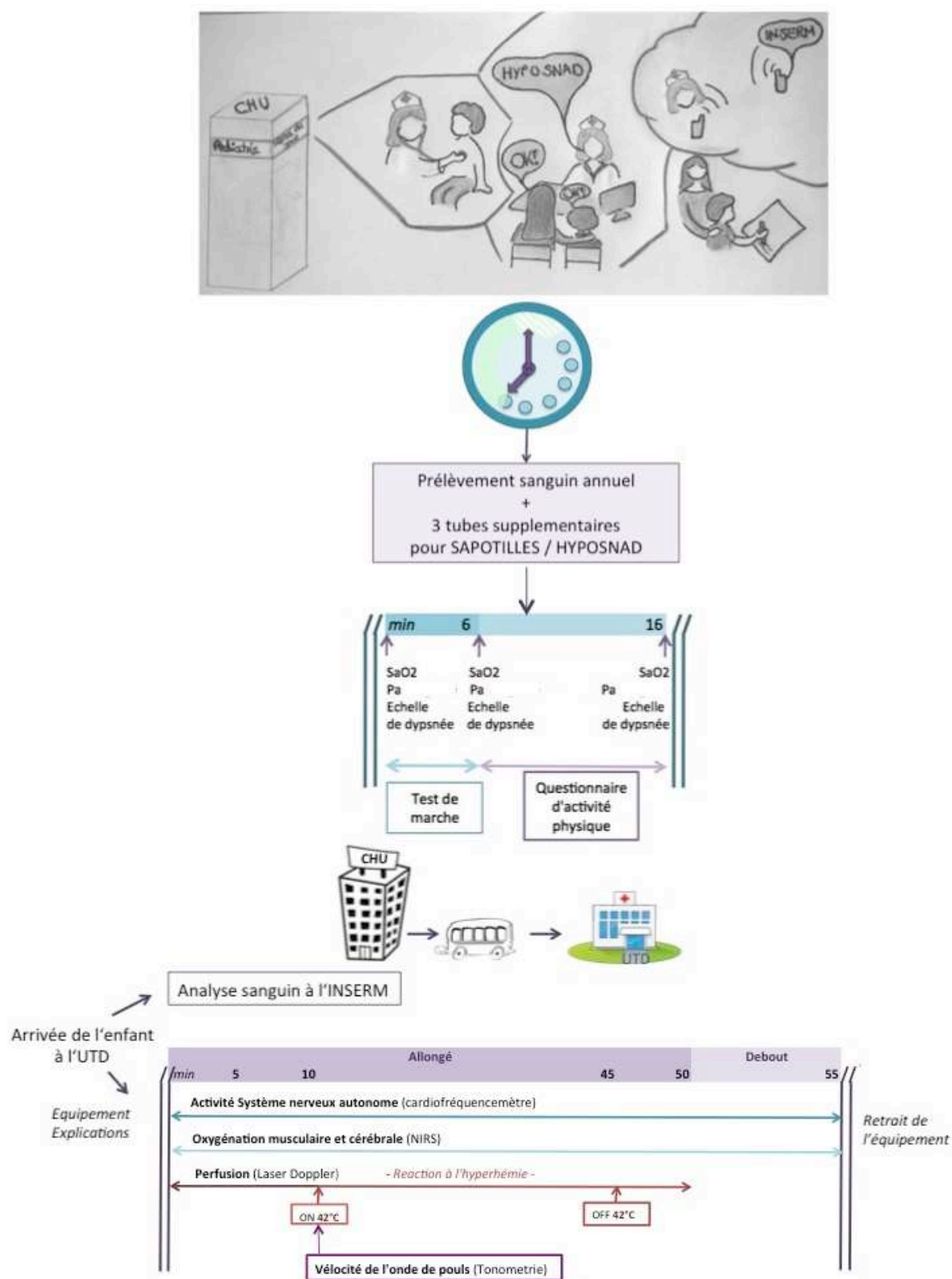


Figure 36. Déroulement de l'étude HYPOSNAD

UTD, unité transversale de la drépanocytose ; CHU, centre hospitalier universitaire de Pointe-à-Pitre ; SaO₂, saturation artérielle en oxygène ; Pa, pression artérielle.

II. MATERIELS METHODES

CARACTERISATION DE LA FONCTION VASCULAIRE

II. 1 Evaluation de la fonction microvasculaire

- PERFUSION PERIPHERIQUE & VASOMOTRICITE -

La microcirculation regroupe les vaisseaux sanguins (artérioles, veinules et capillaires) ayant une taille jusqu'à une dizaine de microns. Le débit sanguin est plus faible au niveau des microvaisseaux. Ceci est dû à la surface totale plus grande qu'ils occupent en coupe transversale (5 cm^2 dans les artères comparé aux 3500 cm^2 dans les capillaires) (*chapitre I.2*). La paroi vasculaire est très fine et composée d'une seule couche endothéliale. Cette caractéristique structurale et l'écoulement lent facilitent les échanges des nutriments (*chapitre I.2*). La perfusion dans les microvaisseaux est dépendante du diamètre vasculaire, de la vascularisation et des caractéristiques du sang. Les propriétés d'agrégation et de déformabilité des GRs jouent également un rôle primordial dans la microcirculation (Baskurt, O. K., & Meiselman, 2003). La mesure de la microcirculation a été effectuée au niveau cutané à la main gauche. La main est vascularisée par l'artère radiale et ulnaire qui sont anatomisées par deux arcades palmaires, superficielles et profondes. Au niveau des doigts, l'apport sanguin se fait principalement par l'artère digitalis palmaris. On remarque une grande variabilité du nombre et de la disposition des artères cutanées palmaires. C'est le derme qui nourrit essentiellement la peau. Du plexus artériel dermique profond partent des collatérales vers les glandes sébacées, les follicules pileux et l'épiderme. De ce plexus émergent vers le derme superficiel des artères de moyen calibre qui forment à nouveau un plexus artériel d'où se détache les artérioles pré-capillaires qui forment des papilles dermiques. La microcirculation cutanée assure la nutrition de l'épiderme, le maintien de la pression artérielle et la thermorégulation. La peau possède également la capacité de tolérer des longues périodes

d'ischémie compressive. En raison des multiples stimuli de vasoconstriction / vasodilatation, présente le calibre des vaisseaux des variations rythmiques locales et le Laser Doppler mesure ces variations du flux sanguin. Ainsi, dans cette étude, la perfusion périphérique et la vasomotricité ont été mesurées en utilisant le principe du *Laser Doppler flowmetry* (LDF) : décalage de la fréquence de la lumière infrarouge entre les mesures à l'émission et à la réception. Le laser pénètre dans la peau à environ 1-1,5 mm de profondeur. Lorsqu'il rencontre les globules rouges circulants, on remarque un changement de sa fréquence. Les érythrocytes circulent à des vitesses différentes faisant varier la fréquence de la lumière réfléchi. Il existe une corrélation linéaire entre le changement du signal et la perfusion. Cependant cette technique ne permet pas de distinguer entre la perfusion des veinules et artérioles.

Nous avons utilisé un appareil LDF (Perimed, Stockholm, Suède; PeriFlux System 5000) avec une longueur d'onde de 780 nm et une fréquence d'échantillonnage de 20 Hz. Le laser a été fixé sur le majeur de la main gauche (Figure 37). Grâce au logiciel (Perisoft, Perimed, Suède), la perfusion (PU), la vitesse d'écoulement (Vélocité VU), la concentration des particules circulantes (CMBC *concentration of moving blood cells*, en majeure partie les globules rouges) et la température cutanée (degré celsius, °C) ont été calculées et enregistrées tout au long de la mesure.

La perfusion tissulaire est le produit de la vélocité et de la CMBC et est exprimée en unité arbitraire PU :

Pour prendre en compte les variations individuelles du flux sanguin liées aux variations de pression artérielle, la perfusion mesurée était divisée par la pression artérielle moyenne (PAM) donnant la conductance du flux cutanée (CVC, cutaneous vascular conductance) (Roustit & Cracowski, 2013), avec la pression artérielle systolique (PAS) et la pression artérielle diastolique (PAD) correspondant respectivement à la pression artérielle systolique et diastolique.



Figure 37. Le Perimed (Stockholm, Suède; PeriFlux System 5000) couplé à la sonde thermique qui permet de générer l'hyperhémie réactive au niveau du doigt de la main gauche avec un indicateur de la perfusion (en PU, à gauche) et de la température cutanée (à droite) en continu.

Le tonus vasculaire est l'ajustement local et automatique du débit sanguin pour distribuer le sang en fonction des besoins énergétiques et métaboliques (Wilmore *et al*, 2009). Toute variation de tonus vasomoteur de repos modifie le diamètre vasculaire et modifie ainsi le débit sanguin local. Ainsi, les vaisseaux sanguins se dilatent en améliorant la perfusion tissulaire. Pour tester la vasomotricité, le système *Laser Doppler Periflux* dispose d'un module thermique qui permet d'augmenter la température cutanée à 42°C, et consécutivement de générer une hyperhémie réactive au niveau du doigt. Cette réponse est biphasique, ses voies de signalisation seront décrites ci-dessous. Brièvement, elle dépend du réflexe axonal, c'est la première réponse rapide, puis de la production locale de NO par les cellules endothéliales source de la deuxième réponse, plus lente (Minson *et al*, 2001) (Figure 38).

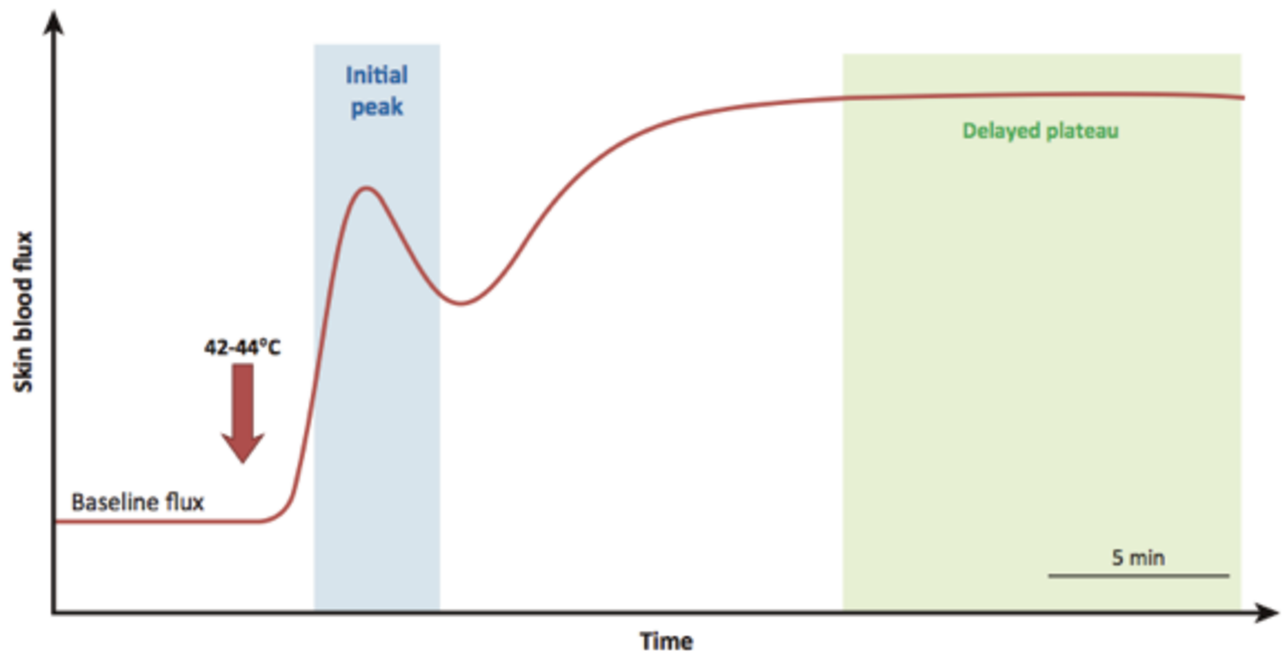


Figure 38. Représentation d'une réponse typique à la chaleur

avec la perfusion (PU) en fonction du temps (min) caractérisée par deux phases : une première vasodilatation liée au réflexe axonal 2-3min après le début du chauffage à 42°C (en bleu) et une deuxième augmentation du flux sanguin qui est NO dépendante, le plateau (en vert).

D'après (Roustit & Cracowski, 2013).

Les voies de signalisations responsables de la réponse biphasique

Dans le cas général on peut observer deux minutes après le début du chauffage une première vasodilatation, le pic initial (Minson, 2010) (Figure 38), qui représente le réflexe axonal et l'activité des nerfs sensoriels (Brunt & Minson, 2011). L'hyperthermie locale est détectée par des récepteurs sensibles à la chaleur comme le *transient receptor potential vanilloid type 1*, TRPV-1 qui se trouve sur les nerfs sensoriels (Wrong & Fieger, 2010). Le potentiel d'action généré déclenche alors la libération de neurotransmetteurs : CGRP, *calcitonin gene related peptide* et la substance P, qui sont responsables du pic initial et de l'augmentation de la PU (Roustit & Cracowski, 2013) (Figure 39).

Le CGRP active un récepteur métabotrophique (CGRP-R) qui active l'adénylate cyclase et l'AMPc-kinase. L'ouverture du canal potassique provoque une hyperpolarisation de la membrane du muscle lisse provoquant la fermeture des canaux calciques. La diminution en calcium provoque la relaxation et donc la vasodilatation des vaisseaux (Figure 39).

La vasodilatation prolongée (deuxième phase de la réponse hyperhémique) est liée à 70% à la production de NO par les cellules endothéliales (Brunt & Minson, 2011) (Figure 38). Sur les cellules endothéliales se trouvent différents récepteurs qui sont stimulés (CGRP-R, TRPV 1, récepteurs adénosine) et qui vont, via l'AMPC et L-arginine (Alderton *et al*, 2001), activer la NO synthase. Le NO produit inhibe la protéine G kinase (PKG) ce qui provoque la fermeture des canaux calciques et également la vasorelaxation (Figure 39). Peu à peu il s'installe une vasodilatation prolongée qui est NO-dépendante et qui atteint un plateau, en théorie environ 30 min après le début du chauffage (Figure 38) (Minson, 2010).

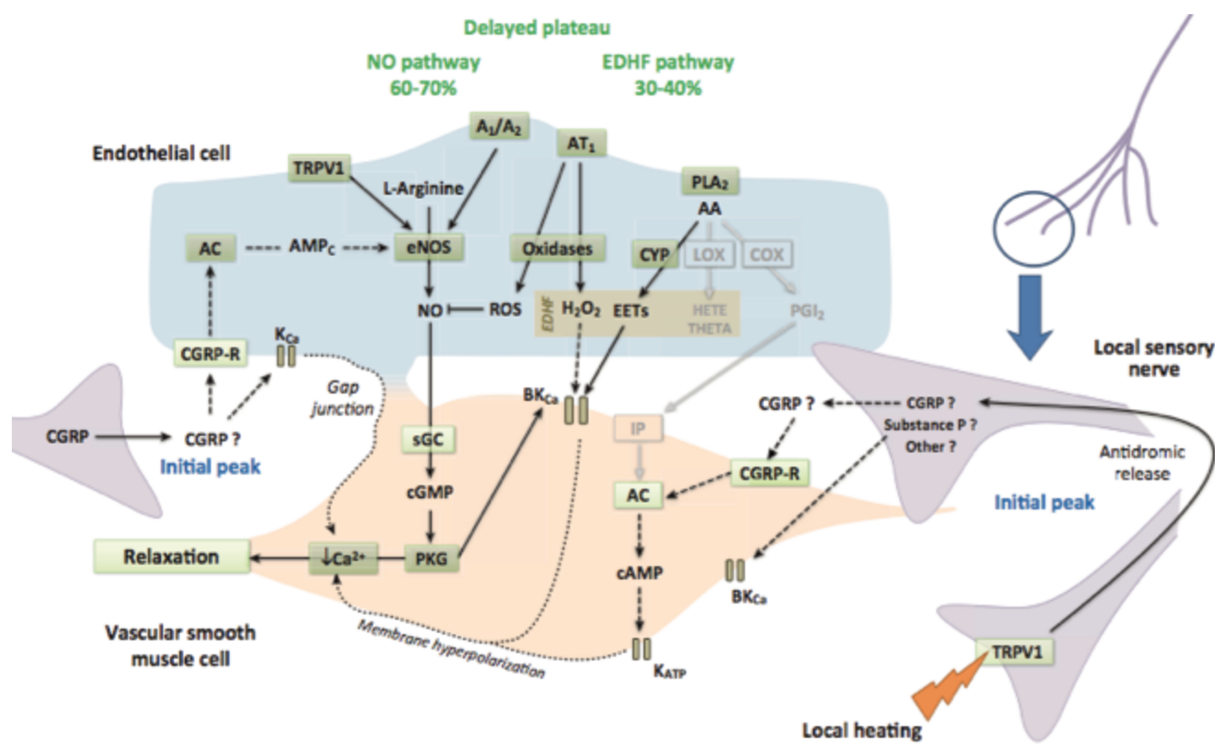


Figure 39. Voies de signalisation en réponse à la chaleur. D'après (Roustit & Cracowski, 2013).

A₁/A₂, récepteurs adénosine A₁ et A₂ ; AA, acide arachidonique; AC, adénylate cyclase; AT₁, angiotensine II récepteur type 1; BK_{Ca}, canal portassiaque BK activé via Ca²⁺; CGRP, peptide relié au gène calcitonine ; CYP, cytochrome P450; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; EETs, epoxyeicosatrienoic acids; eNOS, endothelial NO synthase; HETE, acide hydroxyeicosatétraénoïque; NO, monoxyde d'azote ; PKG, protéine kinase G; PLA₂, phospholipase A₂; ROS, reactive oxygen species (espèces oxygénées réactives); sGC, soluble guanylyl cyclase; THETA, acide trihydroxyeicosatriénoïque ; TRPV1, transient receptor potential vanilloid receptor.

Il s'agit d'une technique non-invasive, reproductible, adaptée aux patients sans limite d'âge, avec une large gamme d'applications. Elle est régulièrement utilisée dans différentes maladies métaboliques (Wilson *et al*, 1992; Monostori *et al*, 2010) et vasculaires (Boignard *et al*, 2005) mais n'avait pas encore été testée chez les patients drépanocytaires. L'intérêt dans cette population est de trouver une alternative à la mesure vasculaire par l'occlusion pour diminuer le risque de générer des complications supplémentaires.

- de la théorie à l'application -

Avant de commencer l'enregistrement, le sujet restait allongé 5-10 min. La température de la salle était contrôlée et le même opérateur plaçait la sonde sur la face dorsale du majeur de la main gauche (Figure 37). Ensuite, il s'agissait, après 10 min d'enregistrement de base, d'augmenter la chaleur de la sonde thermique appliquée sur le doigt jusqu'à 42°C (0.5°C toutes les 5 s) et ensuite d'observer la réponse vasculaire durant 40 min. L'application d'une température de 42°C sur la peau du doigt du patient n'engendre aucune brûlure, ni sensation de douleur (Minson *et al*, 2001). Ce test de réactivité vasculaire en réponse à la chaleur permet de préciser le niveau de la dysfonction vasculaire et de déterminer l'efficacité du système vasculaire.

Au niveau de la microcirculation, il existe des oscillations rythmiques dues aux contractions et relaxations spontanées des cellules musculaires lisses vasculaires (Intaglietta, 1990). On parle aussi de vasomotion (Nilsson & Aalkjær, 2003). Ce phénomène se renforce avec la diminution du diamètre vasculaire et lors des conditions d'hypoperfusion (Intaglietta, 1990). Ces mouvements spontanés sont régulés par des mécanismes d'origine myogénique, endothéliale et neurogénique (activité sympathique du système nerveux) (Nilsson & Aalkjær, 2003). La vasomotion et les fluctuations de pression artérielle et de la fréquence respiratoire provoquent des oscillations du flux sanguin, appelées flowmotion. Pour compenser les altérations hémorhéologiques et les fortes résistances périphériques, le vasomotion chez les

patients drépanocytaires est plus important et le flux sanguin au repos est marqué par de larges oscillations (Rodgers *et al*, 1984a). Une vasomotion élevée permettra d'augmenter l'oxygénation tissulaire (Schmidt *et al*, 1993). Ainsi, une analyse spectrale par transformée de Fourier était conduite sur les 10 min de la perfusion mesuré avant le début de l'hypertermie locale, afin de déterminer les 5 bandes fréquentielles composant le signal (Kvernmo *et al*, 1999) :

Bande 1 : 0.01 – 0.019 Hz (activité endothéliale),

Bande 2 : 0.02 – 0.059 Hz (activité sympathique),

Bande 3 : 0.06 – 0.149 Hz (activité myogénique),

Bande 4 : 0.15 – 0.499 Hz (activité respiratoire),

Bande 5 : 0.50 – 2.00 Hz (activité cardiaque).

La puissance totale du signal (0.01 – 2 Hz) correspondent au flowmotion et les fréquences plus basses correspondent au vasomotion. Les données de vaso- et flowmotion ont été également mesuré en densité spectrale normalisée (en rapport avec la puissance totale du spectre).

II.2 Mesure de la fonction macrovasculaire et estimation de la rigidité artérielle

La macrocirculation regroupe les artères et les veines responsables du transport de l'oxygène, des nutriments vers les tissus et des déchets métaboliques. En outre, ils jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la pulsatilité sanguine. La compliance artérielle au niveau de la macrocirculation est essentielle pour diminuer l'effet pulsatile lié à l'activité cardiaque et pour créer ainsi un flux quasi-constant dans la microcirculation (Boutouyrie, 2008) (Figure 40).

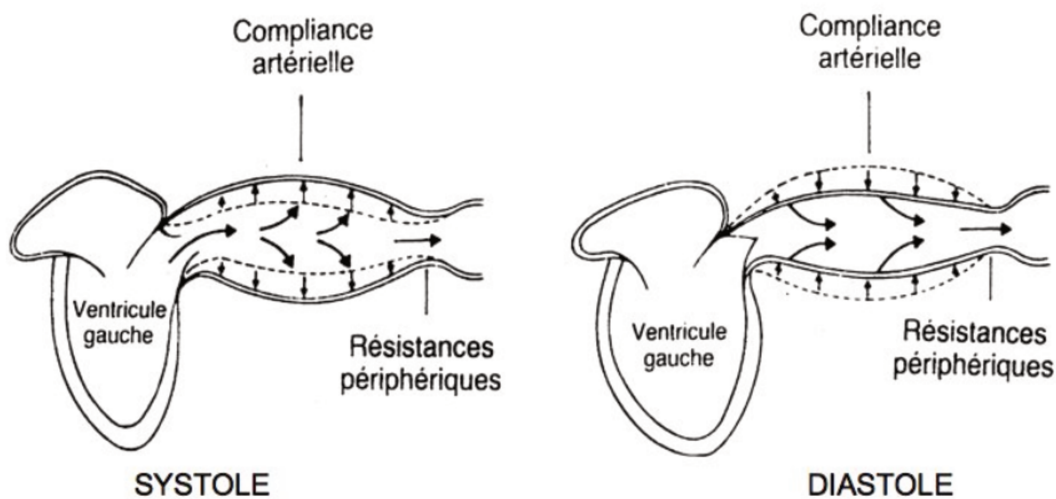


Figure 40. La compliance artérielle

La propriété élastique des grandes artères détermine le niveau de la perfusion périphérique : lors de la systole 60% du volume d'éjection (Pasche *et al*, 2007) n'est pas transmis directement et est conservé dans les grandes artères. Au moment de la diastole ce volume est véhiculé vers les tissus distaux assurant une perfusion continue (fonction de Windkessel).

Lors de la systole une onde de pression est créée qui se propage progressivement le long de la paroi artérielle à une vitesse supérieure à la vitesse du sang (onde incidente). Cette vitesse, appelée vélocité de l'onde de pouls (VOP), varie entre la micro et macrocirculation mais aussi en fonction de la structure et l'élasticité artérielle (entre 5-15 m/sec). La VOP dépend de la densité du sang, du diamètre artériel (plus on s'éloigne du coeur plus le diamètre artériel diminue et plus la rigidité artérielle augmente), de l'épaisseur et de l'élasticité de la paroi artérielle. Plus la paroi artérielle est rigide, plus la vitesse de la propagation de l'onde est élevée. La mesure de la VOP peut être utilisée pour évaluer la rigidité artérielle. L'onde de pouls mesurée est l'addition de l'onde de pression qui se propage de façon antérograde le long de la paroi (onde incidente) et l'onde de réflexion qui se propage de façon rétrograde et remonte vers le coeur (Figure 41a). La réflexion de l'onde est créée par une bifurcation de l'arbre vasculaire. L'onde de pression antérograde et rétrograde est presque identique au niveau des sites périphériques à cause de la proximité de site de réflexion. Il en résulte une

pression systolique élevée. Contrairement, au niveau des artères proximales le retour de l'onde est plus long et les ondes sont décalées (Figure 41a). Lors d'une rigidité artérielle accrue, la vitesse de la propagation de l'onde de pouls augmente. Ainsi, l'onde de réflexion revient rapidement (Figure 41b) augmentant la pression systolique et par conséquent la post-charge ventriculaire gauche. La fréquence cardiaque augmente également. La chute de la pression diastolique peut favoriser une ischémie myocardique. La perte d'élasticité artérielle conduit à une élévation de la pression dans la microcirculation (Dart & Kingwell, 2001) créant des lésions tissulaires et endothéliales (Mitchell, 2008).

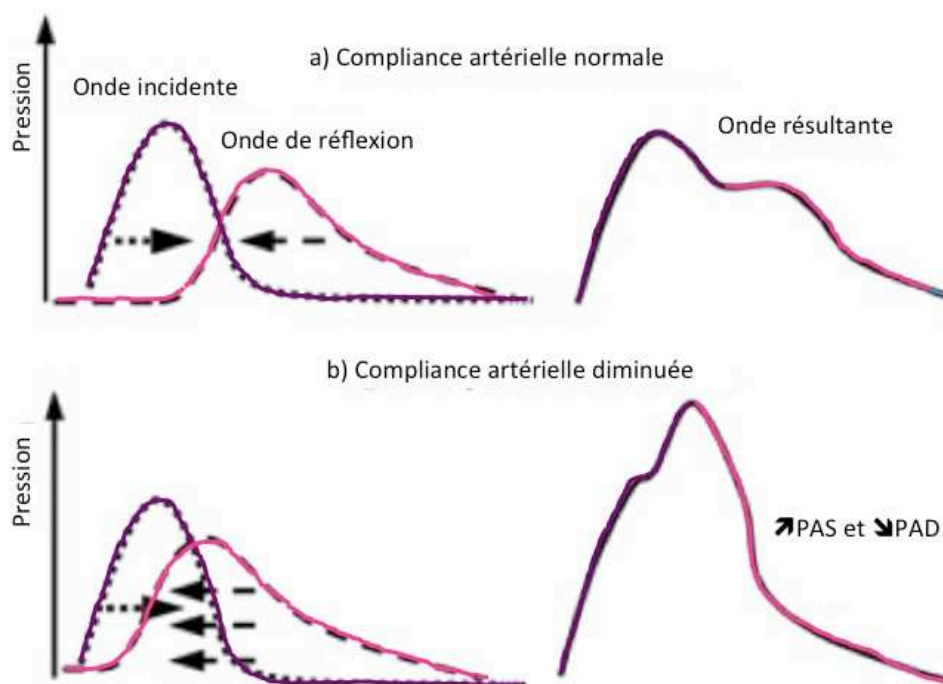


Figure 41. L'onde de pression en fonction de la compliance artérielle

a) compliance artérielle normale, b) compliance artérielle diminuée, avec un retour précoce de l'onde de réflexion augmentant la pression systolique par superposition de l'onde incidente et réfléchie. D'après (Pasche *et al*, 2007).

La mesure de la vitesse de l'onde de pouls par tonométrie d'applanation (SphygmoCor® ; Actor, Sydney, Australie) permet d'estimer la rigidité artérielle et ainsi une atteinte du système artériel. Il s'agit d'une méthode non-invasive et reproductible (inter et intra-

opérateur) (Crilly *et al*, 2007) déjà bien connu pour mesurer la fonction macrovasculaire chez les patients atteints de la Drépanocytose. La mesure était utilisée au repos en position allongée (durée 10 min), avant la réalisation du test hyperhémique à la chaleur.

Il s'agissait de mesurer la VOP au niveau de deux voies de circulation principale :

- la VOP entre l'artère carotide et l'artère fémorale (**VOP carotido-fémorale**, VOP-CF), représentant la fonction macrovasculaire centrale
- la VOP entre l'artère carotide et l'artère radiale (**VOP carotido-radiale**, VOP-CR) pour la macrocirculation périphérique.

Ces mesures étaient effectuées deux fois et la moyenne des valeurs était prise en compte. L'opérateur plaçait le tonomètre perpendiculaire à l'artère. La mesure était enregistrée seulement à l'obtention d'un bon signal pour plusieurs cycles cardiaques.

Les ondes de pression étaient enregistrées tour à tour sur les deux sites, impliquant l'enregistrement parallèle du rythme cardiaque.

La vitesse de l'onde de pouls décrit le temps de propagation de l'onde de pression entre deux sites (ex. entre l'artère carotide et l'artère radiale, T1-T2) (dt, en sec) en fonction de la distance parcourue (dL, en m) :

Le temps de transit de l'onde est décrite comme la différence entre le décalage du pic de l'onde R de l'électrocardiogramme (ECG) et le pied de l'onde de pression distale mesuré (T1) et le décalage du pic de l'onde R de l'ECG et le pied de l'onde de pression proximale (T2) (Figure 42).

La distance ΔL , est la différence de distance (m) (mesuré par un ruban-centimètre) entre le creux-sous-sternal-l'artère carotide et le creux-sous-sternal-l'artère radiale/ou fémorale.

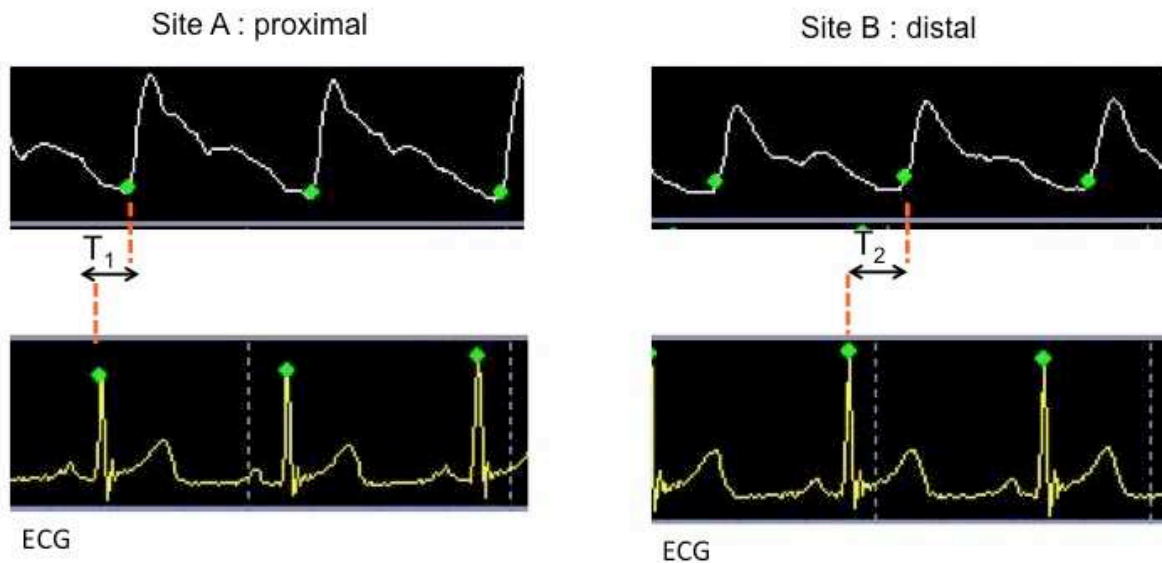


Figure 42. Calcul du temps de transit de l'onde de pouls à l'aide d'un tonomètre.

(Extrait des données)

Les mesures ont été réalisées

- dans une pièce calme à une température stabilisée
- le sujet était au repos, en position allongée depuis au moins 10 minutes
- le sujet ne parlait pas, ne dormait pas
- même période du jour (début d'après-midi)
- au moins 1h après le repas

La mesure de la VOP permet une prédiction du risque cardiovasculaire, et un suivi du développement des dommages vasculaires notamment chez les patients à risques (hypertendu, obèse, diabète, sédentaire...) mais peu d'études (Ranque *et al*, 2014, 2016) se sont intéressées à l'évaluation de la rigidité artérielle chez les enfants atteints de la drépanocytose.

D'autres paramètres étaient également mesurés : la fréquence cardiaque (FC, bpm), la pression sanguine systolique et diastolique (PAS, PAD, mmHg), la pression artérielle moyenne (PAM, mmHg) et la pression pulsée (PP, mmHg). L'ensemble de ces mesures (VOP et réponse à l'hyperthermie) nous permettait de préciser le niveau de l'altération vasculaire dans les différents segments artériels. La mesure de la VOP ne représente aucun danger pour les patients.

EVALUATION DES FACTEURS INFLUENCANT LA FONCTION VASCULAIRE

II.3 MESURES HEMATO-/HEMORHEOLOGIQUES

Le débit sanguin dépend de la pression artérielle moyenne et des résistances périphériques, décrit par la *Loi d'Ohm (chapitre I.3)*. La résistance est la force qui s'oppose à l'écoulement du sang. Elle est dépendante de la longueur totale des vaisseaux sanguins (dépendante de l'âge) et du diamètre vasculaire et de la viscosité y compris les propriétés du flux sanguin (*Théorie de Poiseuille, chapitre I.3*). Cependant la *Loi de Poiseuille* considère que la viscosité sanguine et les propriétés géométriques sont indépendantes, ce qui n'est pas le cas. Le sang est un fluide non-newtonien (Haynes & Burton, 1959). Ainsi, sa viscosité dépend de la contrainte de cisaillement appliqué sachant que l'activité vasculaire intervient également. Il est rhéofluidifiant : sa viscosité diminue quand le taux de cisaillement augmente et thixotrope : sa viscosité diminue avec le temps lors d'une contrainte constante et on ne retrouve la viscosité initiale qu'après un certain temps plus au moins long (Huang *et al*, 1987). Il est également viscoélastique, c'est-à-dire qu'il y a écoulement seulement à partir d'une valeur critique de contraintes (Thurston, 1972). De plus la viscosité est modulée par d'autres facteurs hémorhéologiques tels que la déformabilité et l'agrégation des globules rouges. La Drépanocytose est une maladie qui affecte de manière multiple les éléments figurés du sang et son comportement, causant des anomalies biologiques de grande hétérogénéité. Par conséquent, pour caractériser la fonction vasculaire il était indispensable de déterminer le profil hémato-/hémorhéologique des sujets.

1. Le prélèvement sanguin

Pour chaque patient, deux tubes de 5 ml sur EDTA étaient prélevés, dédié à l'étude des paramètres hématologiques et hémorhéologiques (tube EDTA-1 conservé à température ambiante) et des marqueurs du stress oxydatif et du métabolisme du NO (tube EDTA-2 conservé à +4°C). Les marqueurs hémorhéologiques étaient analysés rapidement (moins de 2 heures après le prélèvement) pour éviter des altérations liées aux conditions de stockage (Baskurt *et al*, 2009).

Le prélèvement sanguin au niveau de la veine antécubitale été réalisé à jeun en position assise après au moins 10 min de repos et avant le test de marche et des mesures physiologiques. Toutes les analyses sanguines étaient effectuées en accord avec le guide international des bonnes pratiques en hémorhéologie (Baskurt *et al*, 2009). Douze enfants contrôles ont également été prélevés pour le dosage du stress oxydatif et du métabolisme du NO.

2. Mesure de l'hématocrite

L'hématocrite désigne le volume (en pourcentage) occupé par les éléments figurés du sang majoritairement les globules rouges par rapport au volume du sang total. L'hématocrite est le plus important déterminant de la viscosité dans les vaisseaux sanguins plus larges particulièrement à des vitesses de cisaillement faible (Cokelet & Meiselman, 2007). Dans la population générale, les variations d'hématocrite sont bien compensées par la vasomotricité (Başkurt *et al*, 1991). L'hématocrite diffère au niveau de la macro et microcirculation et on remarque même une hétérogénéité entre les branches d'une même bifurcation. L'accélération du flux sanguin avec la diminution du diamètre vasculaire provoque une migration axiale des globules rouges et une formation d'un manchon plasmatique à la périphérie (Figure 43). Les globules rouges centrés migrent à une vitesse plus élevée que le plasma (l'effet Faraeus). Le manchon plasmatique facilite le glissement réduisant l'énergie nécessaire à l'écoulement, ce

qui se traduit par une diminution de la viscosité. Ainsi la viscosité apparente du sang est plus faible dans la microcirculation que dans la macrocirculation (effet Fahraeus-Lindqvist). Au niveau des capillaires les plus petits, les globules rouges circulent en file indienne et le manchon plasmatique devient très fin, ce qui conduit à une ré-augmentation de la viscosité.

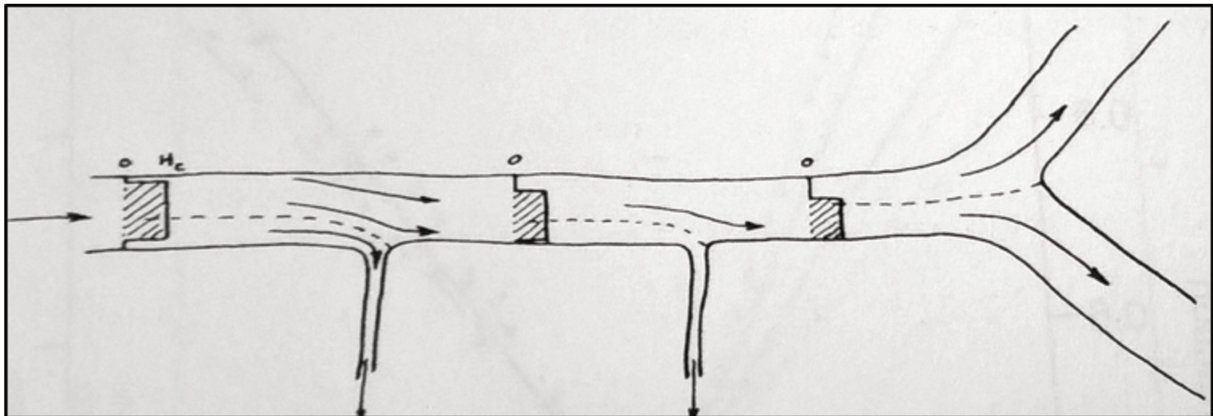


Figure 43. Répartition inégale de l'hématocrite.

Le flux sanguin microcirculatoire se caractérise par une répartition inégale entre le plasma et les globules rouges. Au niveau des bifurcations, c'est le débit sanguin qui détermine la répartition des globules rouges ; un débit plus fort donne une proportion de globules rouges plus importante. Certaines microvaisseaux sont même perfusés seulement par du plasma (*plasma skimming*/ écrémage plasmatique) (Cokelet, 1999).

Après l'homogénéisation du sang prélevé, 40µL ont été pipeté dans deux capillaires respectivement. Ensuite les éléments figurés du plasma ont été séparés par micro-centrifugation (10 min à 12000 rpm, 20°C, Hettich Zentrifugen MIKRO 220R) et l'hématocrite a été déterminé (en %) à l'aide d'une règlette (Hawksley micro-Hématocrite Reader, UK) (Figure 44).

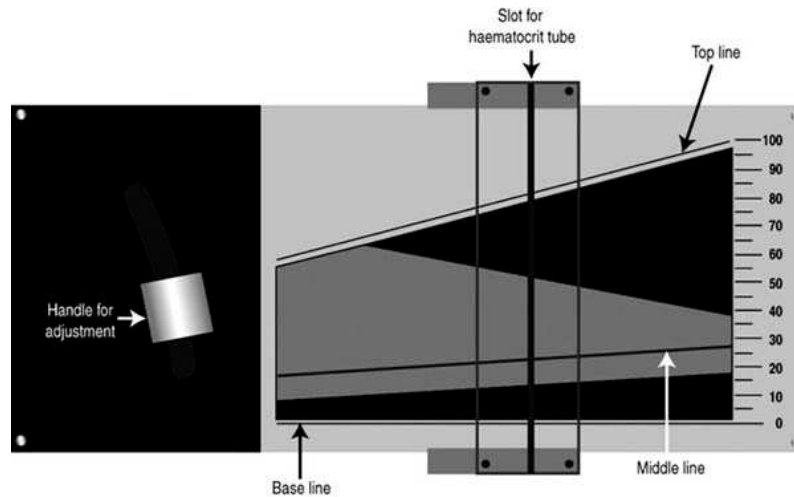


Figure 44. Réglette de mesure de l'hématocrite (Hawksley micro-hematocrit reader).

3. Mesure de la viscosité sanguine

La viscosité sanguine est la résistance intrinsèque du sang à son écoulement. Elle est définie par le rapport entre la contrainte de cisaillement (forces tangentielles de frottement qui s'exercent entre les différentes couches des fluides parallèles) sur la vitesse de cisaillement. La viscosité est influencée par plusieurs facteurs (Figure 45), parmi eux l'hématocrite est le plus important déterminant de la viscosité sanguine. La viscosité à faible vitesse de cisaillement est dépendante des propriétés d'agrégation érythrocytaire alors qu'à des vitesses plus élevées elle est influencée par la déformabilité érythrocytaire.

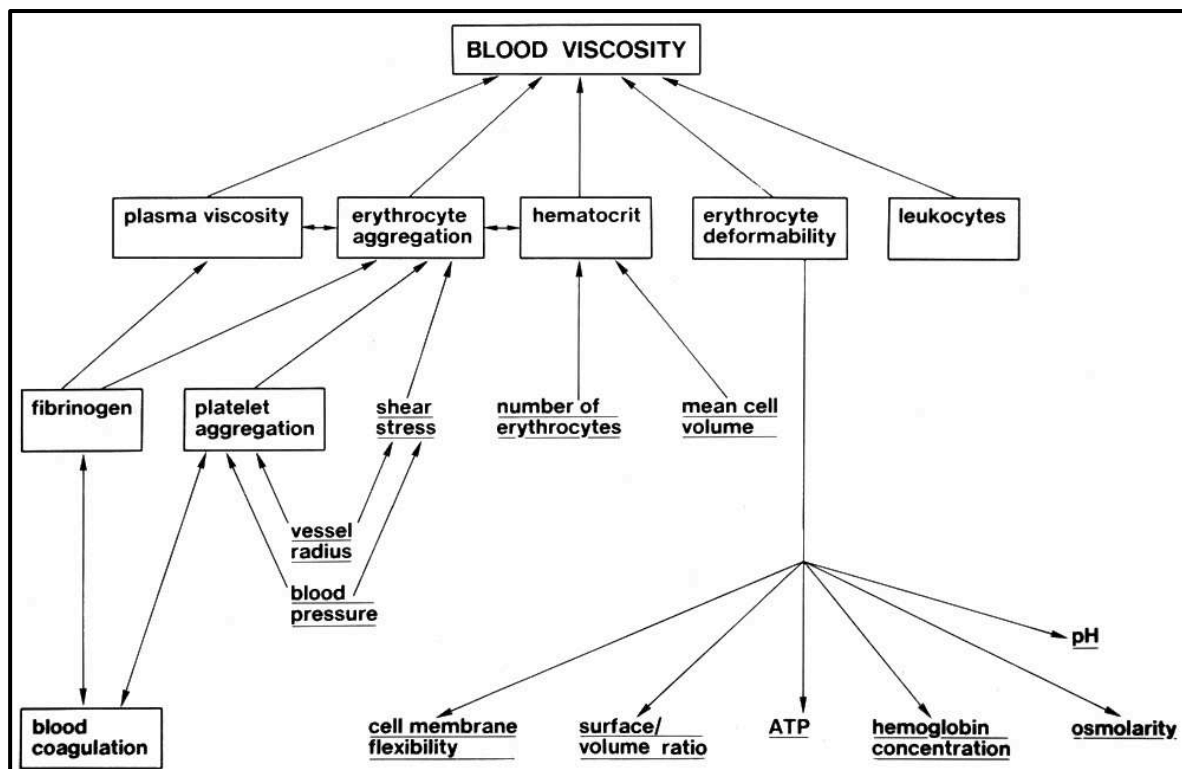


Figure 45. Les facteurs sanguins influençant la viscosité sanguine

La viscosité sanguine est dépendante de la viscosité plasmatique, des propriétés d'agrégation érythrocytaire, de l'hématocrite, de la déformabilité érythrocytaires et des globules blancs (de gauche à droite). Ces déterminants sont eux-mêmes dépendants de plusieurs facteurs. L'activité vasculaire, non mentionné sur le schéma, exerce un contrôle essentiel sur la viscosité sanguine (Baskurt *et al*, 2004b) : en effet les modifications du diamètre vasculaire vont se traduire par des changements de vitesse de cisaillement qui vont affecter la viscosité sanguine in-vivo.

La viscosité sanguine était mesurée à l'aide d'un viscosimètre cône-plan (Brookfield, modèle LVDV-II+PRO, cône CPE 40) (Figure 46), sur 500 μL du sang oxygéné (au moins 10 min), à hématocrite natif et à 3 vitesses de cisaillements : 45, 90 et 225 s^{-1} .



Figure 46. Le principe du viscosimètre cône-plan.

Le viscosimètre cône-plan comprend un cône mobile et une cuve fixe dans laquelle se trouve le sang (le plan). Le cône est fixé sur un axe mesurant et enregistrant les contraintes de cisaillement exercées par le sang. L'enregistrement de la vitesse et la régulation du rotor se fait sur le boîtier au dessus de l'axe. La vitesse de cisaillement est le rapport entre la vitesse de rotation, augmentée manuellement de manière croissante (due aux caractéristiques thixotropes du sang), et la distance entre le plan et le cône (calibrer à vide avant toute mesure). Ainsi on obtient la viscosité à partir des contraintes et de la vitesse de cisaillement. La valeur a été retenue après 30 secondes de rotations afin d'obtenir des valeurs stables. La viscosité fluctue beaucoup à des vitesses inférieures à 45s^{-1} avec ce type de viscosimètre. Ainsi la viscosité a été retenue pour 3 vitesses de cisaillements : 45, 90 et 225s^{-1} .

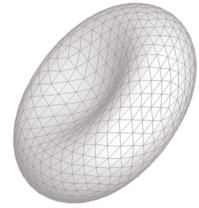
4 Mesure de la déformabilité erythrocytaire

Les globules rouges sont capables de se déformer. Cette déformation est réversible dans une certaine mesure. Elle est indispensable pour le passage dans la microcirculation et pour diminuer les résistances vasculaires, du fait que le rayon des capillaires est inférieur à la taille du globule rouge. Par ailleurs, la déformabilité est un déterminant important de la viscosité au niveau des capillaires.

La déformabilité érythrocytaire est dépendante de trois facteurs

(Mohandas & Chasis, 1993) :

- la viscosité intra cytoplasmique, dépendante de la concentration cytosolique en hémoglobine. Lorsque les GRs sont déshydratés, cette viscosité augmente et la déformabilité diminue.
- l'excès de surface grâce à sa forme discoïde
- les propriétés viscoélastiques de la membrane qui se retrouve libre autour du cytoplasme



Les altérations de la déformabilité érythrocytaire font partie du schéma physiopathologique des crises vaso-occlusives drépanocytaires ; le temps de transit des globules rouges augmente au niveau des capillaires favorisant le relargage de l'oxygène et ainsi la polymérisation et le risque de survenue des occlusions vasculaires douloureuses. Une perte de déformabilité érythrocytaire peut augmenter les résistances vasculaires totales jusqu'à 80% dans les cas où il n'y pas de compensation vasomotrice (Baskurt *et al*, 2004b). Dans nos études, la déformabilité érythrocytaire était mesurée par ektacytométrie (diffraction laser) à l'aide du LORCA (Laser assisted optical rotational cell analyzer, LORCA, R&R Mechatronics, Hoorn, Pays-Bas) (Figure 47) à 37°C pour 9 contraintes de cisaillement (de 0,3 à 30 Pa).

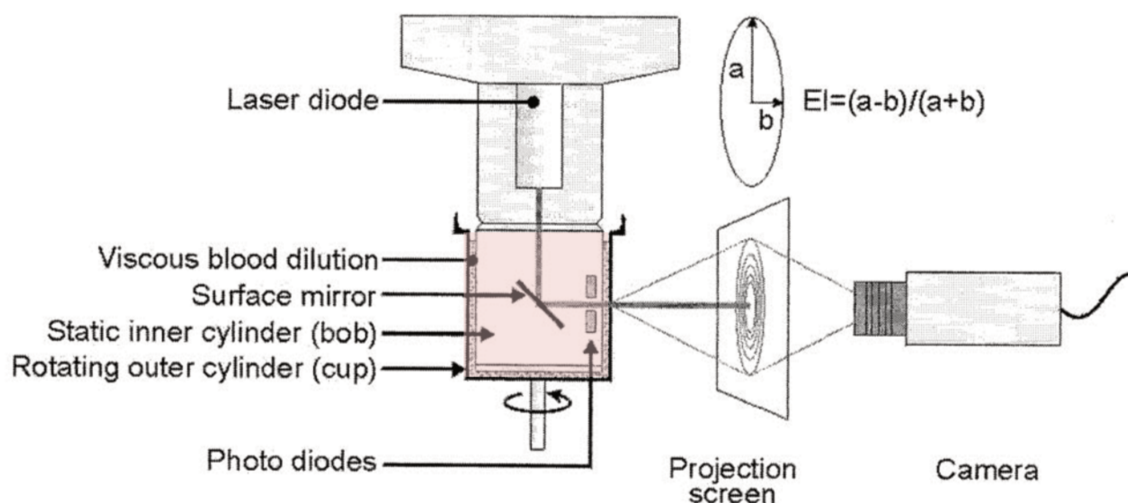


Figure 47. Principe de l'ektactométrie (LORCA). D'après (Hardeman *et al*, 2007)

Cet appareil est composé d'un cylindre fixe (qui contient un miroir pour dévier le laser, émis par la partie supérieur), d'un cylindre mobile (Rotation à 9 vitesses différentes) et une camera qui enregistre le spectre de diffraction moyen de l'ensemble des globules rouges de la suspension. Dans l'entrefer se retrouve 1mL du sang oxygénée, mélangé avec le polyvinylpyrrolidone (PVP) (à une concentration de 2 μ L de globule rouge par mL de PVP (soit un hémocrite de 0,2 %), ceci est nécessaire pour connaître la viscosité afin de générer les contraintes de cisaillement à l'aide de la rotation du cylindre). Ainsi le laser émet une lumière à 670nm qui traverse le mélange sang/PVP. Les globules rouges diffractent la lumière et le pattern de diffraction est ensuite projeté sur un écran et enregistré par une camera. A l'aide du pattern de diffraction on obtient l'indice d'élongation (EI) calculé à partir de la largeur et longueur d'ellipse.

Dans le cas général, plus la contrainte de cisaillement exercée est importante, plus l'indice d'élongation est élevée et plus la déformabilité est haute jusqu'à atteindre une valeur plateau (Elongation maximale) (Figure 48). Chez les patients drépanocytaires SS, une quantité importante de globules rouges se déforment peu et l'indice d'élongation est réduit comparé aux sujets sains (Figure 48).

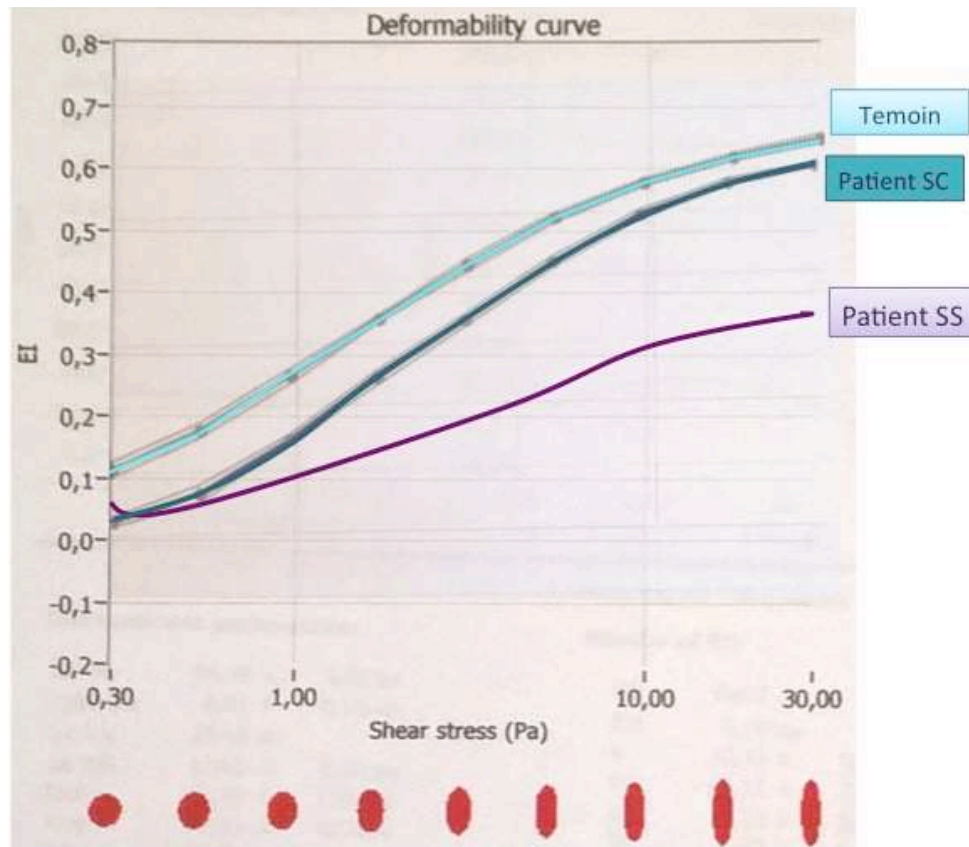


Figure 48. Courbe de l'indice d'élongation en fonction des contraintes de cisaillement (shear stress) appliquées ; en bleu, la courbe d'un témoin adulte de génotype AA et en vert la courbe d'un patient drépanocytaire de génotype SC, et en violet d'un patient drépanocytaire SS ; en bas le pattern de diffraction du sujet contrôle, le pattern pour la courbe vert et violet ne sont pas représentés. *Extrait des données de Hyposnad.*

Dans la Drépanocytose les cycles répétés de falciformation et défalciformation des globules rouges affectent fortement l'élasticité membranaire en diminuant sa déformabilité (Havell *et al*, 1978; Nash *et al*, 1984). Une proportion non négligeable de globules rouges sont très rigides et irréversiblement falciformés (Figure 49). Une déformabilité réduite diminue l'effet de la migration axiale et l'épaisseur du manchon plasmatique (Hightower, *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2009). Ceci peut avoir un effet néfaste sur la vasomotricité (Makena Hightower, *et al*, 2011). Le manchon plasmatique sépare le NO de l'hémoglobine permettant sa diffusion vers les cellules musculaires lisses et ainsi le maintient de la biodisponibilité en NO (Butler *et al*, 1998).

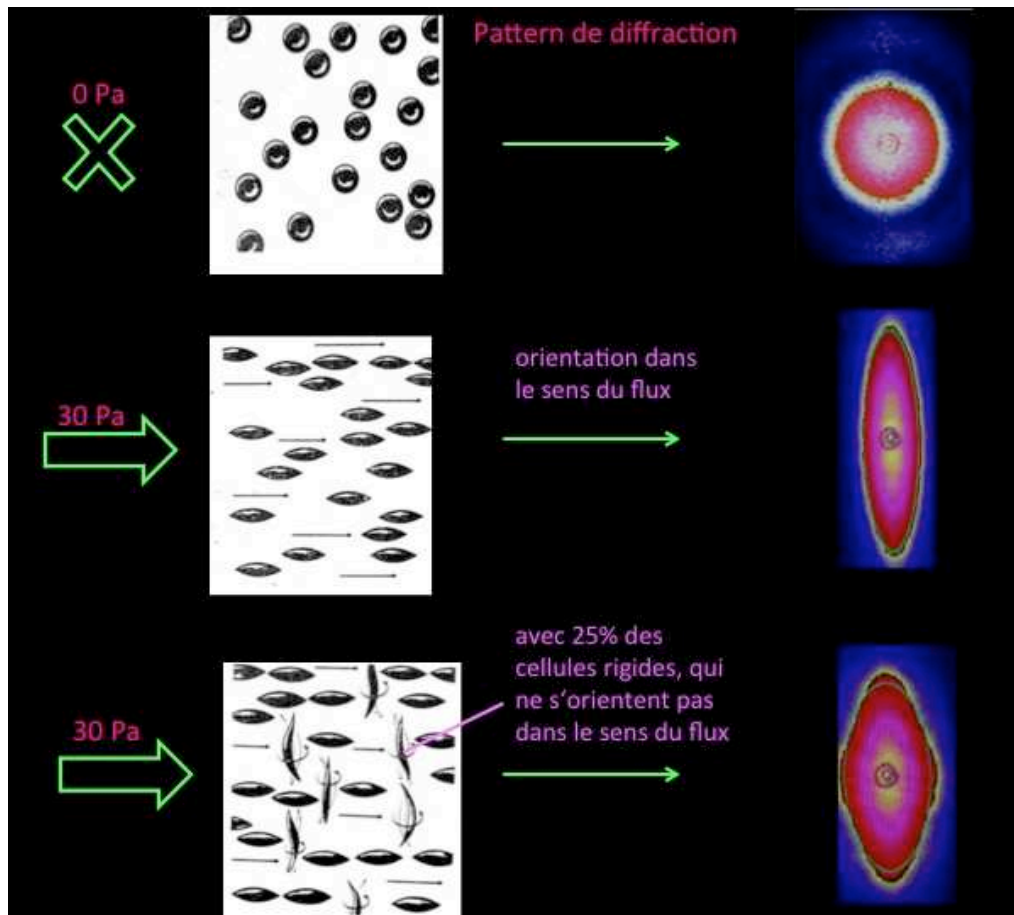


Figure 49. Pattern de diffraction en fonction des contraintes de cisaillement.

En haut, en absence de contrainte de cisaillement; au centre à 30Pa avec des globules rouges très déformables qui s'orientent dans le sens du flux en diminuant la viscosité sanguine ; en bas à 30 Pa en présence de globules rouges rigides (25%) qui ne s'alignent pas dans le sens du flux et augmentent les résistances intrinsèques à l'écoulement et ainsi la viscosité. A l'aide du pattern de diffraction on pourra déterminer la présence des globules rouges rigides dans la circulation concernée.

5. Mesure de l'agrégation et desagrégation érythrocytaire

Le phénomène d'agrégation érythrocytaire affecte la viscosité sanguine surtout à des vitesses de cisaillement faible (Chien, 1975; Reinke *et al*, 1987). Lorsque les agrégats arrivent dans les zones vasculaires à vitesse plus élevée ils se dissocient. L'agrégation érythrocytaire dépend de la tendance des globules rouges à former des agrégats (agrégabilité érythrocytaire) et des facteurs plasmatiques favorables à ce processus (comme par exemple le contenu en

fibrinogène) (Rampling *et al*, 2004). Il existe deux théories principales pour expliquer l'agrégation des globules rouges :

- (1) Selon la théorie du *bridging model* la formation d'agrégats érythrocytaires est possible quand les forces de liaison dépassent les forces de désagrégation (Neu & Meiselman, 2002).
- (2) La *depletion theory* propose que l'agrégation érythrocytaire a lieu lorsque les concentrations protéiques, proches de la surface cellulaire sont faibles par rapport au milieu de suspension. Par conséquent, un gradient osmotique se produit qui provoque le rapprochement entre les cellules (Bäumler *et al*, 1996).

La force de désagrégation représente la force nécessaire pour rompre les agrégats et ainsi pour séparer les GRs. Les propriétés d'agrégation/désagrégation érythrocytaires ont été étudiées par syllectométrie (mesure de la variation de l'intensité de la lumière réfléchie au cours du temps présentée plus bas) (Figure 50) à l'aide du LORCA (Figure 47). Après ajustement de l'hématocrite de l'échantillon à 40%, 1ml du sang oxygéné est placé dans l'entrefer d'environ 0,3mm entre les deux cylindres (Figure 47). Le cylindre en bas est mobile et contient le moteur de rotation. Le cylindre au-dessus de celui-ci contrôle la température et émet le laser à une lumière de 670 nm. Les mesures commencent quand la température atteint 37°C. La réflexion du laser par les GRs varie en fonction de la taille des agrégats, renseignant sur le processus de formation des agrégats érythrocytaires.

a) Mesure de l'agrégation érythrocytaire avec l'agromètre LORCA

L'échantillon est cisailé à forte vitesse de cisaillement (800 s^{-1}) pour séparer les agrégats érythrocytaires préexistants. Ensuite le moteur s'arrête brusquement et les GRs reprennent leur forme normale biconcave. A ce moment là, la lumière réfléchie (*backscatter intensity*, I_{sc}) atteint son maximum ($I_{sc\text{top}}$), ceci diminue ensuite en fonction de la tendance des GRs à

s'agréger (Figure 50). Plus l'intensité de la lumière réfléchie diminue rapidement, plus l'agrégation érythrocytaire sera élevée. D'abord on observe l'apparition de la formation des rouleaux en 2D, représentée par une forte diminution de la lumière réfléchie. Dans une dernière étape ces rouleaux s'associent pour former les agrégats en 3 dimensions. En traçant la variation de l'intensité de la lumière réfléchie par les érythrocytes au cours du temps on obtient une courbe appelée syllectogramme :

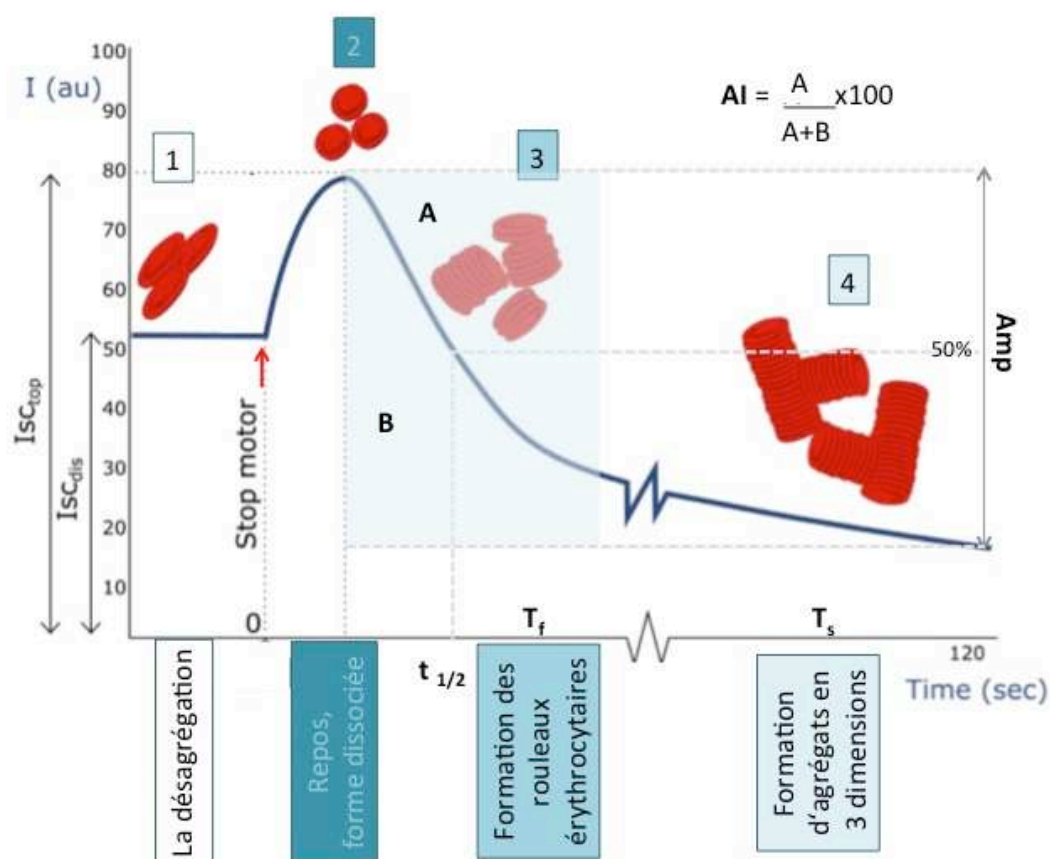


Figure 50. Le syllectogramme.

Variation de l'intensité de la lumière réfléchie par les érythrocytes (I, en unité arbitraire au) au cours du temps (en secondes) et en fonction de leur degré d'agrégation, d'après le modèle de Hardemann (Hardeman *et al*, 2007).

Différents indices sont obtenues à l'aide du syllectogramme :

- l'indice d'agrégation (AI, en %) (taux d'agrégation sur un période de 10 secondes par rapport à la quantité totale d'agrégats formé). AI est donné par la relation : $AI = \frac{A}{A+B} \times 100$ avec l'aire au dessus de la courbe (A) entre Isc top et 10 secondes après ce moment et B l'aire sous la courbe.

- le temps nécessaire pour la formation des rouleaux (T_f , T_{fast} en s) (troisième étape)
- le temps nécessaire pour la formation des agrégats en 3 dimensions (T_s , T_{slow} en s) (quatrième étape)
- la quantité totale des agrégats formés après 120 secondes (amplitude, Amp en au)
- le temps nécessaire pour la formation de 50% des agrégats total ($t_{1/2}$, en s)

b) Mesure de la désagrégation érythrocytaire

La désagrégation érythrocytaire correspond à l'état où les GRs sont complètement séparés. Elle est représentée par le seuil de désagrégation érythrocytaire (γ at dIsc min, en secondes), c'est la vitesse de cisaillement minimale nécessaire pour rompre les agrégats érythrocytaires (Figure 51).

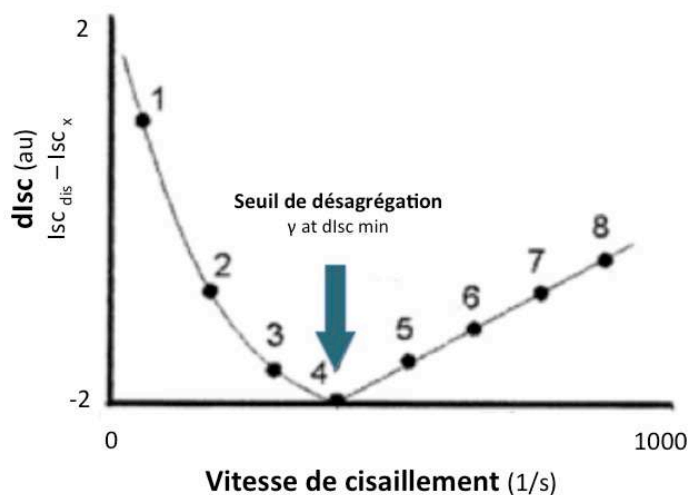


Figure 51. Principe de la détermination du seuil de désagrégation érythrocytaire

Le calcul d'agrégation et de désagrégation se suit automatiquement. 8 Vitesses de cisaillement d'intensité croissante sont appliquées sur le même échantillon. En fonction de la vitesse de cisaillement appliquée, on obtient une intensité de la lumière réfléchie (Isc x). Le calcul du seuil de désagrégation se fait en calculant pour chaque vitesse donnée, la différence entre la lumière réfléchie durant la phase de désagrégation érythrocytaire initiale (Isc_{top}) (Figure 50) et la lumière réfléchie durant la vitesse de cisaillement donnée. Le seuil de désagrégation est défini ainsi comme la vitesse de cisaillement où cette différence est minimale.

II. 4 Mesure du stress oxydatif et du métabolisme du monoxyde d'azote

Pour compléter les mesures fonctionnelles de la fonction vasculaire et mieux comprendre l'origine de la dysfonction vasculaire dans la drépanocytose, nous avons mesuré plusieurs marqueurs plasmatiques du stress oxydatif. En outre peu d'études ont étudié le stress oxydatif chez les enfants drépanocytaires particulièrement en ce qui concerne les patients ayant la forme double hétérozygote SC. Le stress oxydatif implique un ensemble complexe de paramètres et ne peut pas être mis en évidence par une seule méthode. L'équipe de recherche *Biologie vasculaire et du Globule rouge* du laboratoire LIBM EA7424 de l'Université de Lyon ont mis au point plusieurs techniques de dosage de différents marqueurs du stress oxydatif en routine. En collaboration avec cette équipe de recherche, l'UMR INSERM 1134 et le laboratoire ACTES, les dosages plasmatiques des marqueurs du stress oxydatif et du métabolisme du monoxyde d'azote ont été effectués (j'ai réalisé un séjour à Lyon pour réaliser ces dosages). Le stress oxydatif et la quantité de monoxyde d'azote circulante ont été déterminés par la quantification de certains marqueurs plasmatiques :

- le malondialdéhyde (MDA)
- les produits avancés de l'oxydation des protéines (AOPP)
- la nitrotyrosine
- le nitrite plasmatique

Le niveau de défense antioxydant plasmatique était caractérisé au niveau enzymatique par la mesure des activités superoxyde dismutase, glutathione peroxydase et catalase et au niveau non enzymatique par la mesure de la capacité plasmatique de réduction des ions ferriques.

Lors du prélèvement sanguin, le deuxième tube EDTA (conservé jusqu'au traitement en laboratoire à +4°C) a été dédié à ces mesures. Après centrifugation du tube (2200rpm, +4°C, 16min), le plasma a été extrait et conservé à – 80°C. Les échantillons ont été envoyés à Lyon et stockés à -80°C en attendant les dosages. Les EORs sont très réactifs et instables et par

conséquent difficiles à détecter. Ainsi pour mesurer le stress oxydatif, on se base sur les produits secondaires des réactions oxydatives étant donné qu'elles sont plus stables. Ces marqueurs ont été mesurés en appliquant le principe de la spectrophotométrie (TECAN Infinite M200, Männedorf, Suisse).

1. La mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides et des protéines :

Dosage des **AOPP** : un fort stress oxydatif provoque des modifications de structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines. Dans ce cas, on retrouve dans le plasma des taux élevés de protéines oxydées, appelées les AOPP (*advanced oxidised protein products*). Ce sont les produits terminaux de l'oxydation des acides aminés. On les détecte en présence de chloramine-T et iodure de potassium à 340 nm par spectrophotométrie selon la méthode de Witko-Sarsat (Witko-Sarsat *et al*, 2003) déjà appliquée par Diaw *et al*. (Diaw *et al*, 2015). L'absorbance est proportionnelle au contenu plasmatique en AOPP.

Dosage du **MDA** : Le MDA ou *malondialdéhyde plasmatique* est un marqueur d'oxydation des lipides. Il est considéré comme un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés et permet d'estimer les dommages lipidiques et l'ampleur du stress oxydatif. Le MDA a la capacité de se lier à l'acide 2-thiobarbiturique (TBA). Il en résulte une coloration en rose. Ce complexe (TBA-MDA-TBA) est extrait avec le butanol et son absorbance est lue à 532 nm. La relation est linéaire entre absorbance et concentration en MDA plasmatique. Les taux élevés de MDA signifient donc un stress oxydatif, portant notamment sur l'oxydation des lipides. Les techniques utilisées ont été développées par Ohkawa *et al*. (Ohkawa *et al*, 1979).

2. La détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques :

Le système de défense d'antioxydant est essentiel pour éliminer un excès d'EOR dans l'organisme. Nous avons mesuré trois antioxydants enzymatiques plasmatiques principaux : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPX) qui neutralisent les EORs et les transforment en espèces neutres.

a) Dosage de système de défense enzymatique:

Superoxide dismutase (SOD) : La SOD accélère la réaction de dismutation spontanée des anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le H_2O_2 formé peut être éliminé via la catalase ou la GPX qui le transforme en H_2O . Elle joue un rôle important pour

l'équilibre pro oxydants / antioxydant

en limitant la réaction d'Haber-Weiss.

Pour mesurer l'activité de la SOD on

utilise la xanthine oxydoréductase qui

transforme le xanthine en hydrogène

peroxyde et acide urique (Figure 52).

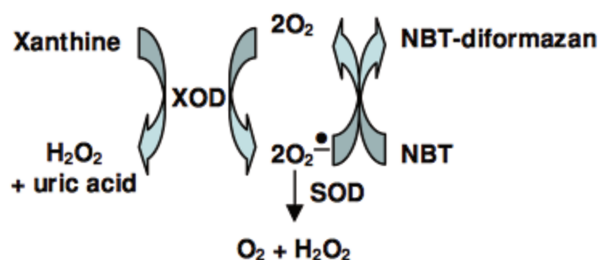


Figure 52. Principe de dosage de la superoxyde dismutase.

Il s'agit d'une réaction aérobie avec production des $O_2^{\bullet-}$. Les $O_2^{\bullet-}$ sont détectés par le nirtochrome tetrazolium (NBT) qui est réduit en NBT dirformazan (Figure 52). La formation de NBT est lisible à 450 nm. La SOD inhibe la formation de NBT-dirformazan ainsi plus l'absorbance est élevée plus l'activité de la SOD est faible. Il s'agit de la méthode de Oberley & Spitz (Oberley & Spitz, 1985).

La glutathion peroxydase (GPX): Nous avons utilisé la méthode de Paglia & Valentine (Paglia & Valentine, 1967). La GPX élimine le H_2O_2 en H_2O et glutathion oxydé (GSSG).

Cette réaction est catalysée par le glutathion (GSH), qui est synthétisé par la glutathion réductase (GhR). Pour cette réaction la GhR utilise un cofacteur, le nicotinamide adénine di nucléotide phosphate réduit (NADPH). On ne peut pas directement observer le taux de disparition de H_2O_2 qui est visible à 240 nm car il peut être confondu avec d'autres substances qui sont également visibles à 240 nm. Ainsi on ajoute au plasma un cocktail qui contient du GSH, de la GhR, du NADPH et du H_2O_2 (pour initier la réaction). Ensuite on observe le taux de disparition du NADPH à 340 nm. L'activité de la GPX est inversement proportionnelle au taux de disparition du NADPH.

Catalase : La Catalase neutralise le H_2O_2 en H_2O et O_2 . Pour doser l'activité de la Catalase on utilise la capacité de la catalase à transformer le méthanol (à 100%) en formaldéhyde (méthode de Johansson & Borg (Johansson & Borg, 1988)). L'activité de la Catalase est proportionnelle au taux de formation de formaldéhyde, qui est visible à 540 nm.

b) Dosage des systèmes de défense antioxydante non-enzymatique

Le système de la défense antioxydant est basé sur des réactions d'oxydoréduction qui peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques. Ainsi on parle aussi du pouvoir réducteur global du plasma.

Dosage de la défense antioxydante globale :

Ferric reducing ability of plasma (FRAP) : La méthode FRAP, selon Benzie & Stain (Benzie & Strain, 1999), consiste à mesurer la capacité plasmatique à réduire Fe^{3+} (ion ferrique) en (II) Fe^{2+} (ion ferreux). Cette réaction avait lieu en condition acide. La solution TPTZ colore la solution en violet et permet de lire l'absorbance à 593 nm.

3. Dosage des marqueurs du métabolisme du NO

Le métabolisme du monoxyde d'azote et le stress nitrosatif ont été estimés respectivement par le dosage du contenu en nitrite et nitrate (NOx) et en nitrotyrosine dans le plasma.

Dosage de la nitrotyrosine : Le NO peut être piégé par le $O_2^{\circ-}$ pour former du peroxynitrite (ONOO⁻) ce qui diminue fortement la biodisponibilité en NO mais aggrave également le stress nitrosatif et oxydatif. Cette réaction augmente la nitration de tyrosine (formation de nitrotyrosine). Par ailleurs le ONOO⁻ est hautement réactif et peut donner naissance à d'autres oxydants comme le OH[°] et le NO₂⁻ (Beckman *et al*, 1990; Radi *et al*, 2002). La nitrotyrosine est détectée par ELISA basée sur les réactions anticorps-d'antigène comme précédemment décrit (Galinanes & Matata, 2002).

Dosage de nitrite / nitrate : Pour estimer la biodisponibilité en NO nous avons mesuré le contenu en nitrite et nitrate plasmatiques. Pour cela le nitrate était transformé en nitrite à l'aide de la NADPH (incubation 40 min de 20 µL de plasma avec 40 µL de nitrate réductase). Cette solution était ensuite incubée 5 min avec le réactif de Griess (20 µL). La lecture de la plaque se fait à 550 nm. La concentration en nitrite et nitrate plasmatique est proportionnelle au métabolisme du NO (méthode de Griess, Misko *et al*. (Misko *et al*, 1993)).

4. Dosage du endothéline- 1 (Et-1)

Le peptide Et-1 est un puissant vasoconstricteur et pro-inflammatoire, sécrété par l'endothélium vasculaire. Il a un effet vasoconstricteur sur les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. Chez les patients drépanocytaires nous avons dosé le niveau de ET-1 circulant selon la méthode précédemment appliquée (Ergul *et al*, 1996) en utilisant un *enzyme-linked immunoassay kit*, ELISA (American Research Product, Inc. Waltham, MA USA).

II.5 MESURE DE L'ACTIVITE DU SYSTEME NERVEUX AUTONOME (SNA)

Le système nerveux autonome (SNA) ou système nerveux végétatif, divisé en système nerveux sympathique (ou orthosympathique) et en système nerveux parasympathique, assure l'homéostasie. Il permet les adaptations nécessaires (circulatoires, respiratoires...) pour répondre rapidement aux besoins physiologiques. Le SNA joue un rôle essentiel dans la redistribution sanguine et l'ajustement du débit sanguin via la régulation de la fréquence cardiaque et la pression artérielle.

Divers mécanismes assurent la continuité et le contrôle de la fréquence cardiaque. Le muscle cardiaque possède des cellules autoexcitables et il est ainsi capable de générer sa propre activité électrique ce qui lui permet la contraction rythmique sans l'aide du système nerveux. Le noeud sinusal (ou noeud sino-auriculaire ou *pacemaker*) fixe la fréquence et la synchronisation de la contraction des cardiomyocytes. Il émet des impulsions électriques qui se propagent rapidement dans la paroi cardiaque en arrivant d'abord au noeud auriculo-ventriculaire. Ensuite le faisceau auriculo-ventriculaire (faisceau de His) et le réseau de Purkinje transmettent le signal dans la paroi ventriculaire permettant la dépolarisation et ainsi la systole ventriculaire. Même si le cœur est capable d'une activité automatique, la fréquence cardiaque est sous influence de trois systèmes : le système nerveux parasympathique, le système nerveux sympathique et le système endocrinien (hormones)

Le système nerveux autonome gère l'activité cardiaque via la communication avec le noeud sinusal et le noeud auriculo-ventriculaire (Wilmore *et al*, 2009):

- le système parasympathique ralentit la fréquence cardiaque (état de calme, détente, relaxation). Les influx parasympathiques atteignent le cœur par les nerfs vagues droit et gauche qui se terminent au niveau du noeud sinusal et du noeud auriculo-ventriculaire d'où ils libèrent de l'acétylcholine ce qui entraîne une diminution de la fréquence cardiaque. Au repos l'activité du système parasympathique prédomine.

- le système sympathique accélère la fréquence cardiaque par exemple lors d'un stress, anxiété ou l'activité physique intense.
- le système endocrinien libère des hormones (adrénaline et noradrénaline) qui stimulent le cœur et augmentent sa fréquence cardiaque. La libération de ces hormones est déclenchée par la stimulation sympathique.

Au niveau vasculaire, à pression artérielle normale c'est le système sympathique qui domine et qui représente le tonus vasomoteur. Il envoie en continu un influx nerveux pour pouvoir maintenir en permanence un certain degré de constriction et une pression sanguine adéquate. Toute modification du tonus vasomoteur au repos modifie le diamètre vasculaire. La régulation à court terme de la pression artérielle se fait via des barorécepteurs qui sont localisés dans les parois vasculaires. Une pression élevée stimule les barorécepteurs. Par conséquent, la stimulation parasympathique augmente et la stimulation sympathique diminue, diminuant la fréquence cardiaque, le volume d'éjection du cœur et ainsi le débit sanguin. Le rythme cardiaque n'est donc pas constant au cours du temps. Il existe des fluctuations des intervalles de temps entre deux battements autour d'une valeur moyenne que l'on appelle la Variabilité de la Fréquence Cardiaque (VFC) (Figure 53). Cette variabilité est due au mode de contrôle hormonal et nerveux du rythme cardiaque, qui varie selon les conditions physiologiques données. L'activité du SNA est établie par la mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque.



<http://www.perinat-france.org/>

Figure 53. Variabilité (en millisecondes) entre chaque battement cardiaque (intervall R-R).

Pour évaluer l'activité du système nerveux végétatif il est possible de mesurer la variabilité des intervalles R-R. Il s'agit d'une méthode non invasive, reproductible, très utile pour évaluer l'état du

coeur et du SNA. La VFC est prédictive des risques cardiométaboliques. Elle varie en fonction de l'âge et est influencée favorablement par la pratique régulière d'une activité physique (Marsac, 2013).

L'activité du SNA est altérée chez les patients drépanocytaires avec au repos (à l'état de base) une prédominance de l'activité sympathique sur le système parasympathique (Pearson *et al*, 2005; Mestre *et al*, 1997; Nebor *et al*, 2011; Connes & Coates, 2013). Il apparait que cette altération est associée à la dysfonction cardiaque et respiratoire (Mestre *et al*, 1997; Oguanobi *et al*, 2012; Sanya *et al*, 2010). La répétition des périodes d'hypoxie (souvent nocturnes (Pepin & Levy, 2002) semblent renforcer la perte de l'activité parasympathique (Sangkatumvong *et al*, 2008, 2011) via la destruction des neurones du nucleus ambiguus qui est impliqué dans la régulation cardiaque (Epstein *et al*, 2007). Quelques études (Velez-Roa *et al*, 2004; Nebor *et al*, 2011; Charlot *et al*, 2017b) suggèrent que le niveau d'activité du SNA pourrait refléter un certain degré de sévérité clinique des patients drépanocytaires. Nebor *et al* ont montré que les individus qui ont un système nerveux autonome le plus altéré sont également ceux qui connaissent le plus de crises vaso-occlusives (Nebor *et al*, 2011). Dans cette étude, la viscosité sanguine et le déséquilibre du système nerveux étaient des facteurs de risque de CVOs. Oguanobi *et al* (Oguanobi *et al*, 2012) a observé que la fréquence des complications telles que le STA, le priapisme et l'ulcère de jambes étaient plus élevée chez les patients montrant une dysfonction de l'activité du SNA. L'altération du SNA favorise la perturbation vasculaire et par conséquent de la fonction vasculaire créant un état pro-inflammatoire (Tracey, 2002). D'autres études sont nécessaires pour déterminer l'influence de cette dysfonction neuronale sur la perfusion et la sévérité clinique, particulièrement en ce qui concerne le génotype SC.

Principe de mesure

La fréquence cardiaque était enregistrée à l'aide d'un cardiofréquencemètre (Suunto®, Finlande) au repos en position allongée et également lors d'un tilt –test (le sujet se levait rapidement et restait debout pour au moins 5 minutes). La technique est basée sur l'analyse des variations des suites d'intervalles RR. Nous avons réalisé une analyse spectrale par transformée de Fourier en utilisant le logiciel Kubios (Kubios ® Finlande) (Figure 54).

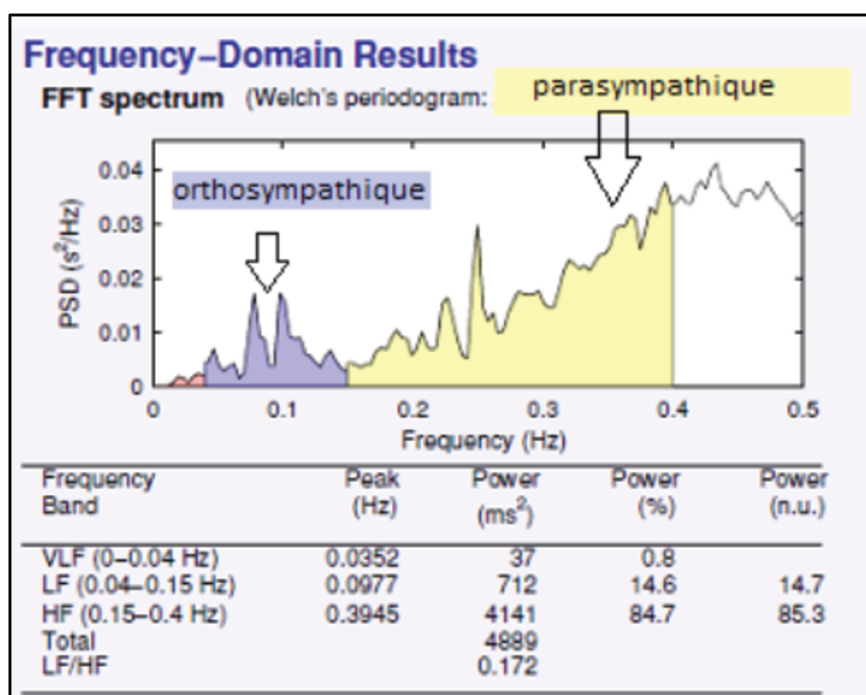


Figure 54. Principe d'analyse de la VFC à l'aide du logiciel Kubios.

Cette méthode permet de déterminer l'aire sous la courbe, mesurée en ms² pour une fréquence donnée. Les indices extraits de l'analyse de Fourier sont des valeurs à des fréquences caractéristiques, très basses (Very Low Frequency, VLF), basses (Low Frequency, LF), hautes (High Frequency, HF), ainsi que le rapport LF/HF. Les valeurs de HF et LF seront également normalisées en pourcentage (HFnu et LFnu). Ces valeurs sont déduites du spectre de puissance (Ptot). On distingue 3 bandes de fréquences principales : les très basses fréquences (VLF, > 25 s) liées à la thermorégulation et au système endocrinien, les basses fréquences (LF, entre deux impulsions 6-20s, 0.04 à 0.15 Hz) qui dépendent à la fois du système sympathique et parasympathique et les hautes fréquences (HF, écarts de temps entre deux impulsions 2.5-6s, 0.15 à 0.50 Hz) liés au cycle respiratoire et l'activité parasympathique.

L'analyse temporelle donnait plusieurs indices dont

- le SDNN (Écart Type de la durée d'une suite d'intervalles RR).
- le PNN50 (Pourcentage d'intervalles RR différent de plus de 50 ms du précédent).
- le RMSSD (la racine carré de la moyenne de la somme des différences au carré des intervalles RR successifs).

On obtient ainsi des indicateurs de l'activité globale (SDNN et Ptot) du SNA, de l'activité parasympathique (PNN50, RMSSD, HF et HFnu) et de la balance sympatho-vagale (LF/HF). Durant tout l'enregistrement de la VFC, nous avons mesuré également la fréquence ventilatoire à l'aide du module de spirometrie du poste de calorimétrie indirecte (système Jaeger, Allemagne) puisque la respiration influence l'activité du SNA (bradycardie sinusale respiratoire). Cet enregistrement ventilatoire nous a ensuite permis de tester que les différences d'activités du SNA entre des groupes de patients n'étaient pas dues à une activité respiratoire différente entre ces groupes.

II. 6 MESURE DE L'OXYGENATION CEREBRALE ET MUSCULAIRE

La fonction vasculaire contrôle et régule la perfusion sanguine et ainsi l'apport en oxygène aux tissus. Une altération de l'oxygénation tissulaire chronique (comme c'est le cas dans la Drépanocytose) provoquera une stimulation continue des CMLV enfin d'ajuster le débit sanguin et d'adapter l'apport en oxygène (Crawford *et al*, 2006; Dabadie *et al*, 1986). La fonction vasculaire étant altérée dans la Drépanocytose, on peut s'attendre à des modifications de la perfusion et de l'oxygénation tissulaire. Ainsi, nous avons également mesuré l'oxygénation tissulaire au niveau cérébral et musculaire grâce à la technique de spectroscopie dans le proche infra-rouge, SPIR (ou NIRS, *near infrared spectroscopy*) à l'aide du spectroscope NIRO-200 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japon) (Figure 55).

1. Présentation du NIRO-200 :

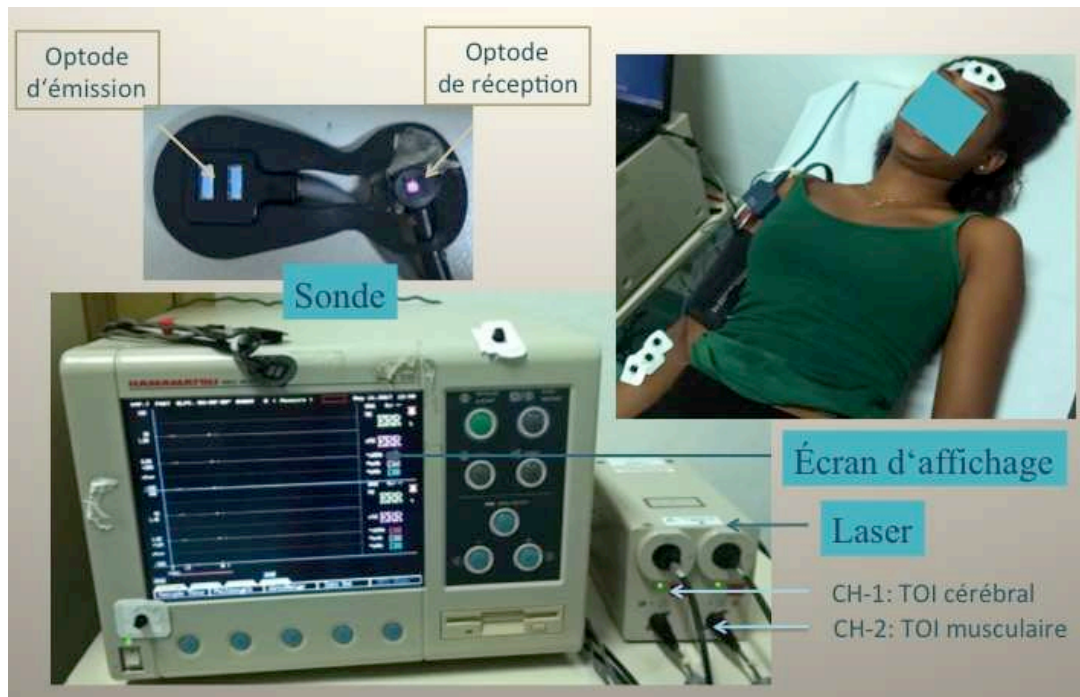


Figure 55. La NIRS

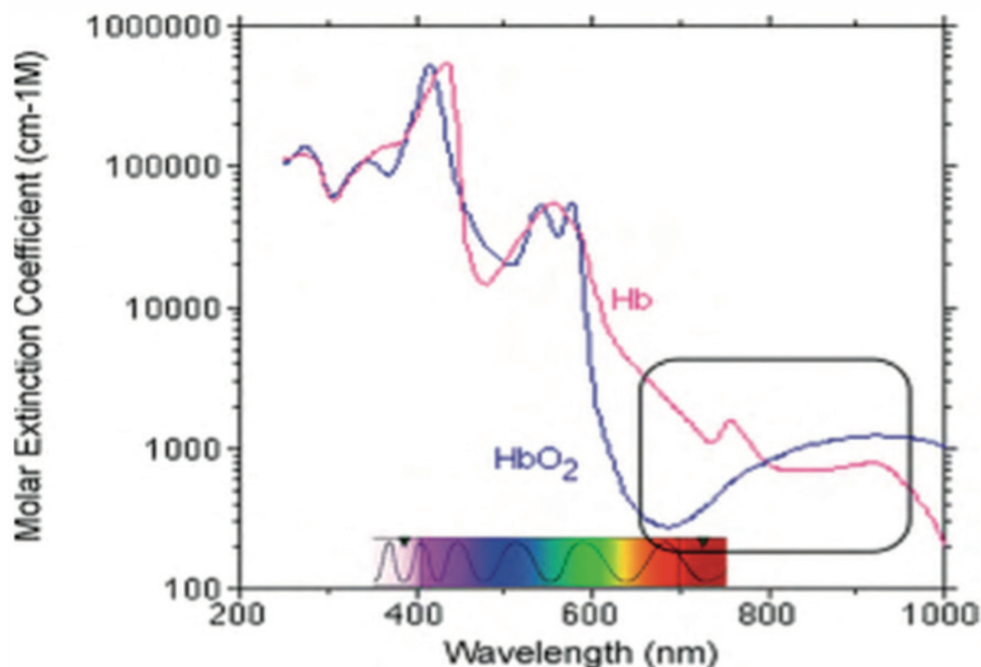
Les modifications de l'oxygénation cérébrale et musculaire étaient enregistrées en continu par le spectromètre NIRO-200 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japon) à une fréquence de 6 Hz. Il comprend une interface qui est connecté au Laser, capable d'émettre à 3 longueurs d'ondes (775, 810 et 850 nm) via la sonde comprenant une optode d'émission et une optode de réception. L'optode de réception enregistre l'atténuation de la lumière. La lumière traverse les tissus d'intérêt (muscle ou cerveau) en forme de banane. L'appareil dispose de deux sondes : ainsi la mesure peut se faire sur deux sites simultanément. Les différentes données étaient transmises simultanément à un PC via un câble RS-232C. L'oxygénation tissulaire était mesurée au niveau du front et au niveau du muscle (Brachioradialis) de l'avant bras droit (le principe reste le même sur les deux sites).

1. Principe de mesure

(1) Mesure de la variation d'Hémoglobine oxygénée (ΔO_2Hb , μM), d'Hémoglobine désoxygénée (ΔHHb , μM) et d'hémoglobine totale (ΔcHb , μM)

Cette technique permet une analyse continue et non-invasive des variations de concentration d'oxyhémoglobine (HbO_2) et de déoxyhémoglobine (HHb). Ces deux molécules sont des chromophores. Ils sont capables d'absorber l'énergie de photons dans une gamme spectrale

précisée laissant passer d'autres longueurs d'ondes. HbO₂ et HHb ont des spectres d'absorption différents ceci permettant leur distinction (Figure 56).



(Extrait du Manuel d'Hamamatsu, NIRO-200)

Figure 56. Spectre d'absorption d'HbO₂ et HHb en fonction de la longueur d'onde

Le carré noir indique le spectre du proche d'infrarouge

L'HbO₂ absorbe la lumière de manière caractéristique à 850nm et l'HHb à 760-775nm (Wray *et al*, 1988). Les longueurs d'ondes en dessous du proche infrarouge seront complètement absorbées par l'Hb et en dessus (>1300) par l'eau contenue dans les couches cutanées. Ainsi la mesure de l'oxygénation tissulaire est basée sur l'émission du proche infra rouge entre 700 et 1300nm. Dans le cas de la drépanocytose, l'hémoglobine A (HbO₂ et HHb) et l'hémoglobine S ont les mêmes coefficients d'extinction (Nahavandi *et al*, 2009).

Le calcul de la concentration en HbO₂ et HHb est basé sur la loi de Beer-Lambert modifiée.

La *Loi de Beer Lambert* (ou *Loi de Bouguer*) (Bouguer, 1729; Lambert, 1760; Beer, 1852) dit que l'atténuation de lumière (A) provoquée par une solution est proportionnelle à la concentration en composé dans la solution (c), au coefficient d'extinction (ϵ) et à la longueur du chemin optique (d). Comme A et d sont déterminés et ϵ est connu, la concentration c peut être calculée ($A = \epsilon \cdot d \cdot c$). Cette loi ne prend pas en compte la diffusion de la lumière, ce qui

est le cas des tissus humains. La lumière ne se propage pas selon une ligne droite. Ainsi une modification de la formule est nécessaire et une nouvelle loi, la loi de *Beer Lambert modifiée* a été proposée (Donovan *et al*, 1970; Sassaroli & Fantini, 2004), avec des nouveaux paramètres L et X (Figure 57).

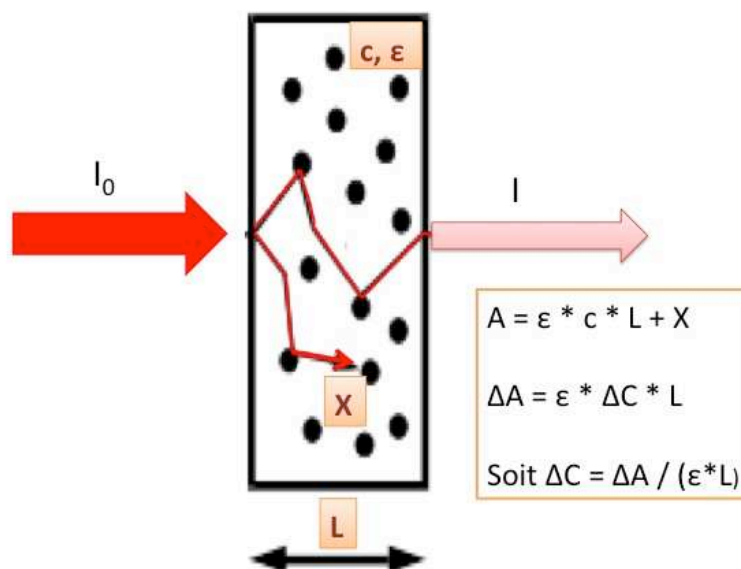


Figure 57. Loi de Beer Lambert modifiée, avec

A, atténuation de la lumière (en % ou sans unité), pour Hb ceci est dépendant du degré de l'oxygénation.

ϵ , le coefficient d'extinction spécifique d'un chromophore à une certaine longueur d'onde donnée (l/g/m ; L/mol/m ou cm-1). Pour l'HbO₂ et l'HHb, il a été déterminé par Wray (Wray *et al*, 1988).

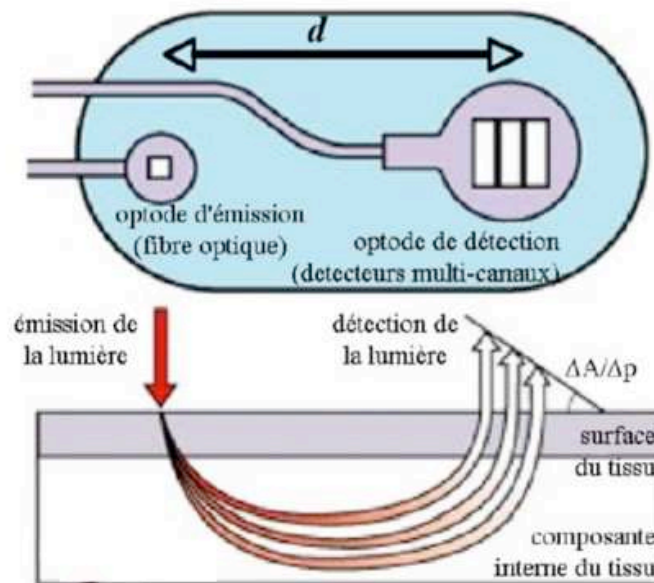
c, la concentration en chromophore (g/L ; mol/L ou mM)

L, pathlength factor, trajet de la lumière infra rouge parcouru entre le point d'émission et le point de détection (en forme de banane) (cm) : $L = \text{DPF} * d$, avec d , la distance interoptode (4cm) et DPF, le facteur différentiel de longueur de chemin (*differential pathlength factor*). Le DPF est connu mais il varie en fonction du tissu étudié : Front 5.93, Avant-bras 3.59 (le valeur ne distingue pas les enfants des adultes et ne prend pas en compte les variations individuelles).

X, perte de la lumière, due à la dispersion. Comme X est un facteur inconnu, on ne pourra pas calculer c à partir de la formule $A = \epsilon * c * L + X$. Par contre X est considéré comme constant au cours du temps (t) ainsi par $A_{t=0} - A_t$, X est éliminé et on peut calculer la variation de concentration : $\Delta A = \epsilon * L * \Delta C$, donc $\Delta C = \Delta A / (\epsilon * L)$. ΔA est mesurée pour trois longueurs d'ondes afin de calculer les variations de l'hémoglobine oxygénée (ΔHbO_2 , μM), de l'hémoglobine désoxygénée (ΔHHb , μM) et de l'hémoglobine totale (ΔcHb , μM). L'épaisseur de la peau, du tissu adipeux ou de la boîte crânienne

peuvent influencé ces mesures. Au delà de 15 mm d'épaisseur le SPIR ne mesure plus l'oxygénation tissulaire.

(2) Le principe de la mesure de l'oxygénation tissulaire et d'hémoglobine tissulaire est basé sur la spectroscopie à résolution spatiale (Figure 58)



Traduit de Da Costa *et al*, 2014

Figure 58. Le principe la spectroscopie à résolution spatiale

La Spectroscopie à résolution spatiale permet de calculer l'oxygénation tissulaire (**TOI**, *tissu oxygen index*) et l'hémoglobine tissulaire (**THI**, *tissu hemoglobin index*). L'optode de détection et de réception comprennent 3 lamelles enregistrant l'atténuation de la lumière du proche infrarouge à trois distances différentes, contrairement à la loi de *Beer Lambert modifiée* qui n'utilise qu'une seule lamelle de l'optode de réception.

Le TOI et THI sont calculés de la façon suivante :

$TOI = HbO_2 / (HbO_2 + HHb) \times 100$ (exprimé en pourcentage).

L'indice d'hémoglobine tissulaire (THI) est normalisé (THI_n) par la valeur initiale, donc $THI_n = THI_{\text{temps donné}} / THI_{0 \text{ initial}} = cHb_t / cHb_0$

La profondeur maximale de la zone de mesure est de $d/2$ (d = distance entre émetteur et détecteur de la lumière) à partir de la surface cutanée, d'après Okada *et al*, 1995. L'optode de réception est placé à 4,5 cm de l'optode d'émission, ce qui permettra de mesurer les paramètres d'oxygénation du cortex préfrontal à une profondeur de pénétration d'environ 2 à 2,5 cm.

Dans cette étude nous avons retenu le TOI musculaire (du muscle fléchisseur superficiel des doigts de l'avant-bras) et le TOI cérébral (Figure 59). La mesure de l'oxygénation tissulaire était réalisée en même temps que la mesure de l'activité du SNA : c'est à dire au repos en position allongée tout le long de l'étude. Ensuite, le TOI a été moyenné sur une période stable de 10 minutes minimum. L'enregistrement a démarré après une période de repos d'au moins 10 minutes. Le TOI a été également mesuré lors du Tilt test et dans la période debout durant 5 minutes.

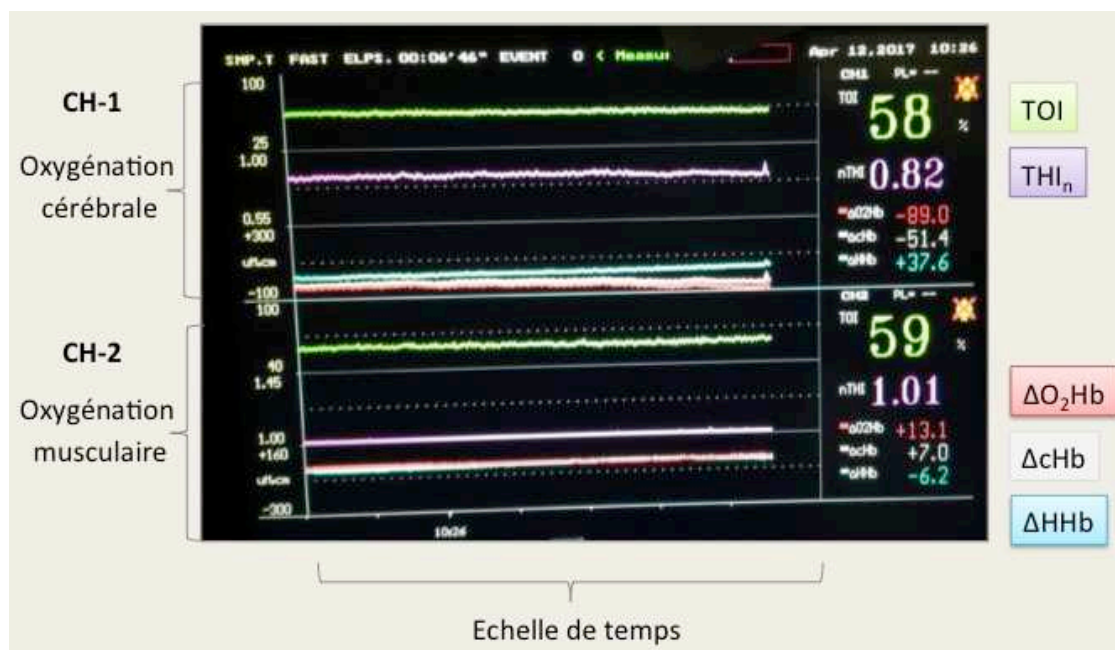


Figure 59. Exemple de l'affichage obtenu par le système NIRO-200

(Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japon). En dessous d'une valeur inférieure à 50% pour le TOI cérébral, on peut considérer que cette valeur est anormale. Des valeurs de $56 \pm 11\%$ dans un groupe de 20 patients drépanocytaires adultes non sévères sur le plan clinique ont été décrites ce qui montre un certain degré d'hypoxie cérébrale dans cette population (Waltz *et al*, 2012).

2. Mesure du Vasomotion et du Flowmotion

Pour limiter l'hypoxie cérébrale, le vasomotion (oscillation spontanée du tonus vasculaire) est un phénomène compensatoire présent chez les patients drépanocytaires de manière plus importante que chez des sujets sains (Waltz *et al*, 2012). Le vasomotion cérébral est une

oscillation rythmique des vaisseaux de la microcirculation cérébrale. Ainsi, une transformation de Fourier de la variabilité du TOI permettait aussi de calculer la puissance totale de la variabilité du TOI (0.005 - 2 Hz) correspondant au flowmotion (oscillation du flux sanguin). Le flowmotion est influencé par le vasomotion, la fréquence respiratoire et le débit cardiaque. Nous avons distingué le vasomotion du flowmotion par une décomposition de la variabilité du TOI en 5 bandes fréquentielles :

bande 1 : 0.01 – 0.019 Hz = activité endothéliale,

bande 2 : 0.02 – 0.059 Hz = activité sympathique,

bande 3 : 0.06 – 0.149 Hz = activité myogénique,

bande 4 : 0.15 – 0.499 Hz = activité respiratoire,

bande 5 : 0.50 – 2.00 Hz = activité cardiaque.

Les bandes 1 à 5 reflètent le flowmotion et les bandes 1, 2 et 3, le vasomotion.

III.5 MESURE DE L'APTITUDE PHYSIQUE

1. Evaluation du niveau d'aptitude physique

L'aptitude physique sous-maximale était déterminée par un test de marche de 6 minutes (TM6M) effectué selon le code de pratique standardisé mis en place par l'American Thoracic Society (Crapo *et al*, 2002). Il s'agit d'un test sous-maximal souvent utilisé dans la population drépanocytaire à cause de son faible risque clinique et sa simplicité d'utilisation (comparativement à un test d'effort incrémental) mais aussi car il est corrélé à la sévérité clinique (Campbell *et al*, 2009; Minniti *et al*, 2009). Par ailleurs, la performance au test de marche de 6 minutes est corrélée à la performance maximale aérobie chez les drépanocytaires (Campbell *et al*, 2009; Minniti *et al*, 2009). Ce test a été déjà utilisé chez les enfants drépanocytaires dans le cadre du projet SAPOTILLE (Waltz *et al*, 2012b).

Le TM6M est un test simple, individualisé, qui mesure la distance parcourue en marche rapide sur un terrain plat et dur, pendant 6 minutes. Le TM6M n'est pas conçu pour évaluer les limitations à l'exercice chez les patients, mais il permet d'évaluer la capacité physique nécessaire dans la vie quotidienne (Crapo *et al*, 2002).

Afin d'obtenir des résultats cohérents, il est important que les tests soient réalisés à chaque fois de la même manière en respectant des nombreux critères (Crapo *et al*, 2002). Pour la sécurité des patients et pour avoir l'accès rapide à un service et/ou équipement médical d'urgence, le test était réalisé à la pédiatrie, l'hôpital de jour du CHU de Pointe-à-Pitre.

Déroulement du test :

Il était demandé aux patients de faire un parcours autour de deux « plots ». La distance entre les deux « plots » est généralement de 30m. Cependant, il a été montré que la distance peut varier entre 15 et 50m sans influencer le résultat (Knight-Madden *et al*, 2013). Dans le cadre de notre étude, la distance retenue a été de 21m. La longueur du parcours était marquée tous les 3 mètres et un mur le long du parcours était à disposition afin que les patients puissent s'y appuyer, si besoin, pendant le test.

Le test démarrait par une période de repos de 10 min pour enregistrer plusieurs variables de base. Pendant ce temps, on expliquait aux enfants le déroulement du test.

Variables mesurées :

- la saturation en oxygène SpO2 (%), par l'oxymétrie du pouls (ou saturomètre)
- niveau de dyspnée à l'aide d'une échelle de BORG
- la fréquence cardiaque (bpm),
- la tension artérielle diastolique (PAD, mmHg),
- et la tension artérielle systolique (PAS, mmHg), par un tensiomètre au niveau de l'artère brachiale

Instruction au patient

« Le but de ce test est de parcourir en marchant la plus grande distance possible en 6 minutes, en effectuant des allers-retours sur le parcours délimité par les cubes. Marcher 6 minutes, c'est long, il va donc falloir faire un effort important. Tu vas probablement te sentir essoufflé et épuisé. Tu peux donc ralentir, t'arrêter ou te reposer si nécessaire. Tu peux t'appuyer contre le mur pendant le repos, et reprendre la marche dès que possible. Tu effectues des allers retours en faisant demi-tour autour de ces cubes verts. Il te suffit de pivoter rapidement autour des cubes et de continuer dans l'autre sens sans marquer de temps d'arrêt ni d'hésitation. Je vais te montrer comment faire. Regarde bien la manière dont je fais demi-tour sans hésiter. Dès que tu te sens prêt tu peux commencer le test. »

Pour éviter l'épuisement précoce les encouragements étaient standardisés :

- Après la première minute « tu t'en sort très bien. Il te reste 5 minutes ».
- 2 minutes : « continue comme ça. Il te reste 4 minutes ».
- 3 minutes : « c'est bien. Tu en es à la moitié »
- 4 minutes : « continue comme cela. Plus que 2 minutes »
- 5 minutes : « c'est bien. Il ne te reste plus qu'une minute ».

A la fin du test, la distance parcourue était calculée : Distance parcourue (m) = (Nb de longueurs (A/R)* 42m) + dernière longueur partielle (m). Les mêmes paramètres que ceux au repos étaient repris à nouveaux directement à la fin du test et après 10 min de l'arrêt du test.

La distance parcourue était comparée à une distance prédite d'une population non malade ayant les mêmes caractéristiques anthropométriques, selon le *modèle de Geiger* (Geiger *et al*, 2007) :

Pour les **garçons**:

Distance prédite sur 6 minutes = $196.72 + (39,81 \times \text{âge}) - (1,36 \times \text{âge}^2) + (132,28 \times \text{taille})$.

Pour les **filles** :

Distance prédite sur 6 minutes = $188,61 + (51,50 \times \text{âge}) - (1,86 \times \text{âge}^2) + (86,10 \times \text{taille})$.

Si la distance parcourue a atteint plus de 80% de la distance de reference, la performance a été considéré comme normale sinon la performance était anormale (Dedeken *et al*, 2014).

2. EVALUATION DE LA QUANTITE JOURNALIERE D'ACTIVITE PHYSIQUE PAR QUESTIONNAIRE D'ACTIVITE PHYSIQUE

La dépense énergétique pour un jour (24 h) se repartit en trois postes d'inégale importance :

- le métabolisme de repos qui représente 60-75 % de la dépense énergétique totale. Il correspond à la dépense énergétique pour le métabolisme de base /turnover protéique, maintient de la température...,
- la dépense énergétique liée à l'activité physique (très individuel entre 15-30%), dont la part varie en fonction de la nature, de la durée et de l'intensité de l'exercice correspond à toute forme de dépense énergétique qui s'ajoute au métabolisme de base y compris les activités de la vie quotidienne,
- et la dépense énergétique due aux effets thermiques des aliments (environ 10 % du total).

Evaluer la quantité d'activité physique (AP) journalière n'est pas facile à cause de sa forte variabilité intra et inter-journalière (Welk *et al*, 1998). L'activité physique est un phénomène complexe qui se caractérise par son type (quelle activité physique), sa durée (pendant combien de temps), sa fréquence (quelle régularité et quel fractionnement), son intensité (quel investissement physique et quelle dépense énergétique), et son contexte (quel environnement). Les conditions sociales dans lesquelles elle est pratiquée ont également leur importance (Duncan *et al*, 2005). Ainsi il est préférable de combiner différentes formes de mesure de l'activité physique pour pouvoir limiter la sur- ou sous-estimation.

Dans le cadre de cette étude, l'activité physique était évaluée par un questionnaire standardisé pour les enfants et adolescents (Arvidsson *et al*, 2005) (Figure 60). Il a été testé

internationalement dans des populations différentes. Il est basé sur quelques questions simples concernant 3 domaines principaux : activités scolaires (EPS, récréations..), moyens de transport (voiture, bus, à pied...) et activités sportives régulières comme les activités de loisirs. La dépense énergétique (DE) au repos, la DE totale et la DE liés aux activités physiques étaient calculées (Figure 60). Le but était d'établir la dépense énergétique quotidienne et l'équivalent métabolique (*Metabolic Equivalent of Task* MET_{min}) pour les activités d'intensité modérée et haute. Le calcul du MET permet de mesurer l'intensité d'une activité physique et sa dépense énergétique. Il s'agit d'un moyen de comparaison d'énergie dépensée pour une même AP effectuée par des participants différents. Sa valeur est basée sur la quantité d'énergie et de l'oxygène que le corps utilise pendant une activité donnée (1 MET = 3,5mlO₂/min/kg). Plus le niveau d'AP monte plus la consommation d'oxygène augmente ainsi la valeur MET augmente avec intensité d'AP. Chaque niveau d'intensité est attribué à une valeur de MET :

- activités sédentaires < 1,6 MET ;
- 1,6 MET ≤ activités de faible intensité < 3 METs ;
- 3 METs ≤ activités d'intensité modérée < 6 METs ;
- 6 METs ≤ activités d'intensité élevée < 9 METs ;
- activités d'intensité très élevée ≥ 9 METs.

Dans cette étude la valeur MET utilisé suivait les recommandation de Arvidsson.

L'activité physique journalière (PAEE, *physical activity energy expenditure*) est estimée en multipliant la valeur de MET, attribuée à chaque activité, par la durée de pratique (METmin). Seules les activités d'intensité modérée à élevée (*moderate-to-very high physical activity*, METmin_{MVPA}) on été discutées.

Il est important de signaler que les indicateurs de le dépense énergétique obtenus à partir du questionnaires restent imprécis, du fait qu'ils sont influencés par des multiples facteurs, en particulier les caractéristiques physiques du sujet (âge, sexe, taille, poids) et les conditions

environnementales et sociales de la pratique (température, altitude, humidité, niveau...). Leur interprétation doit donc rester prudente. De plus il n'existe pas des valeurs de référence du équivalent métabolique pour la population drépanocytaire. L'équivalent métabolique est basé sur le niveau métabolique et la consommation d'oxygène de base, qui n'est cependant pas le même pour les enfants atteints des maladie chroniques comme la Drépanocytose.

	A	B	C	D	E	F	G
1	FICHE QUESTIONNAIRE ACTIVITE PHYSIQUE (A remplir avec un investigateur)						
2	Génotype (AA, SC, SS)	SC					
3	Hémoglobine en g/dl de sang (Si SC ou SS)	13,2					
4	Sexe (G ou F)	G					
5	Age (an)	16					
6	Poids (kg)	60					
7	Taille (cm)	167					
8	RERp (kcal/min)	1,17					
9							
10	Combien d'heures dors-tu par jour ? (min)	480					
11							
12	Comment vas-tu à l'école ?	Marche		Vélo		Bus	x
13	Combien de temps de faut-il pour y aller et revenir ? (min)	10					
14							
15	Combien d'heures d'EPS as-tu par semaine ? (min)	120					
16	Est-ce que tu te dépenses beaucoup ? (de 1 à 4)	4					
17							
18	Combien de minutes de récréation as-tu par jour ? (min)	15					
19	Tu te dépenses beaucoup pendant ces récréations ? (de 1 à 3)	2					
20							
21	Combien de temps travailles tu à l'école par jour ? (min)	480					
22							
23	Fais tu une activité physique en dehors de l'école ?						
24	Si oui combien de temps par semaine ? (min)						
25	Trouves-tu ça fatiguant ? (de 1 à 2)						
26							
27	Combien de temps marches-tu par jour ? (min)	30					
28							
29	Combien de temps par jour restes-tu assis à regarder la télé, être devant un ordinateur ou lire ? (min)	180					
30							
31	METmin Sleep	506					
32	METmin Moderate to Intense	268					
33	METmin Low	1222					
34	DEJ (kcal/j)	1996					

Figure 60. Questionnaire d'activité physique appliqué dans l'étude HYPOSNAD.

D'après Arvidsson (Arvidsson *et al*, 2005).

La dépense énergétique pour les différentes activités a été calculée de la façon suivante :

- la dépense énergétique au repos (**REE**, *resting energie expenditure*, kcal/min). *L'anémie a un effet important sur le REE chez les patients drépanocytaires, ainsi le contenu en Hb est également incluse dans la formule (Buchowski et al, 2002).*

Pour les **filles (SS ou SC)** : $(1100 + 13,3 * \text{poids}_{(\text{kg})} - 30,2 * \text{Hg}_{(\text{g/dl})}) / 24/60$

Pour les **garçons (SS ou SC)** : $(1305 + 18,6 * \text{poids}_{(\text{kg})} - 55,7 * \text{Hg}_{(\text{g/dl})}) / 24/60$

Pour les enfants **temoins** : $(9,6 * \text{poids}_{(\text{kg})} + 1,9 * \text{Taille}_{(\text{cm})} - 4,7 * \text{Age} + 655) / 24/60$

- **AP modérée et intense** (Met/min) : $[t_{\text{Marche}(\text{min/jour})} * 4 + t_{\text{Loisirs}(\text{min/jour})} * 4,5/7_{\text{si intensité 1}} (\text{ou } * 7/7_{\text{si intensité 2}}) + t_{\text{Récréations}(\text{min/jour})} * 3/7_{\text{si intensité 2}} (\text{ou } * 4/7_{\text{si intensité 3}} \text{ ou } 0_{\text{si intensité 1}}) + \text{EPS} * 2,5/7_{\text{si intensité 2}} (\text{ou } * 4/7_{\text{si intensité 3}} \text{ ou } * 6/7_{\text{si intensité 4}} \text{ ou } * 0_{\text{si intensité 1}}) + t_{\text{Transport}} * 4_{\text{si marche}} (\text{ou } * 6_{\text{si velo}} \text{ ou } 0_{\text{si bus}})] * \text{REE}$
- **AP faible** (Met/min) : $[t_{\text{Assis}} + t_{\text{Bus}} (\text{si non } 0) + t_{\text{Ecole}} * 1,8 + t_{\text{EPS}} * 1,8/7_{\text{si intensité 1}} (\text{si non } 0) + t_{\text{récréations}} * 1,8/7_{\text{si intensité 1}} (\text{si non } 0)] * \text{REE}$
- **Sommeil** (Met/min) : $t_{\text{Sommeil}} * 0,9 * \text{REE}$
- **DE totale** (kcal/j) = $\text{MET}_{\text{sommeil}} + \text{MET}_{\text{AP modérée intense}} + \text{MET}_{\text{AP faible}}$

III.6 Disposition de l'ensemble des appareils

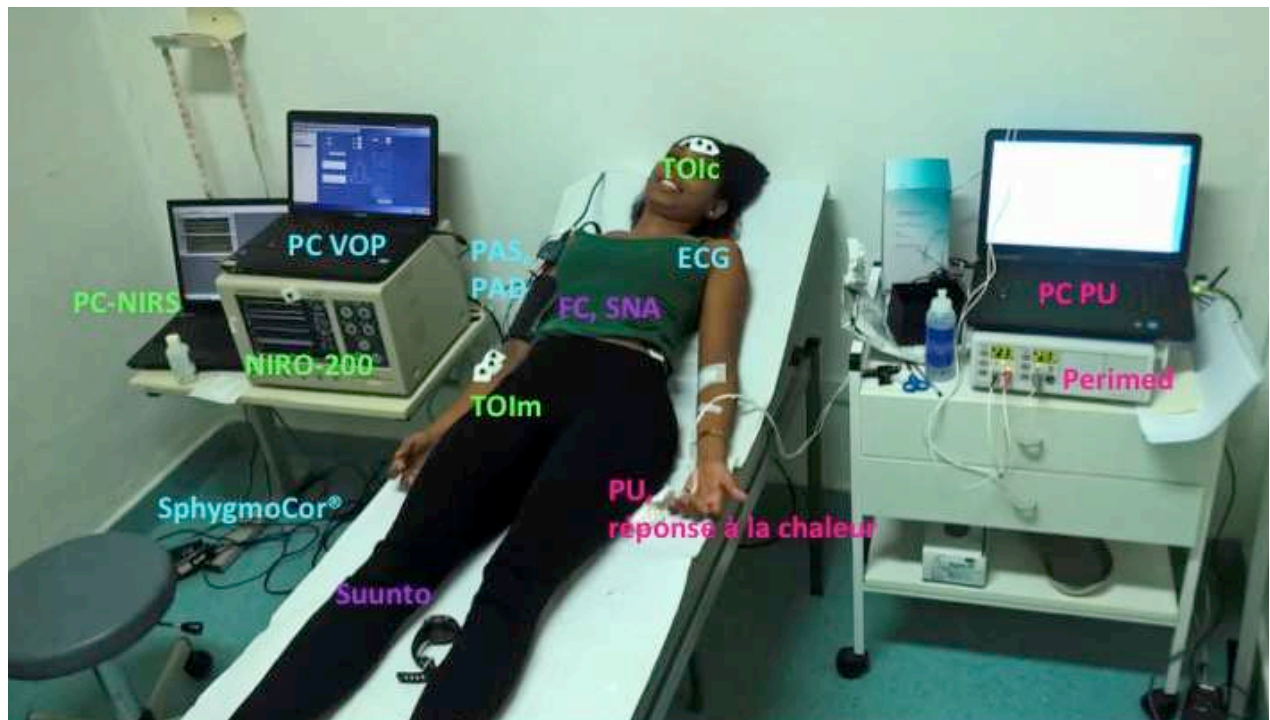


Figure 61. Disposition de l'ensemble des appareils

IV. RESULTATS & DISCUSSION

IV.1. Caractérisation de la population

1. Bilan du recrutement

Dans le cadre de l'étude *Sapotille*, 111 enfants ont été suivis par le médecin investigateur et l'équipe de recherche pendant trois ans, à raison d'une visite par an. 42 enfants ont été exclus du projet *Sapotille* en raison d'un suivi incomplet. Parmi ces patients, on compte les enfants perdus de vue (déménagement ou sans nouvelles), ceux qui n'étaient pas à l'état de base ou les enfants qui ont succombé à la maladie au cours du suivi (Figure 62). Ainsi, 67% des enfants potentiels de *Sapotille* ont été recrutés pour notre sous-étude *Hyposnad* (Figure 62). A l'âge de 16 ans, certains patients quittent la cohorte pédiatrique pour rejoindre celle des adultes, il n'empêche que *Hyposnad* a été également proposé à ces adolescents. Au total 46 patients ont participé à cette sous-étude. Les raisons pour lesquelles ils ont refusé de participer à *Hyposnad* étaient en général un nombre trop élevé d'examen clinique ou une indisponibilité des parents. Il ne faut pas oublier qu'il était demandé aux familles de rester une heure de plus pour les mesures additionnelles liées à la recherche.

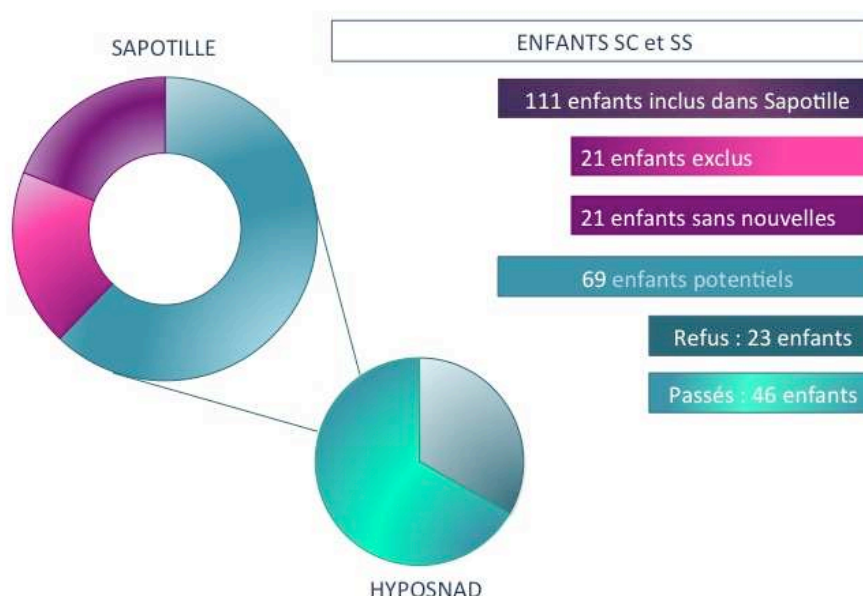


Figure 62. Bilan de recrutement de l'étude *Hyposnad*

2. Caractéristiques des patients inclus dans Hyposnad

Au total, quarante six enfants/adolescents guadeloupéens entre 10 et 16 ans ont participé à cette étude. Parmi ces participants, 24 patients présentaient la forme homozygote SS (11 filles, 13 garçons) et 22 patients avaient le génotype SC (13 filles et 9 garçons) (Tableau 2). Quatre des 24 patients SS suivaient un traitement par hydroxyurée (~20 mg/kg par jour) depuis plus de six mois. Les participants, tous suivis depuis leur naissance, faisaient partie de la cohorte pédiatrique de Unité Transversale de la Drépanocytose à Pointe-à-Pitre le jour d'inclusion dans *Sapotille*. Au moment de l'inclusion, ils étaient cliniquement à l'état de base (à plus d'un mois de toute complication et de 3 mois de toute transfusion). Le groupe contrôle était composé de 16 enfants/adolescents (8 filles et 8 garçons) de génotype AA. Tous les participants avaient des caractéristiques anthropologiques comparables (Tableau 2).

Tableau 2. Caractéristiques anthropologiques des participants.

	AA (n = 16)	SC (n = 22)	SS (n = 24)
Filles/ Garçons	8/8	13/9	11/13
Age (ans)	14.3 ± 3.0	15.1 ± 2.6	15.0 ± 2.4
Poids (kg)	50.3 ± 15.4	49.7 ± 12.7	49.0 ± 13.8
Taille (cm)	162.0 ± 0.1	160.0 ± 0.1	162.0 ± 0.1
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	19.8 (15.8; 21.2)	18.8 (17.6; 20.8)	17.8 (16.0; 20.0)

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± écart type ou médiane (25^e et 75^e percentiles).

AA, sujets homozygotes pour l'hémoglobine A ; SS, patients drépanocytaires homozygotes ; SC, patients drépanocytaires de type hétérozygote composite SC.

3. *Bref aperçu de l'histoire clinique des patients SS et SC*

Les complications vécues dès la naissance variaient en fonction du génotype (Figure 63) et de l'âge. La crise vasoocclusive douloureuse et le syndrome thoracique aigu représentent généralement les deux complications majeures de cette pathologie. Ceci était également le cas chez les patients inclus dans *Hyposnad* (Figure 63). Une étude sur une cohorte pédiatrique guadeloupéenne a démontré que la fréquence des crises majeures (CVO et STA) est plus élevée avant l'âge de 4 ans et diminue à l'adolescence (Tarer *et al*, 2006). La fréquence, la localisation, la durée et la sévérité des CVOs se distinguent d'un patient à l'autre et également d'une crise à l'autre. La majorité des patients SS ont développé au moins une crise douloureuse (92% pour la CVO et 67% pour le STA) de la naissance au jour d'inclusion dans *Hyposnad* (Figure 63). Ces pourcentages s'élèvent à 68% et 32% chez les patients SC. En moyenne on compte depuis la naissance pour les patients SS 6.6 ± 6.0 CVO par enfant et pour les patients SC 4.5 ± 3.7 CVO par enfant. Le taux annuel de CVO et de STA (*nombre de crises au total jusqu'au jour d'inclusion divisé par l'âge du patient au jour d'inclusion*) étaient plus élevés ($P < 0.05$) chez les patients SS comparé aux patients SC (0.39 ± 0.35 vs. 0.19 ± 0.23 et 0.13 ± 0.13 vs. 0.02 ± 0.04 respectivement pour CVO et STA chez SS vs. SC). La sévérité clinique était définie comme le nombre de CVO sur les deux années précédentes l'étude (sévère si $CVO \geq 3$ et non sévère si $CVO < 3$) ou du nombre de STA sur les deux années précédant l'étude (sévère si $STA > 0$ et non sévère si $STA = 0$). 14% des patients SC et 25% des patients SS étaient considérés comme sévères selon ce classement.

La séquestration splénique aigüe caractérisée par la survenue d'une augmentation brutale de plus de 2 cm de la taille de la rate traduit l'anémie aigüe (Habibi *et al*, 2005). Cette complication est très fréquente chez les patients SS (Figure 63). Ceci confirme les études de Tarer *et al* (Tarer *et al*, 2006).

Le syndrome pieds-mains (ou dactylite) se manifeste généralement entre 6 et 18 mois et est souvent la première complication dans la petite enfance. Dans cette cohorte, au contraire des enfants SS, aucun enfant du génotype SC n'a souffert de cette complication (Figure 63).

L'accident vasculaire cérébral est une complication sévère qui touche les gros vaisseaux cérébraux. Dans cette cohorte on constate, en regardant l'historique clinique depuis la naissance, que les patients SS étaient plus susceptibles de développer des vasculopathies cérébrales. Les patients qui avaient présenté au moins un accident vasculaire cérébral au cours de cinq années précédentes l'étude étaient exclus. Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents sont complexes et multifactoriels (Styles *et al*, 2000). Les vasculopathies sont généralement moins fréquentes chez les patients SC (Lionnet *et al*, 2012). Cependant, d'autres complications, comme la rétinopathie par exemple (résultats non disponibles pour cette cohorte) sont plus fréquentes chez les patients SC (Goldberg, 1976). Ainsi, l'hémoglobinopathie SC n'est plus considérée comme une forme moins sévère de l'anémie drépanocytaire SS mais plutôt comme une pathologie à part qui est caractérisée par des complications otologiques et ophtalmologiques associées à l'hyperviscosité sanguine (Lionnet *et al*, 2012; Ballas *et al*, 1982; Lemonne *et al*, 2014).

Ci-dessous, la figure 63 résume la répartition des différentes complications en fonction du génotype dans notre cohorte.

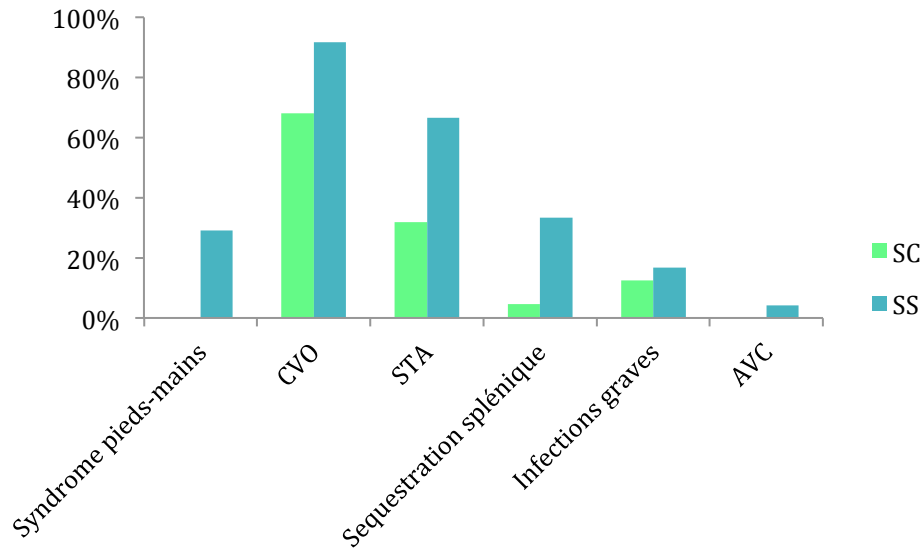


Figure 63. Répartition des complications chez les enfants SS (n = 24) et SC (n = 22).

CVO, crises vaso-occlusives ; STA, syndrome thoracique aigu ; AVC, accident vasculaire cérébral.

4. Caractéristiques hématologiques et hémolytiques

Pour des raisons éthiques, nous n'avons pas effectué de prélèvement sanguin chez les témoins.

Le recours aux valeurs de références internationales était le seul moyen pour estimer le niveau pathologique.

Tableau 3. Comparaison du profil hématologique et des marqueurs hémolytiques entre les patients avec homozygotie S (SS, n = 24) et les patients ayant la forme drépanocytaire double hétérozygote SC (n = 22).

	SC (n = 22)	SS (n = 24)
Hématocrite (%)	33.0 ± 3.2	25.4 ± 3.8 ###
Hémoglobine (g/dl)	11.5 ± 0.8	8.4 ± 1.2 ###
Hémoglobine foetale (%)	2.3 (1.4 ; 3.6)	6.8 (3.6 ; 10.3) ###
Viscosité sanguine (cP)	6.0 ± 1.0	4.8 ± 0.8 ###
Lactate déshydrogénase (IU/L)	293 ± 85	546 ± 172 ###
Bilirubine totale (μmol/L)	20.5 (14.0 ; 32.0)	44.0 (31.5 ; 78.5) ##
Réticulocytes (%)	2.9 ± 1.1	9.9 ± 4.3 ###
Indice hémolytique (a.u.)	-0.72 ± 0.35	0.69 ± 0.93 ###
Aspartate Aminotransférase (IU/L)	23.8 ± 8.6	35.4 ± 13.7##

Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± écart-type (distribution normale, test paramétrique) ou médiane (25th and 75th percentiles ; distribution non normale, test non paramétrique).

P < 0.05 vs. SC; ## P < 0.01 vs. SC; ### P < 0.001 vs. SC.

Le profil hématologique de nos patients, relevé à l'état de base correspond aux résultats cités précédemment dans la littérature (Chien *et al*, 1970; Lamarre *et al*, 2012a; Renoux *et al*, 2016). Les taux d'hémoglobine, d'hématocrite et la viscosité sanguine étaient significativement plus faibles chez les SS par rapport aux enfants SC (P < 0.001, Tableau 3). Les cycles répétés de falciformation rendent les GRs fragiles, qui par la suite se lysent facilement (Bensinger & Gillette, 1974). Ainsi, les patients drépanocytaires présentent une anémie hémolytique chronique et ont un hématocrite généralement plus faible que la population générale : AA (≈ 42%) > SC (≈ 33%) > SS (≈ 25%) (Tableau 3 et 6). La Drépanocytose est une hémoglobinopathie marquée par un taux d'hémoglobine fonctionnel faible. Par conséquent les patients anémiques souffrent en partie d'une hypoxémie au repos :

hémoglobine pour les enfants AA (≈ 12.7 g/dl), SC (≈ 11.5 g/dl) et SS (≈ 8.4 g/dl) (Tableau 3 et 6). Pour compenser le taux d'hémoglobine non-fonctionnel et l'anémie chronique, on remarque souvent une persistance de l'hémoglobine foetale chez les patients drépanocytaires (Tableau 3). La persistance de l'expression d'HbF est liée à l'existence des cellules F (riches en HbF) (Jackson *et al*, 1961; Steinberg *et al*, 1997) dont la proportion est génétiquement déterminée (Uda *et al*, 2008). Le taux d'hémoglobine foetale peut modifier l'expression clinique de la maladie (Charache *et al*, 1995). L'hydroxyurée (HU) cible ces effets en permettant d'augmenter le taux d'hémoglobine foetale. Il existe une relation exponentielle entre l'hématocrite et la viscosité sanguine (Baskurt, 2003). L'anémie hémolytique conduit à une diminution de la viscosité sanguine chez les patients SS comparé aux patients AA et SC. Quoiqu'il en soit la viscosité varie en fonction des différents facteurs hémorhéologiques (déformabilité et agrégation érythrocytaires...). Lorsque l'hématocrite était ajusté à 45%, la viscosité sanguine était similaire entre les sujets AA et SS cependant elle était plus élevée chez les sujets SC (Chien *et al*, 1970; Renoux *et al*, 2016). Dans notre cohorte il n'y avait pas de différence au niveau de la déformabilité des GRs entre les patients SS et SC (Tableau 4). D'autres études (Lamarre *et al*, 2012a) ont mesuré une déformabilité érythrocytaire à 30 Pa plus faible chez les enfants SS comparée aux enfants SC ($P < 0.001$).

Tableau 4. L'indice d'élongation (déformabilité érythrocytaire) calculé à 9 vitesses de cisaillements pour les patients SC (n = 22) et SS (n = 24) à l'aide du LORCA.

EI (Pa)	SC (n = 22)	SS (n = 24)
0	0.008 (0.000;0.027)	0.020 (0.000;0.043)
0.53	0.048 ± 0.017	0.039 ± 0.027
0.95	0.083 ± 0.017	0.079 ± 0.042
1.69	0.123 ± 0.027	0.134 ± 0.056
3.00	0.163 ± 0.042	0.189 ± 0.067
5.33	0.222 ± 0.056	0.245 ± 0.079
9.49	0.284 ± 0.067	0.302 ± 0.088
16.87	0.343 ± 0.076	0.349 ± 0.094
30.00	0.390 ± 0.082	0.384 ± 0.101

Tableau 5. Comparaison des indices d'agrégation érythrocytaire entre le groupe SC (n = 22) et le groupe SS (n = 24).

	SC (n = 22)	SS (n = 24)
AI (%)	46.4 ± 6.8	51.4 ± 8.7 #
Tf (s)	3.15 (2.54 ; 3.69)	2.60 (2.41 ; 3.46)
Ts (s)	24.89 ± 5.24	22.79 ± 5.31
Amp (au)	36.08 ± 5.78	31.33 ± 3.31 ##
t _{1/2} (s)	4.96 ± 1.60	3.98 ± 1.60
γ at dIsc min (s)	329.8 ± 124.1	252.1 ± 104.1 #

AI, indice d'agrégation ; T_f, le temps nécessaire pour la formation des rouleaux ; T_s, le temps nécessaire pour la formation des agrégats en 3 dimensions ; Amp, la quantité totale des agrégats formés après 120 secondes ; t_{1/2}, le temps nécessaire pour la formation de 50% des agrégats total ; γ at dIsc min, le seuil de désagrégation érythrocytaire.
P < 0.05 vs. SC; ## P < 0.01 vs. SC

Chez les patients SS, l'indice d'agrégation (AI) était plus élevé comparativement aux patients SC (Tableau 5). Néanmoins il semble que chez les patients SC, les agrégats une fois formés se dissocient plus difficilement (γ at dIsc min_(s) SC > SS, Tableau 5). Ceci confirme les résultats de Lamarre *et al* (Lamarre *et al*, 2012a). Les enfants SC présentaient une viscosité sanguine plus importante (Tableau 3). Par ailleurs, une agrégation érythrocytaire marquée, avec persistance d'agrégats circulants et un taux d'hématocrite plus élevé par rapport aux patients SS peut augmenter la viscosité sanguine et perturber le flux sanguin microcirculatoire, notamment à faible vitesse de cisaillement. Lamarre *et al* (Lamarre *et al*, 2014) ont démontré que les enfants SC avaient une viscosité sanguine de 18% plus importante et un excès des résistances vasculaires systémiques de 27% par rapport aux enfants SS. Des études précédentes ont montré une association entre l'hyperviscosité sanguine chronique et des complications otologiques et oculaires chez les patients SC (Lionnet *et al*, 2012).

Les paramètres hématologiques et hémo-rhéologiques jouent un rôle important dans l'expression clinique de cette pathologie. Chez les patients SS, la sévérité clinique (CVO) était associée au taux d'hématocrite ($P = 0.008$, $r_p = 0.542$) et d'hémoglobine ($P = 0.015$, $r_p = 0.499$), et à l'indice d'agrégation (AI, $P = 0.022$, $r_p = 0.476$). Chez les patients SC le taux de CVO était associé à la déformabilité érythrocytaire à faible vitesse de cisaillement (EI 0.53, $P = 0.032$, $r_p = -0.507$; EI 0.95 $P = 0.007$, $r_p = -0.609$). Ces facteurs associés à la sévérité clinique sont tous des déterminants de la viscosité sanguine. Les résultats obtenus sont donc compatibles avec l'observation préalable de nos équipes selon laquelle la viscosité sanguine est considérée comme un facteur de risque important de la survenue des CVOs (Lamarre *et al*, 2012a).

L'hémoglobine foetale et les paramètres hémolytiques (lactate déshydrogénase, bilirubine totale, réticulocytes, l'aspartate aminotransférase et l'indice hémolytique) étaient plus élevés

dans le groupe SS que chez les patients SC (Tableau 3). Ainsi, l'indice hémolytique était significativement plus marquée chez les patients SS par rapport aux SC (Tableau 3). L'hémolyse apparaît de jouer un rôle primordial dans la physiopathologie SS (Kato *et al*, 2007) surtout à cause de son effet néfaste sur la biodisponibilité du NO (Reiter *et al*, 2002; Morris *et al*, 2005a). L'hémolyse jouerait un rôle majeur dans certaines complications drépanocytaires comme l'hypertension artérielle pulmonaire, le priapisme, les ulcères de jambe, l'accident vasculaire cérébral ischémique et la glomérulopathie (Kato *et al*, 2007).

Chez les patients SS à l'état de base pour une vitesse de cisaillement donnée, la viscosité sanguine est généralement plus faible comparativement aux sujets AA et aux sujets SC (Renoux *et al*, 2016). L'anémie très marquée chez les patients SS compense probablement l'augmentation de la viscosité sanguine liée aux anomalies de la rhéologie du globule rouge (faible déformabilité érythrocytaire et agrégats érythrocytaires très robustes). Contrairement aux patients SS, le niveau hémolytique a peu été étudié dans l'hémoglobinopathie SC. Pour pouvoir déterminer le niveau hémolytique des patients SC, nous avons comparé les marqueurs hémolytiques mesurés aux valeurs de référence (Tableau 6) des enfants/adolescents non malades (Figure 64). La Figure 64 explicite que l'indice central de la distribution des patients SC est généralement placé dans/ou à la limite des intervalles de références, représentés en vert, tandis que le groupe SS se retrouve clairement en dehors de la zone verte (Figure 64). Cependant certains marqueurs indiquaient une forte hétérogénéité intragroupe.

Pour résumer, l'hémolyse était beaucoup moins sévère chez les patients SC comparés aux sujets SS, ceci a été également mentionné dans la littérature scientifique (Ballas *et al*, 1982; Nagel *et al*, 2003). La proportion en HbS est aussi plus faible chez les patients SC (Nagel *et al*, 2003). L'hémolyse ne joue probablement pas un rôle primordial dans la physiopathologie SC tandis que la viscosité sanguine semble plus être un déterminant physiopathologique dans cette population. Cette hypothèse confirme les travaux de Ballas *et al* (Ballas *et al*, 1982).

Enfin, on pourrait dire que les deux pathologies drépanocytaires ont des caractéristiques hématologiques et hémolytiques complètement distinctes, mais chacune approprié à leur expression clinique.

Tableau 6. Valeurs de référence internationale pour caractériser les sujets contrôles (AA) au niveau hématologique et hémolytique.

AA	
Valeurs de référence	
Hémoglobine (g/dl)	⁽¹⁾ 12-18 yrs: Boys 11.5- 14.8; Girls 11.2- 13.6
Hématocrite (%)	⁽¹⁾ 12- 18 yrs: Boys 34.8- 43.9; Girls 34.0 40.7
Lactate déshydrogénase (UI/L)	⁽²⁾ 12-14 yrs: 130- 280
Hémoglobine foetale (%)	⁽²⁾ > 2 yrs: < 2%
Bilirubine totale (μmol/L)	⁽³⁾ 13-18 yrs: Boys 11.8; Girls 10.48
Aspartate aminotransferase (UI/L)	⁽⁴⁾ ≤ 22
Réticulocytes (%)	⁽⁴⁾ Boys 0.48- 1.64; Girls 0.54- 2.02

⁽¹⁾ (Soldin *et al*, 2003)

⁽²⁾ (Kilham, 2001) Hay et al, 2000

⁽³⁾ (Richardson, 1994)

⁽⁴⁾ (Witt & Trendelenburg, 1982)

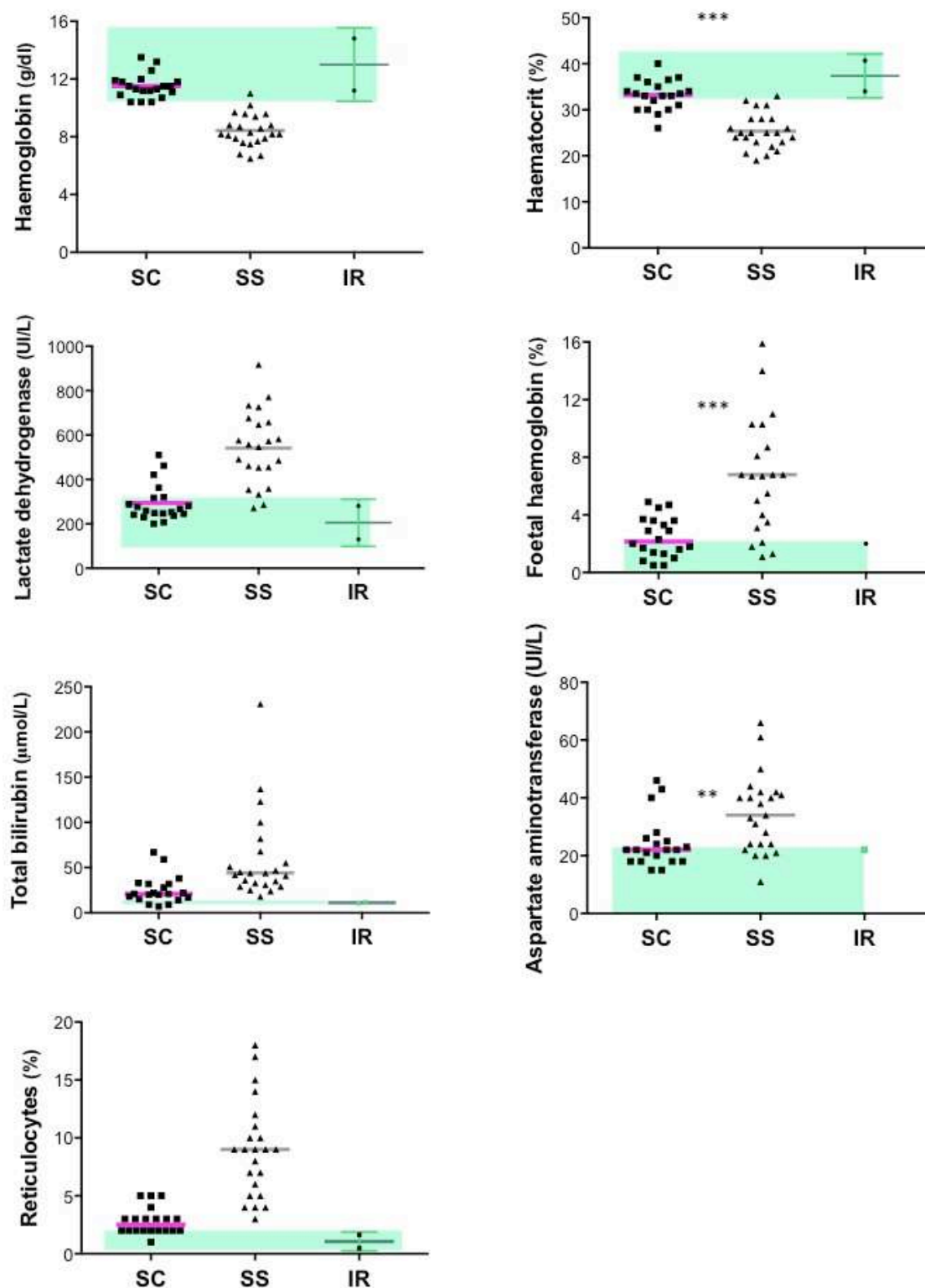


Figure 64. Marqueurs d'hémolyse chez les patients SS (n = 24) et SC (n = 22) (Tableau 3), comparé aux valeur/intervalles de références (IR) des sujets non malades (AA) (Tableau 6).

** P < 0.01 vs. SS; *** P < 0.001 vs. SS

IV.2 Caractérisation de la fonction vasculaire

1. Caractérisation de la fonction microvasculaire

Le chauffage cutané local, conduit jusqu'à 42 °C (ce qui est en dessous du seuil de douleur ($\approx 43^{\circ}\text{C}$)) induit typiquement une hyperémie biphasique du flux sanguin cutané (Figure 65) :

On remarque une rapide augmentation initiale due au réflex axonal. Le pic initial était suivi par un bref nadir. Ensuite le flux sanguin augmentait plus lentement jusqu'à atteindre un plateau.

En prenant la moyenne du flux sanguin pour chaque point de temps donné des patients d'un groupe on obtient la courbe des variations du flux sanguin cutané en fonction du temps pour chaque génotype (Figure 65).

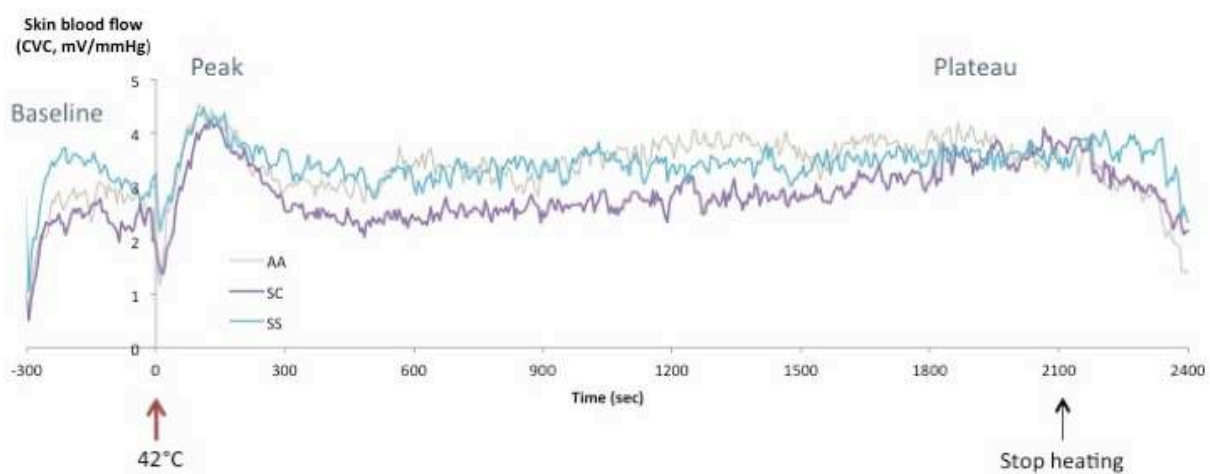


Figure 65. La réponse vasculaire à l'hyperhémie induite par chaleur.

SS, homozygote drépanocytaire (*en bleu*), SC, composite drépanocytaire avec l'hémoglobine S et C (*en violet*) et AA, sujets contrôles homozygotes de l'hémoglobine A (*beige*). Les trois phases (flux basal, réponse axonale et le plateau) sont bien visibles pour les trois groupes.

CVC, cutaneous vascular conductance

$P < 0.05$ vs. AA; $** P < 0.01$ vs. AA; $*** P < 0.001$ vs. AA

On observe que les trois groupes ne se comportaient pas de la même façon. Le flux sanguin basal était clairement plus élevé chez les patients SS comparés aux sujets AA (Figure 65) et aux patients SC ($P < 0.05$). Cependant entre les groupes il n'y a pas de différence du flux sanguin au niveau du pic et du plateau. D'autres études précédentes ont également noté un flux sanguin basal plus élevé chez les patients SS (Belhassen *et al*, 2001). Il apparaît que le flux sanguin basal élevé est lié au débit cardiaque plus élevé, caractérisant une adaptation physiologique pour compenser l'anémie et les nombreuses anomalies sanguines (Belhassen *et al*, 2001). Il en résulte probablement une augmentation des contraintes de cisaillement aux parois vasculaires (Belhassen *et al*, 2001) favorisant l'activation de la NO-synthase et la production de NO. Par conséquent les vaisseaux se dilatent localement pour atteindre des valeurs proches de leur maximum en condition basale et limitant ainsi la réserve vasodilatatrice.

Regardons maintenant la réponse vasculaire à l'hyperhémie dans les trois groupes (Tableau 7).

Tableau 7. Comparaison de la perfusion basale et des deux phases de la réponse à l'hyperémie entre les trois groupes.

	AA	SC	SS
Flux basal (mV/mmHg)	2.00 ± 1.50	2.22 ± 1.22	2.67 ± 1.33 ** #
Pic (mV/ mmHg)	4.82 ± 1.25	4.32 ± 1.65	4.68 ± 1.23
Plateau (mV/ mmHg)	4.43 ± 1.42	3.65 ± 1.58	3.72 ± 1.72
Réponse axonale (%)	414.5 (124 ; 892)	74.55 (36.61 ; 150.44) *	74.52 (29.23 ; 206.28) **
Réponse NO dépendante (%)	291.5 (203 ; 767)	90.96 (50.71 ; 198.42)	34.95 (-0.93 ; 70.58) *** #

AA, groupe contrôle ; SC, groupe drépanocytaire composite SC ; SS, la forme drépanocytaire homozygote SS. La perfusion basale (*Baseline blood flow*), le flux sanguin au niveau du pic (*peak flow*) et du plateau (*plateau flow*) sont exprimés en CVC.

Le réflexe axonal est donné par la différence entre le flux au niveau du pic et le flux basal. La réponse NO-dépendante représente la différence du flux au niveau du plateau et du flux basal. La réponse à l'hyperémie est exprimée en pourcentage, une méthode couramment utilisée pour représenter la capacité vasodilatrice (Roustit & Cracowski, 2012, 2013; Millet *et al*, 2011; Tharaux *et al*, 2002).

Ces paramètres vasculaires ont été déterminés pour chaque sujet individuellement et ensuite les indices centraux et de dispersion pour chaque groupe ont été calculés.

Les valeurs sont représentées en moyenne $\pm$ écart type ou médiane (25^e et 75^e percentiles).

P < 0.05 vs. AA; ** P < 0.01 vs. AA; *** P < 0.001 vs. AA;

P < 0.05 vs SC

La perfusion (valeurs brutes) au niveau du pic et du plateau n'était pas différente entre les trois groupes tandis que le réflexe vasculaire à la chaleur (réponse axonale) et la capacité des vaisseaux à se dilater (réponse NO dépendante) étaient altérés chez les patients drépanocytaires (Tableau 7). Le réflexe axonal était plus faible chez les patients SC et encore plus faible chez les patients SS comparés aux sujets non malades (P < 0.05 et P < 0.01 respectivement) (Tableau 7). La réponse vasculaire NO dépendante était plus faible chez les patients SS par rapport aux patients SC (P < 0.05) et aux sujets AA (P < 0.001) (Tableau 7).

Ainsi, il semble que les patients SS ont une fonction vasculaire altérée déjà depuis l'enfance (De Montalembert *et al*, 2007). En général, augmenter la taille vasculaire semble être plus difficile pour les patients SS. C'est probablement dû au fait que leurs vaisseaux se retrouvent déjà au repos dilatés presque à leur maximum. Plusieurs études avec différentes méthodes (Aessopos *et al*, 2007; Belhassen *et al*, 2001; Aslan *et al*, 2001; Reiter & Gladwin, 2003) démontrent une faible réactivité vasculaire chez les patients SS. Des facteurs multiples sont probablement responsables de cette vasculopathie progressive atteignant à la fois la microcirculation mais aussi la macrocirculation : le stress oxydatif (Kato *et al*, 2009; Chirico & Pialoux, 2012), l'hémolyse (Kato *et al*, 2006a; Minneci *et al*, 2005), l'hypoxémie artérielle (Lonsdorfer *et al*, 1983), etc. Généralement, il est connu que le taux d'hémolyse et l'anémie sont plus sévères chez les SS comparés aux SC et AA (Ballas *et al*, 1982). Dans ce contexte,

il n'est pas surprenant que la vasodilatation NO dépendante soit plus faible chez les patients SS comparés aux patients SC et aux sujets AA.

Non seulement la capacité vasodilatrice était altérée, mais aussi le réflexe axonal à la chaleur au niveau de la microcirculation périphérique était plus faible chez les patients SS (Tableau 7). On pourrait penser que la vasodilatation chronique chez les patients SS affecte également la régulation hypothalamique, cette dernière ne réagissant plus de la même façon à cause de la stimulation continue.

Le contrôle et le réflexe vasculaire sont indispensables pour compenser les résistances face au flux sanguin. Pour cette raison, on suppose qu'une augmentation de la viscosité sanguine associée à une dysfonction vasculaire intensifient les résistances vasculaires périphériques, ce qui pourrait ralentir le flux sanguin dramatiquement et ainsi favoriser la polymérisation et augmenter le risque de crises vaso-occlusives (Reiter & Gladwin, 2003).

Dans notre cohorte, on observe que la réponse vasculaire diffère entre les SS et les SC au niveau du plateau mais pas au niveau du pic (Tableau 7). Ainsi, comparés aux sujets contrôles, les jeunes patients SC montrent une dysfonction de la réponse axonale ($P < 0.05$) mais pas de la réponse vasculaire NO-dépendante. La diminution du réflexe axonal peut être liée à une diminution de la sensibilité à la chaleur, à une diminution de la libération des neurotransmetteurs ou à une faible réponse vasculaire au neurotransmetteur (Holowatz & Thompson-Torgerson, C., Kenney, 2010). Bien que les patients SC aient une hyperviscosité sanguine, la capacité vasculaire vasodilatrice apparaît généralement mieux conservée que chez les patients SS. L'altération seulement du réflexe axonal pourrait représenter une phase préliminaire du développement de la dysfonction vasculaire qui pourrait s'aggraver progressivement. D'autres études seront nécessaires pour étudier le développement de cette dysfonction vasculaire.

Finalement pour résumer les différences inter groupes, selon nos résultats concernant la fonction microvasculaire, on passe d'une fonction vasculaire intacte (AA) à une fonction

vasculaire en partie altérée (SC) à finalement une dysfonction vasculaire très marquée affectant le réflexe axonal et la réponse NO dépendante chez les SS.

Particularités

a) Rôle de la température cutanée

La réponse vasculaire à l'hyperhémie est caractérisée dans les trois groupes (AA, SC et SS) au moment de l'augmentation de la température (temps 0) par une nette diminution de la perfusion (Figure 65). Ceci a été décrit seulement marginalement (Khaleel *et al*, 2015). Khaleel *et al* (Khaleel *et al*, 2015) parle du *heat pain induced vasoconstriction*. La température de 42°C est pourtant inférieure au seuil de douleur, tant en théorie que dans nos observations (aucun de nos patients, même interrogés sur ce point, n'a exprimé de plainte ni même de désagrément). Cependant Nagasaka *et al* (Nagasaka, 1987; Nagasaka *et al*, 1987) ont également observés ce phénomène de "heat induced vasoconstriction" en comparant la perfusion cutanée au niveau du bout du doigt durant une augmentation progressive de la température de l'eau dans laquelle les doigts ont été baignés. Ils observent que cette vasoconstriction de courte durée se manifestait seulement dans un climat chaud et humide (35°C et 40-80%), *ce qui est également le cas en Guadeloupe*. Dans notre étude, la salle était climatisée, mais la température a été contrôlée manuellement pour maintenir le confort des patients. Chez tous les sujets ayant une température cutanée de base de 34-35°C (c'était la majorité) nous avons observé cette diminution de la perfusion entre 10 et 15 secondes après le chauffage. La chute est brusque et dure au maximum 15 secondes. Elle avait lieu parallèlement avec l'augmentation graduelle de la température cutanée, donc dans la phase où la température cutanée passe de 34°C à 40/41°C. Ensuite, lorsque la température atteignait les 42°C, la perfusion remontait rapidement vers le pic. Chez certains sujets qui avaient une température cutanée initiale $\leq$ à 30°C (contrôles ou

patients) cette nette diminution était absente. Nos résultats confirment l'hypothèse de Nagasak, qui propose qu'il s'agisse d'un mécanisme de protection et d'adaptation physiologique (Nagasaka, 1987; Nagasaka *et al*, 1987). Dans un climat chaud humide, on se trouverait dans un état hyperthermique. Lorsque, dans cette condition, le corps est exposé à une température encore plus élevée, les vaisseaux cutanés se contractent transitoirement pour éviter l'entrée supplémentaire de la chaleur (Nagasaka, 1987). Lorsque la température cutanée passe un certain seuil (42°C), la vasodilatation domine la vasoconstriction afin d'éviter les dommages tissulaires. De plus, il a été montré que la sensation à la chaleur est proportionnelle au degré de la vasoconstriction (Nagasaka, 1987). Plus les vaisseaux se contractent, plus on ressent le changement thermique. Ainsi la température cutanée au repos n'a pas seulement un influence sur le flux sanguin basal mais également sur le degré de la vasoconstriction et ainsi sur la sensation à la chaleur. Pour les futures études un contrôle strict de la température cutanée sera absolument nécessaire.

b) Vasoconstriction induite par la chaleur

La Drépanocytose est une maladie caractérisée par une grande variabilité de l'expression clinique. La plupart des patients SS et SC montraient une réponse avec les deux phases bien visibles mais certainement plus faible comparativement aux sujets non malades. Cependant quelques patients n'ont pas répondu de la même façon (Tableau 8).

Tableau 8. Classification de la réponse à l'hyperémie induite par la chaleur selon la courbe d'hyperthermie obtenue.

	SC	SS
Réponse en 2 phases	74%	50%
Absence du pic	11%	15%
Absence du plateau	5%	10%
Pas de réponse	5%	5%
Réponse négative	5%	20%

En général, on pouvait distinguer quatre degrés de dysfonction vasculaire allant d'une réponse vasculaire typique biphasique mais plus faible (niveau 1) à une altération plus marquée de la fonction vasculaire avec l'absence totale du pic (altération du réflexe axonal) ou du plateau (altération du métabolisme de NO) (niveau 2) et ensuite à une absence totale des deux phases donc sans modification par rapport au flux sanguin de départ (niveau 3) (Tableau 8). On peut se demander s'il s'agit d'une dysfonction vasculaire proliférative passant de niveau 1 au niveau 3 ou s'ils représentent l'hétérogénéité clinique typique de cette maladie.

Au final, nous avons observé pour la première fois chez 20% des patients SS une réponse négative donc une vasoconstriction prolongée induite par la chaleur (Figure 66). Le flux sanguin remontait dès l'arrêt de la chaleur. Un seul patient SC a également montré une telle réponse.

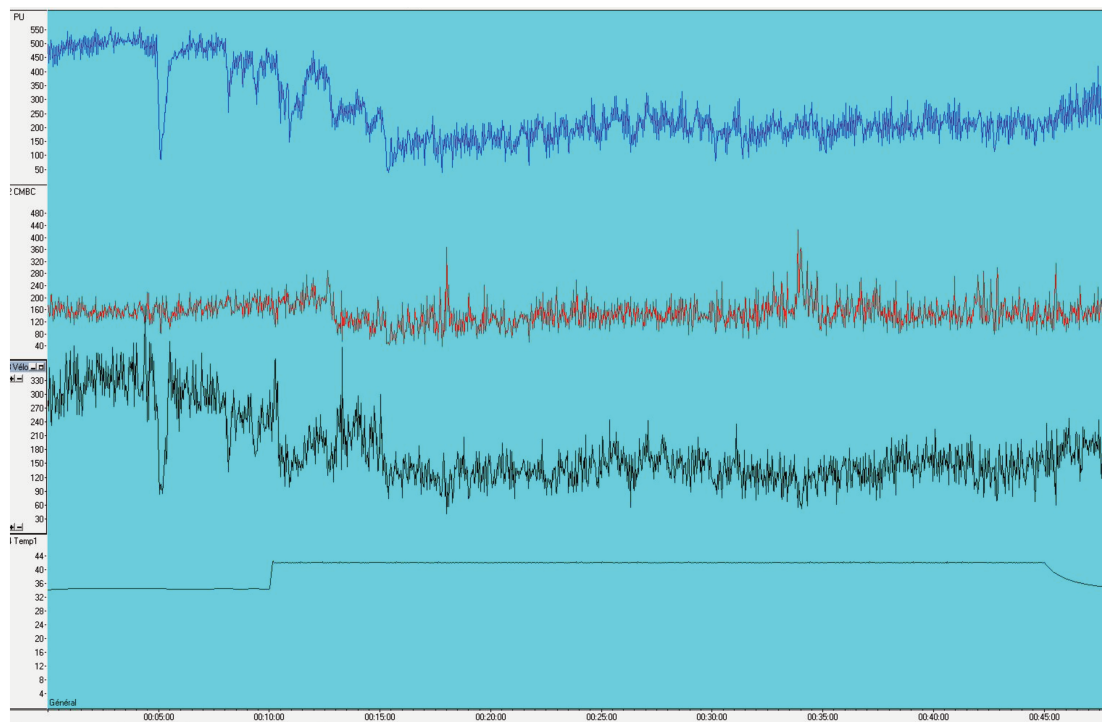


Figure 66. Capture d'écran d'une réponse négative d'un patient SS. En *bleu*, la perfusion; en *rouge*, CMBC ; en *noir* la vélocité sanguine et en bas l'évolution de la température (l'augmentation à 42°C est bien visible).

Ce phénomène n'a pas été observé dans la littérature. Cependant il faut considérer que le test d'hyperémie à la chaleur a été utilisé pour la première fois dans la population drépanocytaire en respectant les recommandations de Roustit & Cracowski, 2012. Si on considère qu'il ne s'agit pas d'un problème technique, on peut se demander, pourquoi une suppression du réflexe axonal et de la réponse NO dépendante conduiraient à une vasoconstriction prolongée et non pas au retour du niveau de la perfusion de départ.

On pourrait proposer deux hypothèses. Il est probable qu'il s'agisse d'une réponse de « défense »:

Chez les patients anémiques la régulation du flux sanguin se fait en faveur des organes centraux. Une augmentation supplémentaire de la température cutanée devrait induire une déviation encore plus accentuée du flux sanguin central vers la périphérie mettant en risque l'alimentation cervicale et des organes centraux. Ainsi il pourrait

s'agir d'une stratégie adaptative pour conserver une oxygénation adéquate des organes vitaux, même si ici le stress hyperthermique était localisé à une zone réduite de la peau. Si c'est le cas on peut juste imaginer que ceci devrait induire également une altération de la thermorégulation à l'exposition prolongée de la chaleur ou lors d'un exercice.

La deuxième hypothèse serait qu'il s'agisse d'une réponse pathologique. Selon cette approche, le métabolisme de NO est déjà saturé au repos et ne peut pas répondre aux besoins supplémentaires. La non-adaptation au changement thermique augmenterait le stress oxydatif. La formation des radicaux oxydatifs renforcerait la diminution en NO et ils activeraient le *RhoA/Rock pathway* (Figure 67) (Bailey *et al*, 2005). En conséquence, le NO diminue encore plus (Figure 67) et il en résulte probablement la vasoconstriction prolongée. Cette up régulation du *RhoA/Rock pathway* a été également observée dans d'autres maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, le diabète et le vasospasme cérébral (Noma *et al*, 2006). Le nombre des patients SS montrant une telle réponse négative n'est pas suffisant pour faire des analyses statistiques. Cependant on remarque que tous ces patients ont également un niveau en FRAP (1580.0 ± 266.8 vs 1183.0 ± 335.9 , $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$ pour les patients SS avec une réponse négative vs les autres patients SS, respectivement) et en nitrotyrosine (54.9 (35.9 ; 67.5) vs 17.5 (11.9 ; 25.8), nmol/L , $P = 0.001$, pour les patients SS avec une réponse négative vs les autres patients SS, respectivement) plus élevés. Une étude sera nécessaire pour vérifier cette approche.

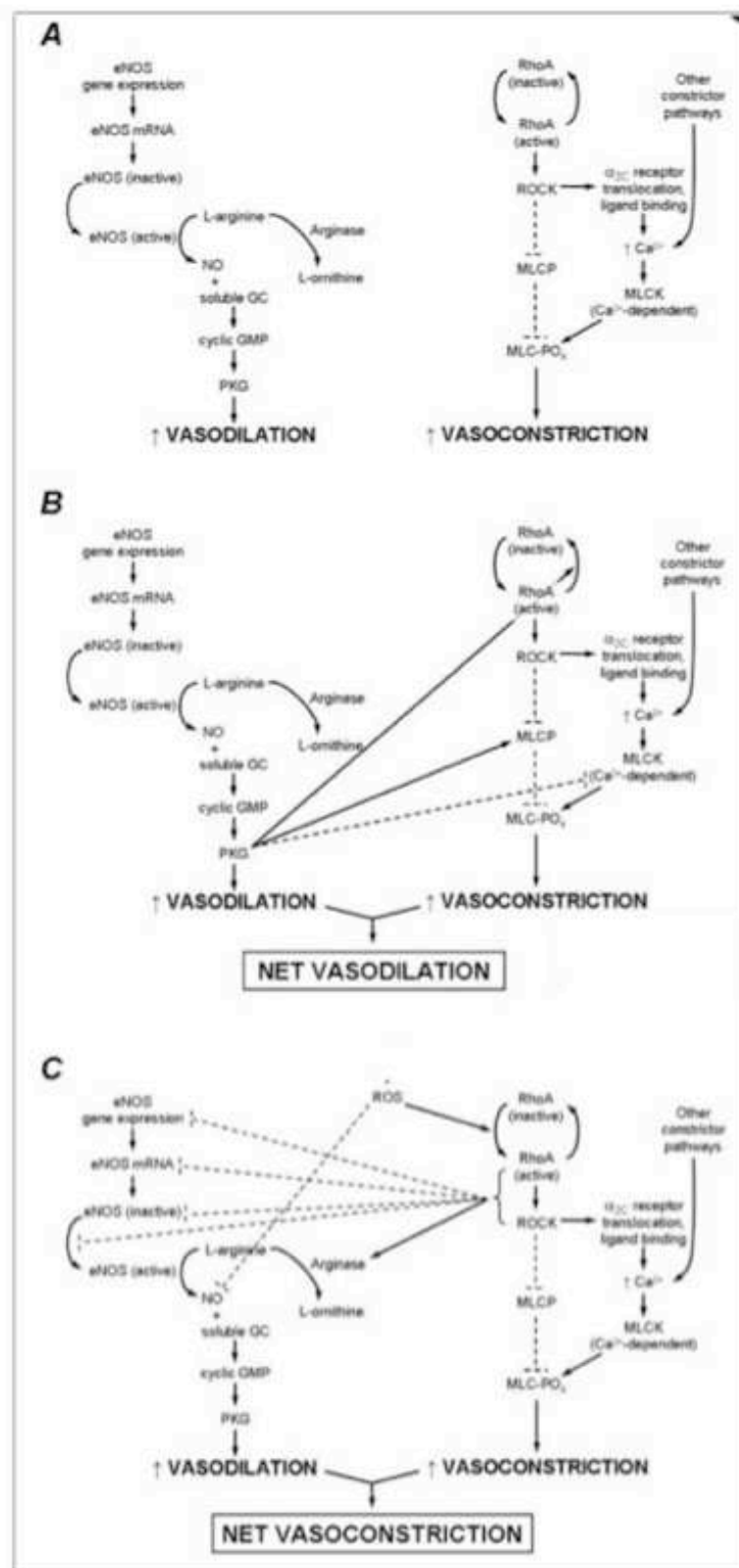


Figure 67. Implication de la voie *RhoA/Rock* dans le contrôle vasculaire

(Holowatz et al, 2010).

c) L'implication de la puberté

Selon le stade de Tanner (Pilosité pour garçons/filles et le développement des seins pour les filles) de la plupart des participants étaient classés comme « adolescent ». 85% des filles SC et 82% des filles SS avaient leur menstruation depuis au moins 1 an. D'autres paramètres nécessaires pour déterminer le statut de la puberté n'ont pas été objectivés dans le cadre de cette étude. L'effet de la puberté sur la fonction vasculaire est généralement très discuté (Sokolnicki *et al*, 2007; Brooks-Asplund, 1998). Plusieurs études ont démontré qu'estrogène et progestérone peuvent affecter directement la vasomotricité des vaisseaux sanguins (Charkoudian *et al*, 1999; Bartelink *et al*, 1990; Colucci *et al*, 1982; Gilligan *et al*, 1994; Miller & Vanhoutte, 1991). La variation de ces hormones peut avoir des causes endogènes (Stephenson, 1985) ou exogènes (contraceptifs oraux) (Charkoudian, & Johnson, 1997, 1999). Il est probable que les changements hormonaux ont une influence sur la fonction microvasculaire directement et indirectement. L'estrogène peut améliorer la capacité vasodilatrice NO dépendante par l'activation de la NO-synthase et ainsi par la stimulation de la synthèse de NO (Hayashi *et al*, 1995; Gilligan *et al*, 1994). L'influence des hormones sur la fonction vasculaire est assez connue chez les filles comparées aux garçons, chez qui peu d'études ont investigué cette question. La testostérone est un possible vaso-inhibiteur et peut probablement inhiber la réponse NO dépendante (Karakitsos *et al*, 2006). Les changements des hormones stéroïdiennes peuvent induire des variations de la thermorégulation et moduler la réponse à l'hyperémie (Charkoudian 2014, Hessemer *et al*, 1985). De plus, l'adolescence est accompagnée par des changements psychologiques, sociaux et du mode de vie habituel. Par conséquent, l'activité physique, la nutrition, le stress, etc. changent avec des implications vasculaires possibles (Kelishadi *et al*, 2008). Il est

généralement admis que la puberté commence tardivement chez les patients atteints de la drépanocytose. Le stade Tanner III pour la pilosité chez les garçons et filles débutent plus tardivement chez les patients SC et encore plus tard chez les patients SS (Platt *et al*, 1984). La menarche est généralement retardée chez les patientes drépanocytaires (Jimenez *et al*, 1966; Alleyne *et al*, 1981). Elle débute en fonction de l'âge et de la masse corporelle des patients (Platt *et al*, 1984). Tous ces paramètres varient en fonction de la prise en charge des patients (Alleyne *et al*, 1981; Ashcroft & Serjeant, 1981; Graham *et al*, 1986). La prise des contraceptifs oraux chez les patientes atteints de cette maladie est discutée à cause des risques plus élevés de développer des effets secondaires comme par exemple les thromboses cérébrales et pulmonaires (Haynes & Dunn, 1967).

Cependant dans cette étude la dysfonction vasculaire n'était ni liée au sexe ni à l'âge. En conclusion, on ne peut pas exclure l'effet probable de la puberté sur la fonction vasculaire mais d'autres études seraient nécessaires pour éclairer ce point.

d) Vasomotion et flowmotion

Le phénomène local de vasomotion et flowmotion est un mécanisme complémentaire présent physiologiquement pour contrôler et maintenir le flux sanguin. Sa fréquence et son amplitude changent selon la taille du vaisseau concerné (Colantuoni *et al*, 1984). Cependant dans certaines pathologies comme le diabète (Stansberry *et al*, 1996), l'hypertension (Rossi *et al*, 2006) et la drépanocytose (Rodgers *et al*, 1984a), on remarque une augmentation des oscillations d'origine myogénique et centrale (neuronale, respiratoire et cardiaque). Les oscillations spontanées au niveau de la macrocirculation (Kim *et al*, 2009; Shi *et al*, 2014) et de la microcirculation (Rodgers *et al*, 1984a; Kennedy *et al*, 1988; Lipowsky *et al*, 1987; L'Esperance *et al*, 2013) sont

probablement une adaptation pour compenser les résistances périphériques accrues chez les patients atteints de la drépanocytose SS et SC et pour maintenir une perfusion adéquate. Ce mécanisme vasculaire de contrôle et de compensation des résistances périphériques est principalement efficace à cause de la puissance 4 du rayon vasculaire décrit dans la relation de Poiseuille. Le vasomotion permet également d'augmenter la pression locale capillaire émise sur les globules rouges. Cette pression est nécessaire pour augmenter la déformabilité érythrocytaire selon la relation linéaire entre le flux et la pression pour les fluides newtoniens (Intaglietta, 1990). La présence d'un flux microcirculatoire oscillatoire est un phénomène complexe mais il semble qu'il est corrélé au taux d'hémoglobine des patients SS et au contenu de leucocytes et plaquettes chez les patients SC (Kennedy *et al*, 1988). Les oscillations sont dues à une décharge spontanée et locale au niveau de la paroi vasculaire sous l'influence du système sympathique. La mesure du vasomotion et flowmotion est délicate et les résultats varient en fonction de la localisation de la mesure et de la méthode d'analyse appliquée (Schmidt *et al*, 1993).

Nous avons vu dans les résultats précédents que les patients drépanocytaires démontraient une altération du réflexe axonal, qui est contrôlé par le système nerveux sympathique. Contrairement à ce que nous attendions, la médiane de fréquence de chaque intervalle de spectre n'était pas statistiquement différente entre les trois groupes (Figure 68).

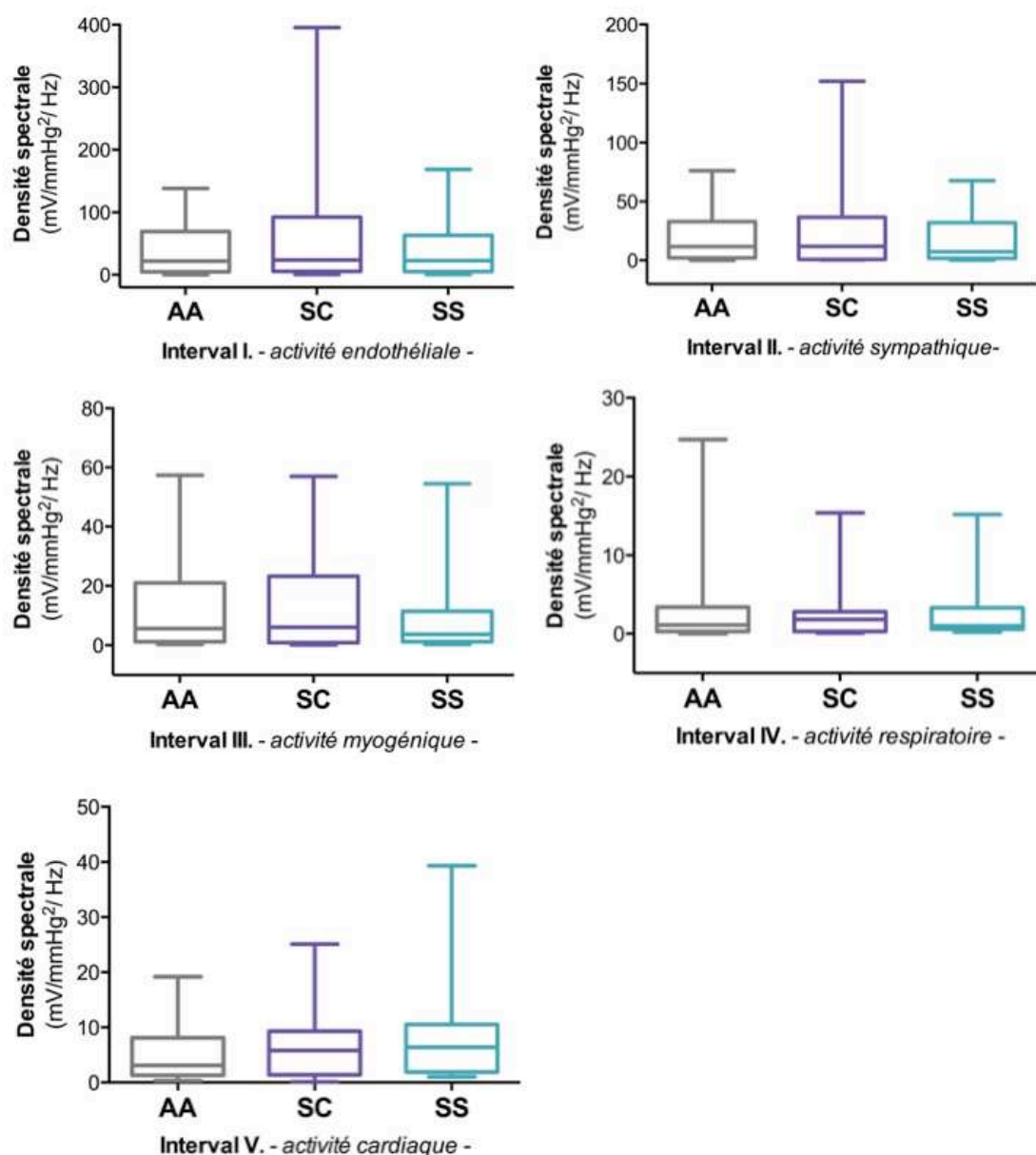


Figure 68. Résultats d'analyse spectrale par transformée de Fourier de la perfusion cutanée basale chez les volontaires sains (AA), les patients SC et les patients SS. L'analyse spectrale a été effectuée pour les cinq intervalles de fréquences prédéfinis :

Intervalle I de 0.01-0.019 Hz, Intervalle II de 0.02-0.059 Hz, Intervalle III 0.06-0.149 Hz, Intervalle IV. 0.15-0.499Hz et Intervalle V. de 0.5-2.00Hz.

La distribution est représentée en boxplot avec la médiane au centre, délimitée par les quartiles Q1 et Q3 et la valeur maximale et minimale.

Ainsi, L'analyse spectrale par transformation de Fourier du flux sanguin cutané au repos ne permet pas de discerner la régulation vasculaire locale (activité endothéliale). Le flowmotion

est particulièrement nécessaire lors d'un faible flux sanguin pour assurer une perfusion minimale (Schmidt *et al*, 1993) et améliorer l'oxygénation tissulaire (Tsai & Intaglietta, 1993). Selon nos résultats il n'y a pas de différence du vasomotion et de flowmotion au niveau de la microcirculation cutanée entre les patients drépanocytaires et les témoins (Figure 69). Ceci est également le cas lors d'une analyse en densité spectrale normalisée.

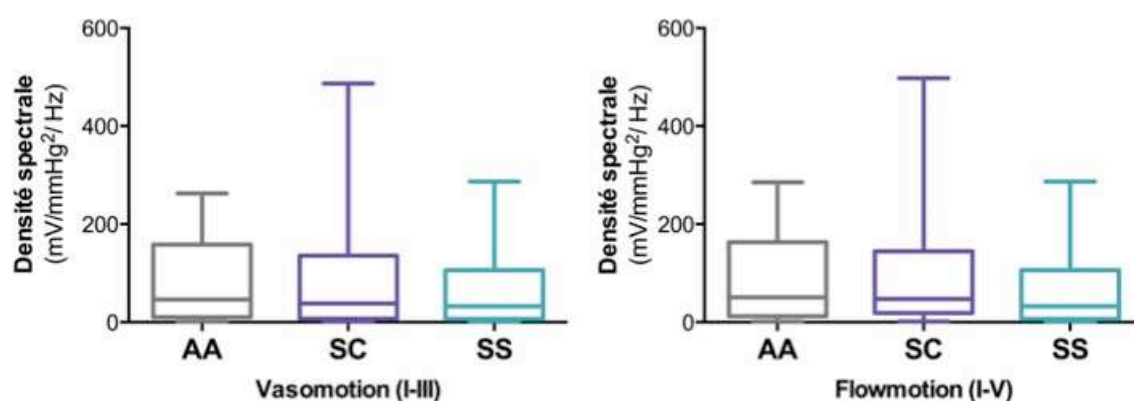


Figure 69. Vasomotion & Flowmotion

L'amplitude absolue de l'intervalle totale 0.005-2Hz (flowmotion) et de l'intervalle de 0.005-0.15Hz (vasomotion) chez les volontaires sains et les patients SC et SS. Les données sont représentées sous la forme de graphes en boîtes représentant la distribution autour du médiane avec le 25^e et 75^e percentiles et le valeur minimale et maximale.

Une augmentation de la température cutanée locale augmente l'activité du vasomotion chez les patients sains et chez les patients diabétiques (Shapiro *et al*, 1998). La perfusion microcirculatoire chez tous les sujets de notre cohorte étaient sous l'influence du climat tropical. La réponse à l'hyperémie des sujets démontrait que, déjà au repos, ils étaient probablement dans un état d'adaptation à l'hyperthermie. L'augmentation du diamètre vasculaire et les oscillations spontanées ont comme but de maintenir une perfusion et une oxygénation tissulaire stable. Ainsi il est probable que les oscillations sont également plus élevées chez les sujets sains, en cachant la différence entre les groupes.

On remarque une grande variabilité intragroupe, au niveau de l'activité endothéliale et sympathique pour les patients SC et au niveau de l'activité cardiaque pour les patients SS (Figure 68), associée certainement à la diversité de l'expression clinique. Les patients drépanocytaires présenteraient une altération importante de la réponse à l'hyperhémie thermique en terme d'amplitude et de cinétique. Il sera intéressant de suivre l'évolution des différentes fréquences en fonction du temps lors d'un tel test, comme cela a été déjà fait dans autres populations (Jan *et al*, 2009).

2. Caractérisation de la fonction macrovasculaire

La compliance, la distensibilité et l'élasticité de la paroi artérielle sont des propriétés mécaniques de la paroi endothéliale. Ils jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'écoulement sanguin et dans la modulation de la vitesse de l'onde de pouls (VOP) (Vappou *et al*, 2011). Nos résultats ont permis de montrer que la VOP carotido-radiale était plus élevée chez les sujets SS comparés aux sujets sains ($P = 0.03$, Figure 70) alors que la VOP centrale mesurée entre l'artère fémorale et l'artère carotide n'était pas différente entre les trois groupes (Figure 70).

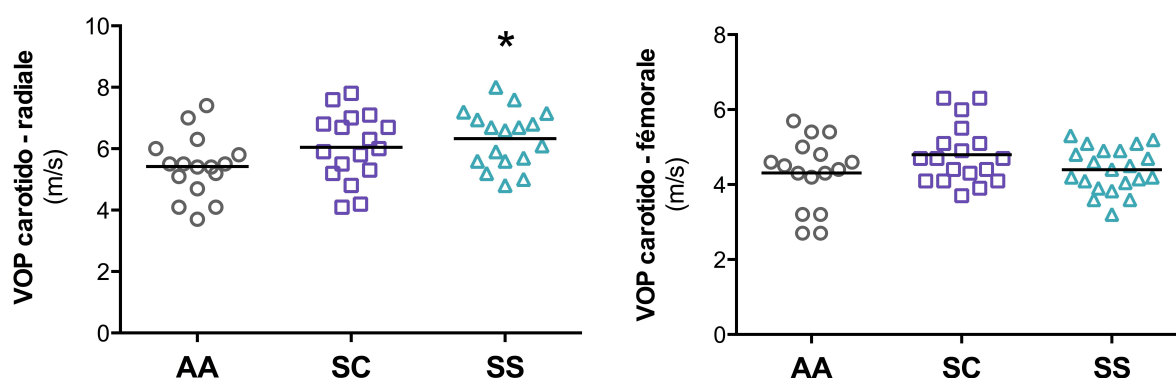


Figure 70. La vélocité de l'onde de pouls (VOP) entre l'artère carotide et l'artère radiale (à gauche déterminé chez 16 AA, 17 SC, 17 SS) et entre l'artère carotide et l'artère fémorale (à droite déterminé chez 16 AA, 18 SC et 21 SS).

Les moyennes ont été comparées par ANOVA à une voie suivie par un test de post-hoc de Newman-Keuls. * $P < 0.05$ vs. AA.

Il est communément admis que la rigidité artérielle centrale contribue à une élévation de la pression pulsée (Feihl *et al*, 2009), et par conséquent à une augmentation de la pression artérielle moyenne, augmentant à son tour les résistances périphériques ce qui peut engendrer des dommages tissulaires. Dans ce contexte, une VOP CF plutôt préservée et ainsi un bon fonctionnement des artères centrales chez les patients SS, évite probablement une élévation de la pression sanguine.

Les paramètres cardiovasculaires (Tableau 9) sont très similaires dans ces trois groupes.

Tableau 9. Comparaison des variables cardiovasculaires entre les sujets sains (AA) et les patients drépanocytaires SC (n = 22) et SS (n = 24)

	AA (n = 16)	SC (n = 22)	SS (n = 24)
Pression systolique (mmHg)	114 ± 9	112 ± 14	115 ± 8
Pression diastolique (mmHg)	57 ± 6	61 ± 9	56 ± 8
Pression artérielle moyenne (mmHg)	74 (71; 81)	75 (70 ; 83)	75 (72 ; 80)
Pression pulsée (mmHg)	57 ± 9	51 ± 10 *	59 ± 12
Fréquence cardiaque (b/min)	77 ± 12	76 ± 10	84 ± 12 #

La pression pulsée et la pression artérielle moyenne ont été calculées par la pression systolique et la pression diastolique. La fréquence cardiaque représente la moyenne de la phase allongée qui durait 50 min. Les données sont représentées par la moyenne ± écart-type ou la médiane (25 et 75 percentiles).* $P < 0.05$ vs. AA; # $P < 0.05$ vs. SC

La VOP CF était dans l'ensemble des participants positivement corrélée à l'âge ($P = 0.014$, $r = 0.329$), à la masse corporelle ($P = 0.032$, $r_p = 0.290$), à l'IMC ($P = 0.008$, $r_s = 0.352$), au taux d'hématocrite ($P = 0.015$, $r_p = 0.387$) et avec une tendance de lien au taux

d'hémoglobine ($P = 0.072$, $r_p = 0.291$), comme décrit précédemment (Ranque *et al*, 2016). Il n'y a pas de lien avec la fréquence cardiaque ni entre la VOP CR et ces paramètres. L'âge est habituellement le facteur le plus important contribuant à l'augmentation de la VOP. Nous n'avons pas pu constater de différence de VOP CR et CF entre les patients plus âgés (≥ 13 ans, 5.6, 6.1, 6.2 et 4.3, 4.8, 4.5 pour VOP CR et la VOP CF des AA ($n = 11$), SC ($n = 15$) et SS ($n = 14$), respectivement) et les patients plus jeunes (< 13 ans, 5.0, 6.0, 6.9 et 4.3, 4.4, 4.0 pour VOP CR et la VOP CF des AA ($n = 5$), SC ($n = 2$) et SS ($n = 4$), respectivement). L'effectif des groupes était cependant très petit. De plus la fourchette d'âge est probablement trop resserée et les sujets sont trop jeunes pour pouvoir déterminer une possible contribution de l'âge.

D'autres études ont démontré que les VOP CR et CF sont plus faibles chez les patients drépanocytaires (Lemogoum *et al*, 2004; Ranque *et al*, 2016). L'étude CADRE (Ranque *et al*, 2016) avec 3627 patients (enfants et adultes) a mesuré une VOP CF plus faible ($P < 0.0001$) chez les patients drépanocytaires (7.5 ± 2.0 m/s) comparés aux sujets non malades (9.1 ± 2.4 m/s). De plus elle était encore plus faible chez les patients SS que chez les patients SC. En général, les valeurs mesurées dans l'étude CADRE sont bien plus élevées que les résultats que nous avons observés. Les raisons de ces différences demeurent inexpliquées pour le moment et très peu d'études se sont intéressées à la VOP en général chez le drépanocytaire. L'expression clinique de la Drépanocytose est modulée par des facteurs environnementaux tels que les conditions de vie et la prise en charge globale de la maladie. Le projet CADRE a eu lieu en Afrique subsaharienne avec des conditions de prise en charge et des conditions de vie certainement très différentes de celles en Guadeloupe. Le suivi et l'accompagnement régulier des patients drépanocytaires guadeloupéens depuis la naissance par l'UTD Guy Merault permet une détection précoce des complications et a très probablement permis de diminuer significativement la morbidité et la mortalité par rapport à des patients vivants en

Afrique. Des études supplémentaires comparatives seront probablement nécessaires pour expliquer les raisons de ces divergences dans la littérature scientifique.

En général, on remarque une perte progressive de l'élasticité artérielle de l'aorte (l'artère la plus élastique) vers les lits artériels périphériques où les fibres musculaires et de collagène dominent. Dans le cas de la Drépanocytose, le manque continu en oxygène dans les tissus périphériques pourrait provoquer une augmentation chronique de l'activité cardiaque (Belhassen *et al*, 2001). Selon la loi de Laplace une augmentation de la pression intraluminaire et ainsi du stress intra-mural (Caro, 1978) se traduit par une extension vasculaire permanente. Par conséquent les vaisseaux deviennent plus rigides et moins élastiques. Les vaisseaux de la microcirculation sont adaptés à un flux sanguin lent nécessaire pour un bon échange nutritif avec les tissus. Ainsi une perfusion constante élevée, comme nous l'avons observé dans la microcirculation ou comme cela a été rapporté dans la macrocirculation (Belhassen *et al*, 2001), entraîne potentiellement des lésions endothéliales et tissulaires surtout si les mécanismes d'autorégulation vasculaire sont déficients.

La pression pulsée était plus faible chez les patients SC comparés aux patients SS (Tableau 9). Il semble que le système vasculaire soit moins affecté chez les patients SC et qu'ils aient généralement un bon fonctionnement vasculaire central et périphérique par rapport aux patients SS. Ceci devrait permettre de diminuer le risque des comorbidités cardiovasculaires (Safar *et al*, 2013). Chez les patients SS la rigidité artérielle périphérique était plus marquée comparativement aux patients SC et elle était corrélée à la dysfonction vasculaire microcirculatoire périphérique (Figure 71). Cette corrélation est absente chez les sujets sains et chez les patients SC (Figure 71).

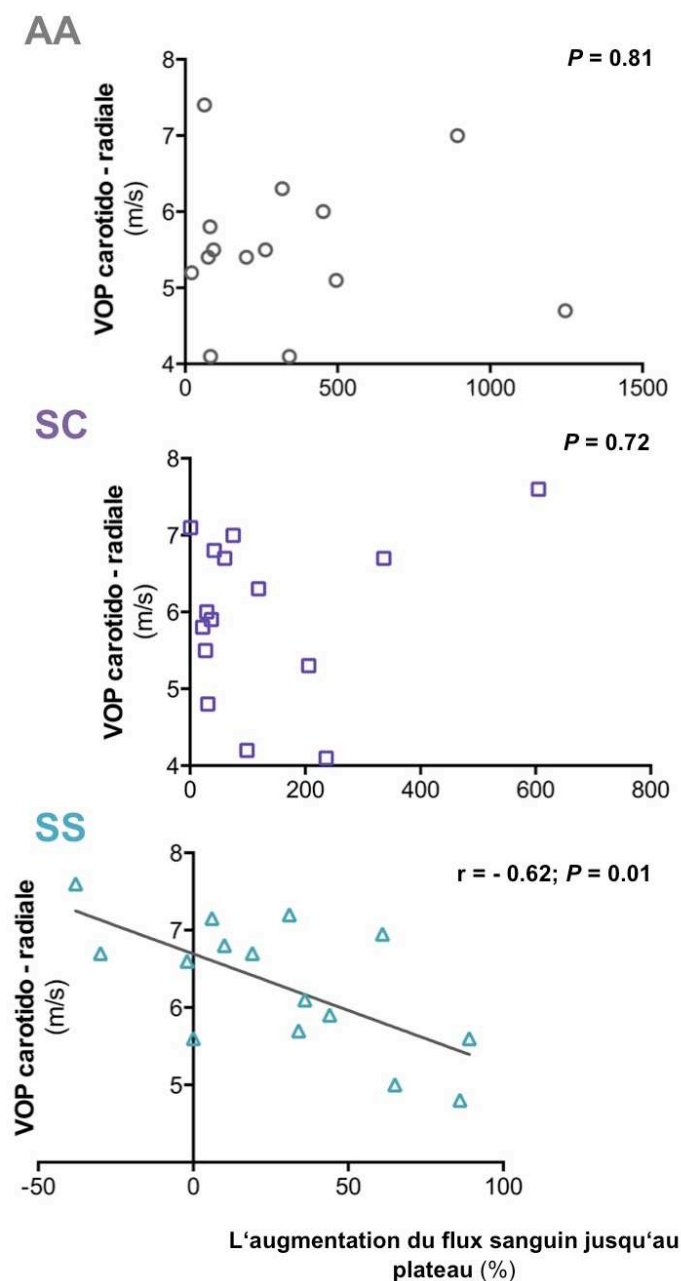


Figure 71. Relation entre la VOP périphérique carotide-radiale et la réponse microvasculaire à l'hyperémie NO-dépendante chez les trois groupes AA, SC et SS.

Déterminée par un test de Spearman avec SPSS.

La forme drépanocytaire SC a été longtemps considérée comme moins sévère que la forme homozygote SS et très peu d'études (Mohan *et al*, 2011) ont caractérisé la fonction vasculaire (micro et macro) chez les patients SC. Néanmoins aujourd'hui, on considère plutôt ces deux pathologies drépanocytaires comme deux maladies distinctes (Lamarre *et al*, 2012a; Lionnet *et al*, 2012). Tandis que les patients SC montrent un risque plus élevé pour des complications

telles que la rétinopathie, l'ostéonécrose et les troubles otologiques qui sont probablement en lien avec la viscosité sanguine (Lionnet *et al*, 2012; Lemonne *et al*, 2014), les crises vasoocclusives et l'hémolyse sont plus fréquentes chez les patients SS. Nous avons observé que ces deux groupes ne se distinguent non seulement au niveau de certaines caractéristiques hémorheologiques et cliniques (Lee *et al*, 1998; Tripette *et al*, 2009), mais également au niveau de l'état vasculaire. Chez les patients SS, on remarque un système cardiovasculaire plus altéré et probablement sursollicité avec une dysfonction périphérique micro et macrocirculatoire marquées. On ne sait pas si les dommages vasculaires se développent progressivement en impliquant peu à peu des lits artériels plus larges et plus centraux, affectant en fin complètement le système cardiovasculaire. Les fonctions micro et macrovasculaires des patients SC étaient généralement mieux préservées et moins altérées comparativement aux patients SS. Le bon fonctionnement vasculaire permet probablement de compenser la haute de la viscosité sanguine et ainsi de contrôler les résistances vasculaires systémiques. On arrive à la question suivante : Quels sont les facteurs intervenant dans la détermination de la fonction vasculaire dans cette maladie et dans la différenciation de ces deux groupes ?

IV. 3 Facteurs déterminants de la fonction vasculaires

1. Rôle des paramètres hémorhéologiques et hématologiques dans la détermination de la fonction vasculaire

a) Rôle de l'anémie

Des tests statistiques supplémentaires ont été effectués pour vérifier l'impact potentiel de l'hématocrite. Pour cela le flux sanguin cutané basal, le flux au niveau du pic et au niveau du plateau ont été corrigés par l'hématocrite. Ces valeurs corrigées ont été utilisées pour recalculer et comparer l'efficacité de la réactivité vasculaire. La perfusion basale était plus élevée et la réactivité vasculaire restaient plus faibles chez les patients SS ($P < 0.05$). En outre, dans tous les groupes et plus particulièrement chez les SS, le taux d'hématocrite/d'hémoglobine n'était pas corrélé à la réactivité vasculaire, ni au flux sanguin initial, ni à la VOP carotido-radiale ou à la VOP carotido-fémorale ($P > 0.05$). Nos résultats confirment l'étude de Nur *et al* (Nur *et al*, 2009) qui montrait que la faible réactivité cérébrovasculaire des patients drépanocytaires n'était pas associée aux indices d'hémolyse et au taux d'hématocrite. De plus, la différence d'hématocrite entre les patients drépanocytaires et les sujets sains doit être plus petite dans la microcirculation precapillaire (dont la mesure du Laser Doppler a été effectuée) que dans la macrocirculation périphérique d'où le sang a été prélevé, à cause de l'effet Fahreus (Fåhræus, 1929).

Dans le cas de la Drépanocytose il s'agit d'une anémie hémolytique. Ainsi l'hémolyse avec ses conséquences multiples, en particulier sur la biodisponibilité en NO, intervient en amont. Pour résumer l'anémie provoque de larges adaptations cardiovasculaires pour pouvoir compenser la diminution du taux d'hématocrite/d'hémoglobine, pourtant l'atteinte vasculaire dans la population drépanocytaire a probablement des causes multiples (Kato *et al*, 2009).

b) Rôle de la viscosité sanguine

C'est la viscosité sanguine, associée à la vitesse de cisaillement qui détermine l'ampleur de la contrainte de cisaillement (shear stress) contre la paroi vasculaire et qui, par la suite, active la régulation du diamètre vasculaire endothélium dépendante. L'augmentation du diamètre vasculaire permet de contrôler les résistances vasculaires périphériques en modulant la vitesse de cisaillement qui affectera en conséquence la viscosité sanguine puisque le sang est un fluide rhéofluidifiant (Gori & Forconi in (Baskurt & Hardeman, M. R., Rampling, 2007). La balance et l'interaction de la viscosité sanguine et du contrôle vasculaire caractérisent un bon fonctionnement du système cardiovasculaire. Alors que la viscosité sanguine (à hémocrite natif) des patients SS est inférieure à la normale, celle des patients SC est plus élevée, car l'anémie plus modérée ne permet pas de compenser les autres anomalies hémorhéologiques (Renoux *et al*, 2016).

Certaines études discutent l'impact des propriétés sanguines sur la mesure de la vitesse de l'onde de pouls. La propagation de l'onde de pouls dépend des résistances périphériques et ainsi des caractéristiques vasculaires et de la viscosité sanguine. Dans d'autres maladies cardiovasculaires ou métaboliques avec des incidences vasculaires comme par exemple dans le diabète de type 2, la VOP était associée à la viscosité sanguine à faible vitesse de cisaillement (Li *et al*, 2015). Ikenaga *et al* (Ikenaga *et al*, 2013) ont démontré *in vitro*, en utilisant des tubes viscoélastiques, qu'une augmentation de la viscosité sanguine pourrait probablement atténuer la propagation de l'onde de pouls. Kawamoto *et al* (Kawamoto *et al*, 2012) ont montré qu'un faible taux d'hémoglobine et une faible viscosité sanguine avaient des effets bénéfiques sur la vitesse de l'onde de pouls chez les femmes japonaises. Au contraire, selon Kim *et al* (Kim *et al*, 2013) et Parkhurst *et al* (Parkhurst *et al*, 2012), aucun des paramètres hémorhéologiques (déformabilité et agrégation érythrocytaires, viscosité sanguine) n'affecterait la vitesse de l'onde de pouls.

Nos résultats vont également dans ce sens. Il n'y avait aucune corrélation entre la VOP CR, la viscosité sanguine, l'hématocrite ou le taux d'hémoglobine. Dans cette cohorte la VOP carotido radiale ajustée selon l'hématocrite restaient plus élevée chez les patients SS comparés aux sujets sains ($P = 0.049$). De plus, les patients SC avaient une viscosité plus élevée pourtant la VOP n'était pas différente.

Pour ce qui est de la microcirculation, nous n'avons pas observé de relation entre la viscosité sanguine et la réactivité vasculaire. En revanche, nous avons montré que la viscosité sanguine était un déterminant majeur des CVO chez les enfants SS. Plus la viscosité sanguine était élevée, plus le taux de CVO était important ($P = 0.034$; $r_p = 0.407$). Ainsi, il apparaît qu'une viscosité sanguine augmentée chez les SS ne se traduit pas par une augmentation de la réactivité vasculaire pour compenser et réduire les résistances microvasculaires. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à certaines molécules d'intérêts dont leurs effets sont connus pour moduler la fonction vasculaire.

2. Rôle du métabolisme de monoxyde d'azote et du stress oxydant dans la détermination de la fonction vasculaire

Le stress oxydatif et nitrosatif et l'activité antioxydante étaient plus élevés chez les patients drépanocytaires comparés aux sujets sains et ils étaient plus marqués chez les patients SS que chez les patients SC (Figure 72).

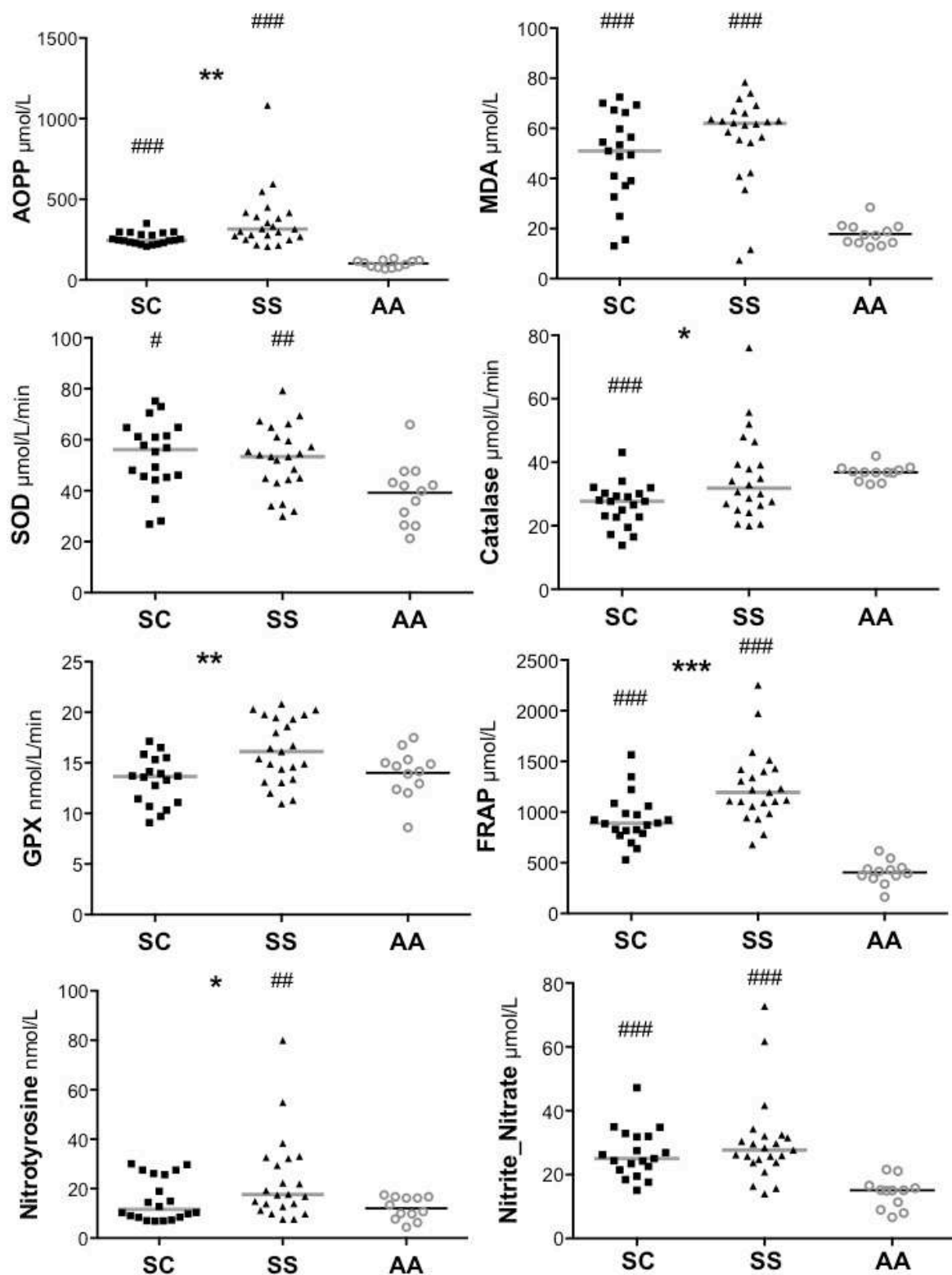


Figure 72. Comparaison du stress oxydant, de l'activité antioxydante et du métabolisme de monoxyde d'azote (marqueurs plasmatiques) chez les enfants avec l'hémoglobinopathie SS (n = 22) et SC (n = 17) et chez les enfants sains de génotype AA (n = 12).

Les données sont représentées en moyenne $\pm$ écart-type ou en médiane (Q1 ; Q3). AOPP, les produits avancés de l'oxydation des protéines ; MDA, le malondialdéhyde ; SOD, superoxide dismutase ; GPX, glutathione peroxidase ; FRAP, ferric reducing antioxidant power.

*P < 0.05 vs. SC; ** P < 0.01 vs. SC; *** P < 0.001 vs. SC;

P < 0.05 vs. AA; ## P < 0.01 vs. AA; ### P < 0.001 vs. AA.

L'activité enzymatique antioxydante a été largement étudiée chez les patients drépanocytaires (Adelekan *et al*, 1989; Chirico & Pialoux, 2012; Das & Nair, 1980; El-Ghamrawy *et al*, 2014; Goswami & Ray, 2011; Natta *et al*, 1990) mais il n'y a pas d'étude dans l'hémoglobinopathie SC. Selon nos résultats l'activité de la SOD était plus élevée que la normale chez les patients SS (P < 0.01) et SC (P < 0.05) (Figure 72). L'activité de la catalase était plus faible chez les SC comparés aux patients SS (P < 0.05) et aux enfants AA (P < 0.001) (Figure 72). L'activité de la GPX était plus marquée chez les patients SS (P < 0.01) que chez les enfants SC (Figure 72). Les patients SS avait un niveau de FRAP plus haut comparativement aux AA et SC (P = 0.001), alors qu'il était plus élevé chez les SC que chez les AA (P < 0.001) (Figure 72).

L'hémolyse chronique et la faible biodisponibilité en NO, des épisodes de reperfusion et d'ischémie, l'autooxydation de l'hémoglobine (Aslan *et al*, 2000; Chirico & Pialoux, 2012) sont les déterminants principaux d'une haute production des espèces réactives de l'oxygène (EOR) chez les patients SS. Ceci se traduit par une augmentation de l'activité antioxydante pour compenser le stress oxydant et pour limiter ses effets néfastes. Bien que l'activité enzymatique se retrouve sursollicitée (Aslan & Freeman, 2002), la défense antioxydante enzymatique n'est pas suffisante pour compenser le stress oxydant trop élevé (Chirico & Pialoux, 2012) conduisant aux dommages tissulaires. Ainsi, les taux de MDA et AOPP étaient élevés chez les patients SC et SS comparés aux enfants AA (Figure 72). Le taux de MDA était similaire entre les deux groupes drépanocytaires cependant le taux d'AOPP était plus élevé chez les patients SS (P < 0.01) que chez les patients SC (Figure 72). Plusieurs études

ont également rapporté une augmentation de l'oxydation des protéines plasmatiques chez les patients drépanocytaires SS au repos (Manfredini *et al*, 2008; Oztas *et al*, 2012). Chez les enfants SS l'indice hémolytique semblait être associé avec le taux plasmatique d'AOPP ($P = 0.065$, $r_s = 0.391$). De plus, seulement chez les patients SS, la concentration plasmatique en bilirubine totale était corrélée positivement à l'AOPP ($P < 0.01$, $r_s = 0.54$) et également à la puissance antioxydante totale (FRAP ; $P = 0.001$, $r_s = 0.663$). Enfin, le l'hématocrite était associé négativement au stress oxydant (AOPP ; $P = 0.001$, $r_s = -0.628$) et nitrosatif (nitrotyrosine ; $P = 0.046$, $r_s = -0.429$).

Ceci souligne des interactions possibles entre l'hémolyse chronique, l'anémie et le stress oxydant dans le sens où l'hémolyse favoriserait et renforcerait le stress oxydant.

La concentration en NOx était similaire entre SS et SC. Cependant elle était plus élevée dans les deux groupes drépanocytaires comparés aux enfants AA ($P < 0.001$).

Le taux en nitrotyrosine plasmatique était plus élevé chez les patients SS comparativement aux patients SC ($P < 0.05$) et AA ($P < 0.01$). Le flux sanguin oscillatoire nécessaire pour compenser l'anémie et les résistances hémorheologiques (Rodgers *et al*, 1984b) conduit (un peu moins chez les SC que chez les SS) constamment à un état d'activation vasculaire et à une stimulation de la synthèse en NO. Ceci expliquerait le taux élevé des métabolites secondaires du NO. Nitrite peut être dans certaines conditions comme par exemple l'hypoxie, reconvertis en NO (Lundberg & Weitzberg, 2005; Mack *et al*, 2008). Chez les patients SS le taux augmenté en nitrotyrosine montre que la NO synthase est sursollicitée (Belhassen *et al*, 2001; Kaul *et al*, 2008) et que le NO produit en surplus réagit avec les EROs et est probablement rapidement converti en peroxynitrite. Le peroxynitrite peut avoir des effets délétères sur la fonction vasculaire (Szabo *et al*, 2007).

Chez les patients SS la nitrotyrosine était corrélée au taux d'hémoglobine ($P < 0.05$, $r_s = -0.48$) et à l'hématocrite ($P < 0.05$, $r_s = -0.43$). Dans ce groupe, nous avons également observé une association négative entre la réponse vasculaire NO dépendante et le taux de nitrotyrosine

plasmatique ($P < 0.05$, $r_s = -0.62$), le NOx ($P < 0.05$, $r_s = -0.56$) et la concentration en AOPP ($P < 0.05$, $r_s = -0.45$) (Tableau 10). L'activité de la GPX était corrélée à la VOP carotido radiale ($P = 0.039$, $r_p = 0.519$).

Tableau 10 Significativité des corrélations entre les paramètres microvasculaires et le stress oxydant et le métabolisme de NO chez les patients SC (n = 17) et SS (n = 22)

P de Pearson ou Rho de Spearman	Flux sanguin basal (CVC, mV/ mmHg)		Réponse NO-dépendante (Plateau) (%)	
	SC	SS	SC	SS
Nitrotyrosine (nmol/L)	0.729	0.121	0.708	0.009 $r = -0.615$
Nitrite_Nitrate ($\mu\text{mol/L}$)	0.478	0.319	0.617	0.015 $r = -0.564$
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	0.462	0.240	0.374	0.064 $r = -0.445$
FRAP ($\mu\text{mol/L}$)	0.305	0.960	0.599	0.194
GPX (nmol/L/min)	0.279	0.434	0.192	0.388

AOPP, les produits avancés de l'oxydation des protéines ; MDA, le malondialdéhyde ; GPX, glutathione peroxidase ; FRAP, ferric reducing antioxidant power.

Ces liens étaient absents chez les patients SC et dans le groupe contrôle. Plusieurs études précédentes ont démontré que l'hémolyse chronique et le stress oxydatif joueraient un rôle primordial dans le développement d'une vasculopathie chronique chez les patients SS (Chirico & Pialoux, 2012; Kato *et al*, 2007, 2006b; Morris *et al*, 2005b; Nur *et al*, 2011; Reiter *et al*, 2002). Nos résultats confirment ces études. Ainsi il semble que le stress oxydant et l'hémolyse sont probablement des facteurs primordiaux de la diminution importante du

vasorégulateur NO et du cycle vicieux du développement de la dysfonction vasculaire chez les patients SS.

L'implication du stress oxydatif dans la physiopathologie et son influence dans la détermination de la fonction vasculaire chez les patients SC n'est pas connue. Nos résultats ont montré que les patients SC avaient aussi une activité antioxydante plus élevée que la normale (à l'exception de la GPX et de la Catalase) (Figure 72) et que l'AOPP était associée à l'activité de la Catalase ($P < 0.001$, $r_s = 0.775$) et de la FRAP ($P = 0.05$, $r_s = 0.406$).

L'hémolyse, le stress oxydant et nitrosatif étaient plus faible chez les SC, comparés aux patients SS. De plus, il apparaît que la défense antioxydante est plus active et fonctionnelle chez les SC que chez les SS. En outre, la source supplémentaire de NO augmenterait la biodisponibilité en NO, et ainsi la réserve vasomotrice. Au final, les SC avaient également un stress oxydant élevé et une fonction vasculaire altérée mais dans une moindre mesure que les patients SS, de sorte que le fonctionnement vasculaire n'est pas altéré.

3. Evaluation de la balance vasomotrice – Rôle d'Endothéline-1

Le puissant vasodilateur NO et le vasoconstricteur ET-1 sont des antagonistes de la régulation vasculaire (Baskurt *et al*, 2004a). La concentration en ET-1 plasmatique a été comparée entre les deux groupes drépanocytaires (Figure 73). Elle tendait à être plus élevée chez les patients SS comparés aux patients SC ($P = 0.056$). Cependant le niveau d'ET-1 circulant n'était pas corrélé à la fonction micro ou macrovasculaire ni aux paramètres du stress oxydatif, ni au profil sanguin ou à la sévérité clinique dans les deux groupes.

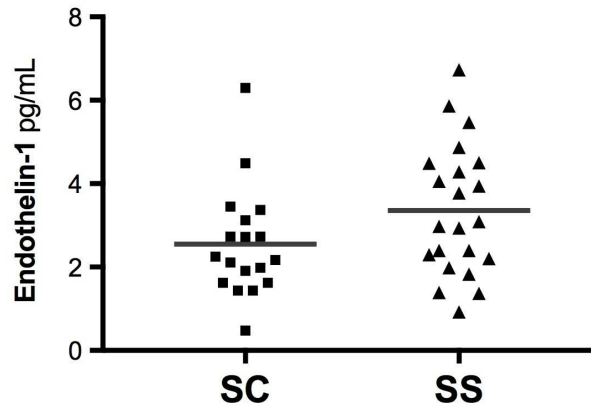


Figure 73. Concentration en ET-1 plasmatique chez les patients drépanocytaires homozygotes SS (n = 22) et chez les patients SC (n = 17)

Les cycles répétés de falciformation et d'hypoxie, les douleurs chroniques et le manque en NO sont connus pour augmenter l'activité sympathique du système nerveux autonome et la synthèse en ET-1 (Lapoumeroulie *et al*, 2005; Steinberg *et al*, 2009). D'autres études ont démontré que chez les patients adultes SS, le taux d'ET-1 est légèrement plus élevé au repos à l'état base et augmenterait encore plus lors d'une crise vasocclusive. Rybicki & Benjamin (Rybicki & Benjamin, 1998) ont observé chez des patients SS un taux d'ET-1 plasmatique au repos à l'état de base en moyenne de 18.79 pg/mL (n = 24) et pendant la crise de 26.16 pg/mL (n = 13), comparé au niveau d'ET-1 de sujets sains de 0.58 pg/mL. D'autres ont remarqué un taux plus élevé pendant la crise (130.9 ± 23.1 pg/mL) et pendant la récupération chez des adultes SS avec un taux de repos de 23.69 ± 9.52 pg/mL comparé à celui des contrôles (0.54 ± 0.51 pg/mL) (Graido-Gonzalez *et al*, 1998).

Une concentration en ET-1 plus élevée au repos associée au manque de NO est donc susceptible de créer un déséquilibre du contrôle vasomoteur via la vasoconstriction et peut favoriser la perte de la réactivité vasculaire.

4. L'implication de l'activité du système nerveux autonome

Tableau 11. La variabilité de la fréquence cardiaque

	AA (n = 16)	SC (n = 22)	SS (n = 24)
RRI (ms)	787 ± 120 670 ± 75	802 ± 121 638 ± 70	732 ± 116 621 ± 68
P_{tot} (ms ²)	2917 (1384 ; 3718) 2590 (2000 ; 3010)	4694 (1258 ; 9009) 2024 (1432 ; 3919)	1014 (548 ; 2486) ^{***##} 1289(498 ; 1968) ^{*** ##}
LF (ms ²)	864 (325 ; 1249) 1019 (611 ; 1279)	866 (363 ; 2459) 833 (536 ; 1454)	266 (114 ; 661) ^{**##} 411 (207 ; 537) ^{*** ###}
HF (ms ²)	964 (412 ; 1381) 264 (124 ; 494)	2720 (746 ; 5340) [*] 380.5 (173 ; 840)	498 (99 ; 1372) ^{##} 170 (69 ; 476) [#]
HF (nu)	53 ± 11 23 ± 10	68 ± 17 [*] 33 ± 19	60 ± 20 38 ± 20 [*]
LF/HF	0.90 (0.81 ; 1.30) 3.91 (1.94 ; 6.89)	0.49 (0.20 ; 2.50) ^{**} 2.55 (1.16 ; 3.65) [*]	0.50 (0.33 ; 1.37) 2.21 (0.98 ; 4.53) [*]
SDNN (ms)	59 ± 23 60 ± 14	78 ± 33 57 ± 15	48 ± 36 ^{##} 43 ± 21 ^{*#}
PNN50 (%)	29 ± 19 7.3 (2.7 ; 14.2)	43 ± 24 7.1 (3.65 ; 14.75)	24 ± 26 [#] 2.05 (0.95 ; 6.73) [#]
RMSSD (ms)	55 ± 27 28 (20.8 ; 37.7)	86 ± 51 29.2 (22.6 ; 49.2)	54 ± 53 21.0 (14.0 ; 28.0) [#]

RRI, intervalle RR ; Ptot, spectre de puissance totale ; LF, basses fréquences ; HF, hautes fréquences ; SDNN, écart Type de la durée d'une suite d'intervalles RR ; PNN50, pourcentage d'intervalles RR différent de plus de 50 ms du précédent ; RMSSD, la racine carrée de la moyenne de la somme des différences au carré des intervalles RR successifs.

Caractérisation de la variabilité de la fréquence cardiaque (VFC) en position allongée et en position debout (*en gris*) par les indices (*définis en matériels & méthodes*) de l'activité parasympathique (RMSSD et HF), de l'activité autonome globale (SDNN, Ptot), de l'activité sympathique et parasympathique (LF) et de la balance sympatho-vagale (LF/HF).

Ces indices ont été obtenus après analyse fréquentielle de la VFC. Les valeurs sont représentées en moyenne ± écart-type ou médiane (25° ; 75°).

*P < 0.05 vs. AA; ** P < 0.01 vs. AA; *** P < 0.001 vs. AA;

P < 0.05 vs. SC; ## P < 0.01 vs. SC; ### P < 0.001 vs. SC.

Toutes les valeurs obtenues debout étaient différentes des valeurs en position allongée pour chaque groupe (non représenté).

Plusieurs études ont démontré une altération du système nerveux autonome (Inamo *et al*, 2009; Nebor *et al*, 2011) avec une prédominance de l'activité sympathique (Inamo *et al*, 2009; Pearson *et al*, 2005; Mestre *et al*, 1997) chez les patients drépanocytaires homozygotes. Nos résultats (Tableau 11) confirment ceux de ces études. L'activité globale du système nerveux autonome (représentée par Ptot et SDNN, Figure 74) était plus faible chez les patients SS. Ceci semble être dû principalement à une moindre activité parasympathique (selon les indices PNN50, RMSSD, HF, HF nu et les résultats de Nebor *et al* (Nebor *et al*, 2011) et Van Beers (van Beers *et al*, 2009). L'activité parasympathique diminuait encore plus en position debout (Tableau 11). L'hypoxie est un régulateur majeur de l'activité du SNA. Il a été proposé, mais non vérifié, que le degré d'hypoxie cérébrale pourrait déterminer le niveau d'activité du SNA chez le patient drépanocytaire (Connes, 2011). Ainsi, il est possible que les patients drépanocytaires ayant la saturation en oxygène dans la microcirculation cérébrale la plus faible soient ceux qui ont également les plus fortes altérations de l'activité du SNA et qui connaissent le plus de crises vaso-occlusives. Des périodes répétitives d'hypoxie induisent probablement un déséquilibre nerveux avec une altération parasympathique très marquée (Sangkatumvong *et al*, 2008; Setty *et al*, 2003). Une grande partie des patients drépanocytaires présentent des périodes d'hypoxie pendant le sommeil (Hargrave *et al*, 2003) avec une diminution de la saturation en oxygène en dessous de 93%. L'hypoxie nocturne répétée associée au syndrome d'apnée de sommeil obstructif renforce l'activité sympathique en dépit de l'activité parasympathique (Pepin & Levy, 2002). La dysrégulation neuronale se traduit par un déséquilibre sympatho-vagal chez les patients SS qui pourtant était non significatif au repos en position allongée (Figure 74) mais la différence devenait significative

en position debout (Tableau 11). Une altération du SNA et de sa réactivité pourrait probablement affecter la régulation vasculaire (Pearson *et al*, 2005). Ainsi, la domination de l'activité sympathique chez les patients SS pourrait favoriser la vasoconstriction, mais dans cette cohorte nous n'avons pas constaté de relation entre les indices du SNA et les paramètres micro et macrovasculaires ($P > 0.05$). Par ailleurs, la relation apnées du sommeil et activité du SNA n'a jamais été étudié dans la Drépanocytose et on ignore si les patients qui désaturent le plus pendant la nuit sont ceux qui ont le déséquilibre sympatho-vagal le plus prononcé.

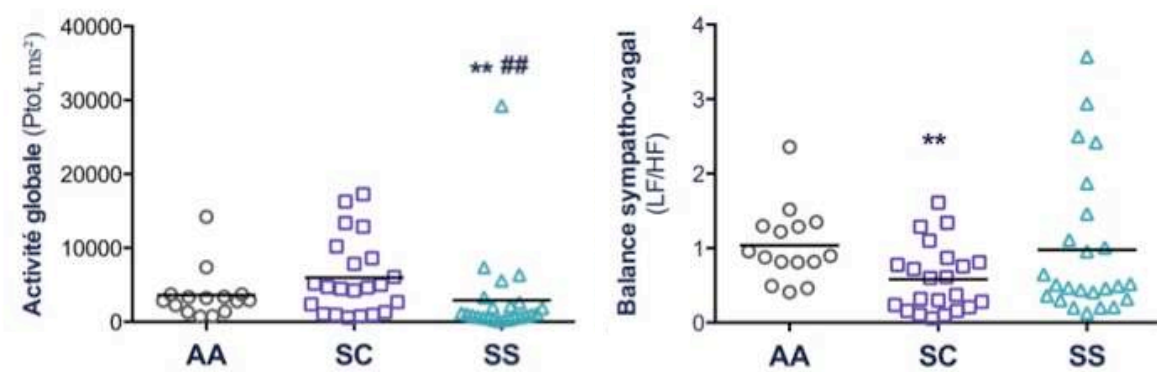


Figure 74. L'activité du SNA chez les patients drépanocytaires SS et SC comparés aux sujets sains (AA)

divisée en activité globale du SNA (à gauche) et de la balance sympatho-vagale (à droite).

* $P < 0.05$ vs. AA; ** $P < 0.01$ vs. AA; *** $P < 0.001$ vs. AA;

$P < 0.05$ vs. SC; ## $P < 0.01$ vs. SC; ### $P < 0.001$ vs. SC.

L'activité globale du SNA n'était pas différente entre les patients SC et les témoins (Figure 74) malgré une activité parasympathique (Hf, HFnu, Tableau 11) plus élevée chez les patients SC que la normale. L'activité du SNA n'était pas liée à la fonction vasculaire. Cependant on peut supposer qu'une activité parasympathique accrue pourrait favoriser la vasodilatation éventuellement pour compenser l'hyperviscosité. En général, l'activité du SNA apparaît moins altérée chez les patients SC que chez les patients SS. Peu d'études ont comparé l'activité du SNA entre ces deux groupes drépanocytaires. Il serait possible que les altérations

vasculaires cérébrales, très fréquentes chez les patients SS (Connes *et al*, 2013b) n'affectent pas seulement le système nerveux central mais également le système nerveux périphérique (Koshy *et al*, 1990). La dysfonction du SNA serait potentiellement impliquée dans la détermination de la fréquence des crises vasoocclusives douloureuses (Nebor *et al*, 2011). Il a été suggéré que le niveau d'activité du SNA pourrait refléter un certain degré de sévérité clinique des patients drépanocytaires (Pearson *et al*, 2005; Mestre *et al*, 1997). D'ailleurs, Charlot *et al* (Charlot *et al*, 2017b) ont montré que la durée d'hospitalisation lors d'une CVO était associée à l'activité sympatho-vagale. Dans notre étude la sévérité clinique n'était pas associée à l'activité globale du SNA ou à la balance sympatho-vagale.

Cependant nos résultats démontraient une altération de l'activité du SNA chez les enfants SS de plus de 15 ans mais pas chez les enfants SS plus jeunes, suggérant un risque sympatho-vasoconstricteur croissant avec l'âge, pouvant participer à une altération de la vasoréactivité croissante dans cette maladie (Charlot *et al*, 2015) (déséquilibre sympatho-vagal (LF/HF ; 1.15, 0.16 et 1.39 pour les enfants AA, SS moins de 15 ans et SS plus de 15 ans, respectivement) plus marqué et activité parasympathique plus faible (HF (ms²) ; 1341.7, 1697.1 et 408.7 pour les enfants AA, SS moins de 15 ans et SS plus de 15 ans, respectivement)).

5. Le rôle de l'oxygénation tissulaire

Les taux d'oxygénation cérébrale et musculaire, mesurées par la spectroscopie du proche infrarouge étaient plus faibles chez les patients drépanocytaires comparés aux contrôles. Elles étaient encore plus faibles chez les patients SS que chez les patients SC (Figure 75). Ceci confirme des études précédentes (Quinn & Dowling, 2012; Waltz *et al*, 2012c, 2012a).

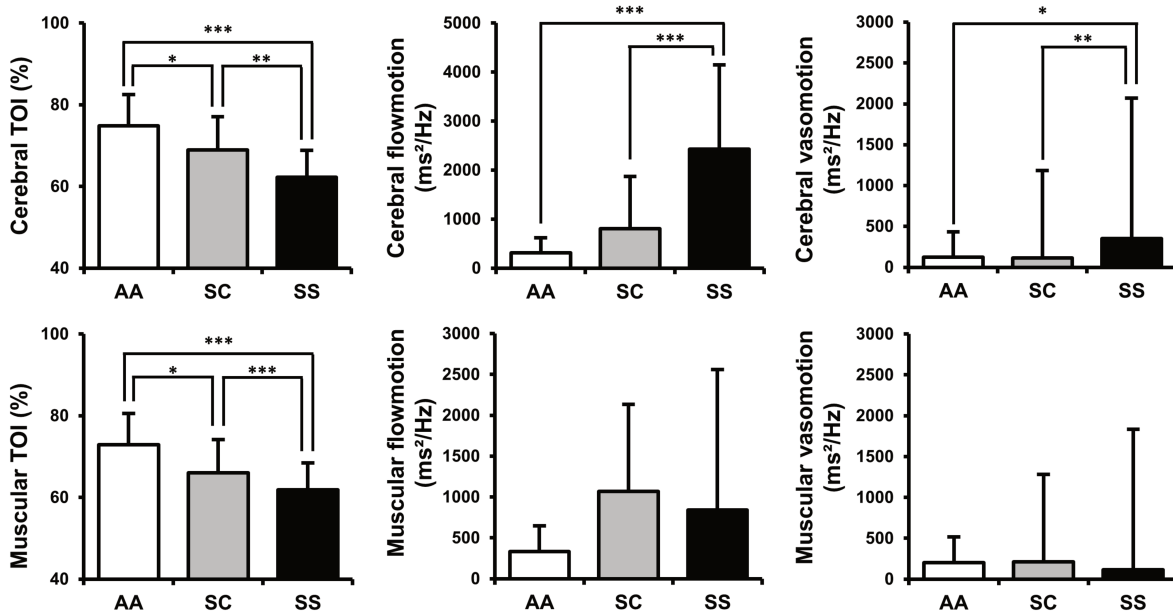


Figure 75. Comparaison de l'oxygénation, de la vasomotion et du flowmotion cérébral (*en haut*) et musculaire (*en bas*) entre les trois groupes AA, SC et SS en position allongée.

Les données ont été analysées et schématisées par mon collègue (Charlot *et al*, 2017a).

La totalité du spectre d'analyse représente le flowmotion (intervalles I-V). Le vasomotion comprend l'addition des intervalles I-III. En position debout on obtenait pour le TOI cérébrale : $69.3 \pm 8.0 \%$ vs $61.7 \pm 5.4 \%$ ** vs $58.7 \pm 5.8 \%$ *** pour AA, SC et SS respectivement et pour le TOI musculaire : $63.1 \pm 5.7\%$ vs 58.6 ± 7.8 vs 56.1 ± 6.3 ** pour AA, SC et SS respectivement.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

L'hématocrite ($r_p = 0.55$, $P = 0.008$), la saturation artérielle en oxygène (SpO_2 , $r_p = 0.65$, $P = 0.01$) et la déformabilité érythrocytaire ($r_p = 0.42$, $P = 0.018$) étaient positivement associés au $TOI_{cérébral}$ chez les patients SS alors que la lactate déshydrogénase ($r_p = -0.52$, $P = 0.017$) l'était négativement dans ce même groupe. Seul l'hématocrite était corrélé positivement au $TOI_{musculaire}$ ($r_p = 0.39$, $P = 0.050$) chez les patients SS. Le faible taux d'hémoglobine et l'altération de la déformabilité (Parthasarathi & Lipowsky, 1999; Waltz *et al*, 2012c) réduisent fortement le TOI cérébral et musculaire chez les patients drépanocytaires, particulièrement chez les patients SS (Waltz *et al*, 2012c; Quinn & Dowling, 2012). L'anémie

(Cahill *et al*, 2017) et l'hémolyse sont connues pour affecter également l'oxygénation tissulaire (Raj *et al*, 2004).

Chez les patients SS le $\text{TOI}_{\text{musculaire}}$ en position allongée était corrélé négativement à la capacité vasculaire NO dépendante ($P = 0.003$, $r_s = 0.618$) et à la fonction macrovasculaire (VOP CR, $P = 0.007$, $r_p = -0.624$). Le $\text{TOI}_{\text{musculaire}}$ en position debout est également corrélé à la fonction microvasculaire NO-dépendante ($P = 0.032$, $r_s = 0.481$).

L'activité tissulaire et ainsi la demande en oxygène tissulaire sont liées à la production des métabolites vasorelaxants pour faciliter l'apport en oxygène vers les tissus actifs.

En hypoxie, l'adénosine diphosphate n'est pas rephosphorylée complètement et une partie est dégradée sous forme d'adénosine monophosphate et ensuite en adénosine, un vasorelaxant (Kurtz, 1987). De plus les ions hydrogène et le lactate provenant de la glycolyse ont également des propriétés vasorelaxantes (Montoya *et al*, 2011; Pittman, 2011). La phosphorylation oxydative conduit aussi à la formation des ions hydrogènes vasorelaxants. Une augmentation de ces vasorelaxants permet une vasorelaxation des muscles lisses des artérioles voisines, augmentant le flux sanguin et l'échange en oxygène dans les tissus. L'activité vasculaire cérébrale est plus élevée chez les patients SS que chez les patients SC et les sujets AA (Figure 75), ce qui correspond aux résultats des études précédentes (Waltz *et al*, 2012). Les oscillations spontanées du tonus vasculaire, plus importante chez les patients SS (Figure 75) ont été identifiées comme mécanisme de compensation de l'hypoxie cérébrale (Kislukhin, 2010; Bertuglia *et al*, 1991) nécessaire pour maintenir un bon fonctionnement des centres régulateurs cérébraux (Waltz *et al*, 2012c). Le flowmotion et vasomotion musculaire n'étaient pas différents entre les trois groupes (Figure 76). Il apparaît qu'à la place des oscillations, c'est la vasodilatation périphérique chronique qui maintient le flux.

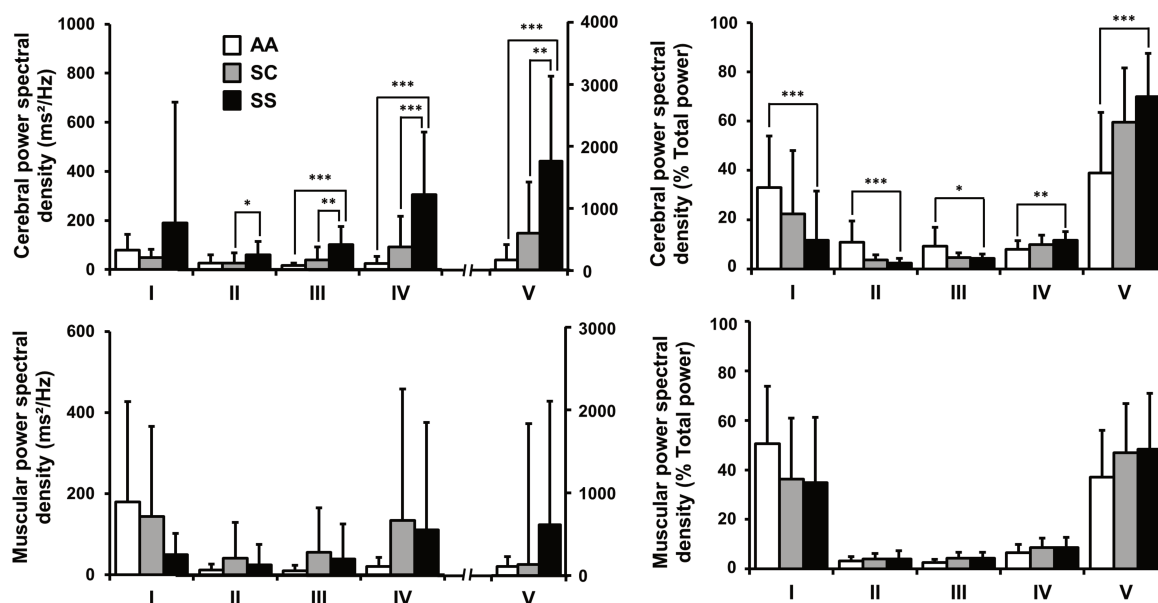


Figure 76. Répartition des cinq bandes de fréquences

du signal cérébrale (*en haut*) et musculaire (*en bas*) en valeur absolue (*à gauche*) et relative (normalisée par la densité spectrale totale, *à droite*). L'analyse spectrale cérébrale en valeur absolue du intervalle II était plus élevée chez les patients SS comparés aux patients SC ($P = 0.019$). La densité spectrale cérébrale absolue pour les intervalles III à V chez les SS était plus élevée que la normale ($P < 0.001$) et que chez les patients SC ($P = 0.002$). La densité cérébrale pour les intervalles I à III (en valeur relative) était plus faible chez les SS que la normale ($P < 0.05$) et pour les intervalles IV à V plus élevée ($P < 0.01$). Ainsi les patients SS présentaient une augmentation de l'activité respiratoire et cardiaque et une altération de la régulation nerveuse myogénique et endothéliale.

Les données ont été analysées et schématisées par mon collègue (Charlot *et al*, 2017a).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

L'oxygénation tissulaire a été peu étudiée chez les patients SC particulièrement en ce qui concerne les enfants. Le $TOI_{\text{musculaire}}$ en position allongée et le $TOI_{\text{cérébral}}$ en position debout étaient plus faibles chez les patients SC comparés aux patients AA (Figure 75). Il semble que les patients SC aient un TOI intermédiaire par rapport aux AA et SS. Le flowmotion et vasomotion cérébrale et musculaire ne se distinguent pas entre le groupe SC et AA (Figure 76). De plus, il n'y avait pas d'association entre l'oxygénation tissulaire et les paramètres de la fonction vasculaire. On suppose qu'une fonction vasculaire maintenue soit essentielle pour

compenser la viscosité sanguine et permette également de maintenir une oxygénation tissulaire adéquate.

En conclusion la dysfonction vasculaire semble affecter l'oxygénation tissulaire chez les patients SS tandis que les patients SC avaient une oxygénation tissulaire peu altérée.

6. Le rôle de l'activité physique et de l'aptitude physique

La dépense énergétique journalienne, en terme de temps consacré pour les activités physiques d'intensité modérée et intense (PAEE, en MET_{min}) était plus faible chez les enfants drépanocytaires SS et SC comparés aux contrôles ($P = 0.02$, Figure 77).

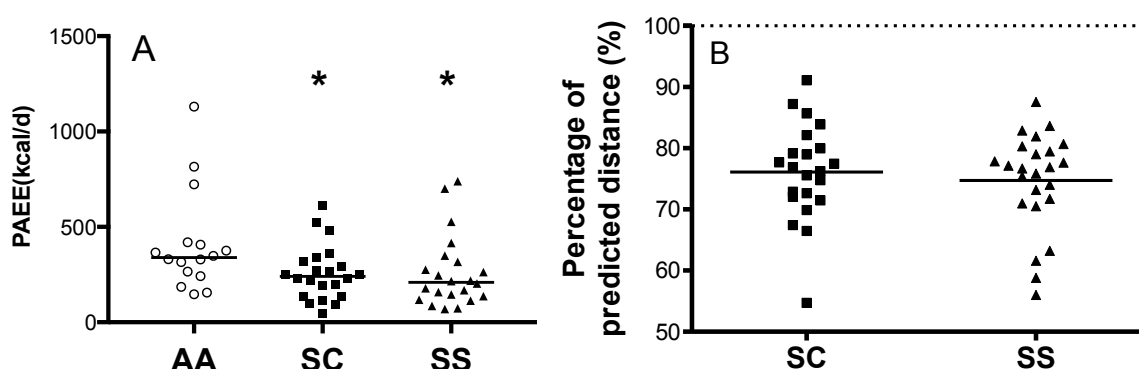


Figure 77. Comparaison du niveau d'activité physique et l'aptitude physique entre les enfants AA, SC et SS

Comparaison (A) de la dépense énergétique journalière pour les activités physiques d'intensité modérée et intense (en MET_{min}) entre les sujets sains (AA) les patients SC et le patients SS à l'aide d'une Anova de Kruskal Wallis suivie par le test de Mann-Whitney, $*P > 0.05$ et (B) de la distance parcourue des patients SS et SC pendant le test de marche de 6 minutes (rapportée à la distance de référence) à l'aide d'un test de student.

Les patients drépanocytaires, particulièrement les patients SS ont un turnover protéique augmenté nécessaire pour produire des globules rouges afin de compenser l'anémie hémolytique (Buchowski *et al*, 2002a, 2001). Le système cardiovasculaire est sursollicité avec un débit cardiaque élevé (Novelli *et al*, 2014) pour compenser l'hémolyse, les altérations hémorhéologiques et l'hypoxémie. Par conséquent, la dépense énergétique au repos est plus élevée chez les SS (Barden *et al*, 2000; Borel *et al*, 1998). Malgré ce déséquilibre énergétique, la dépense énergétique totale n'était pas différente entre les trois groupes, comme précédemment décrit (Buchowski *et al*, 2002b; Barden *et al*, 2000). Pour maintenir la dépense énergétique totale journalière au même niveau que les sujets sains, leur PAEE devrait être forcément plus faible (Buchowski *et al*, 2002b). Buchowski *et al* (Buchowski *et al*, 2002b), ont démontré que le temps par jour consacré pour les activités d'intensité faible n'était pas différente entre les patients drépanocytaires et les contrôles, mais au contraire le temps consacré aux PAEE est d'environ trois fois plus élevé chez les sujets sains. En effet, le REE élevé avec le système cardiorespiratoire, vasculaire et métabolique sur-sollicités et moins adaptables rendent les activités physiques difficiles pour les enfants (Connes *et al*, 2011; Waltz & Connes, 2014) et ils souffrent souvent d'une fatigue précoce à l'effort (Alpert *et al*, 1984; Braden *et al*, 1996; Callahan *et al*, 2002; Delclaux *et al*, 2005; Buchowski *et al*, 2002b). Alpert *et al* (Alpert *et al*, 1984) ont démontré que le taux d'hémoglobine est un déterminant important de la performance et de la capacité physique chez les enfants. Asthme, vertige, hypoxie et l'anémie sont des complications cliniques fréquents chez les patients de cette cohorte. Les maladies pulmonaires chroniques limitent la capacité à l'effort (Callahan *et al*, 2002; Delclaux *et al*, 2005; Pianosi *et al*, 2009). Delclaux *et al* (Delclaux *et al*, 2005) ont étudié le rôle de la dyspnée sur la performance lors d'un test de marche chez les patients SCD. Dans notre cohorte, 41% des patients drépanocytaires SS et SC présentaient un niveau de dyspnée de modéré à intense (≥ 3 sur l'échelle) après l'exercice. 10 min après l'effort ils récupéraient généralement (niveau de dyspnée de repos). La plupart des enfants avaient au

repos une échelle de dyspnée de 0 et 1 (absence de dyspnée ou très faible). Néanmoins il y avait des exceptions comme par exemple un enfant SS qui se retrouvait déjà au repos à un score de 5.

C'est l'enfant qui estimait son niveau de dyspnée. Il est possible que le fait d'être malade et de souffrir d'une fatigue chronique et d'être régulièrement confronté à des douleurs affecte l'évaluation du niveau de la dyspnée particulièrement après l'effort.

Enfin, la peur des parents est également un frein vis à vis de la pratique sportive chez l'enfant drépanocytaire (Pruneau *et al*, 2008). Il faut également prendre en compte que la plupart des patients suit une surveillance médicale stricte et ne dispose pas du même temps libre pour les loisirs que les sujets sains.

Selon nos résultats, 78% des patients (SS : 79%, et SC : 77%) avaient une performance anormale lors du test de marche (Figure 77B). L'anémie chronique (Borel *et al*, 1998), les altérations hémo-rhéologiques (Buchowski *et al*, 2002b), la dysfonction pulmonaire (Connes *et al*, 2011), l'hypoxémie artérielle (Callahan *et al*, 2002), l'hémolyse chronique et la dysfonction vasculaire (Connes *et al*, 2011) limitent la réponse à l'exercice. La faible aptitude physique est probablement plutôt la conséquence d'une pratique physique de faible intensité irrégulière. Il en résulte un faible développement des muscles squelettiques (bras, jambes, dos...). La performance dépend du flux sanguin musculaire qui lui apporte l'oxygène. Chez les patients SS, les altérations micro-et macrovasculaires étaient corrélées à l'oxygénation musculaire qui, en conséquence, déterminent indirectement la performance, croissance et capacité musculaire.

La capacité physique à réaliser un effort n'a pas été très étudiée chez les patients SC. En analysant la distance parcourue, en valeur absolue, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes, SS et SC. En général la réponse à l'exercice était similaire entre les deux groupes drépanocytaires (Figure 77) tout en sachant que les déterminants de cette faible performance sont certainement différents. Le SpO₂, mesuré avant, directement après et 10 min

après le test de marche était plus faible chez les patients SS comparés aux patients SC, dans chacune des trois conditions ($P < 0.001$). L'hémolyse est probablement un facteur plus impliqué dans la détermination de la réponse à l'effort chez les patients SS que chez les patients SC.

De nombreux travaux (Green *et al*, 2004; Thijssen *et al*, 2010; Clarkson *et al*, 1999; Tinken *et al*, 2010; Babbitt *et al*, 2013; Sinoway *et al*, 1986, 1987; Sinoway *et al*, 1986; Florescu *et al*, 2010; Walther *et al*, 2008; Tinken *et al*, 2008) ont démontré les effets bénéfiques de l'activité physique sur la fonction endothéliale dans différentes populations. Cette étude était la première à évaluer le lien de la fonction vasculaire et du niveau d'activité physique chez les jeunes patients drépanocytaires. Cependant, dans les deux groupes drépanocytaires ni les paramètres macrovasculaires ni microvasculaires ne sont corrélés aux paramètres d'activité physique (l'aptitude physique ou le niveau d'activité physique). Quelques travaux (McAllister & Laughlin, 2006b; Kingwell *et al*, 1997) précisent qu'un exercice aigu stimule la eNOS et améliore la production de NO, en raison des contraintes de cisaillement appliquées périodiquement à la paroi endothéliale. Récemment il a été montré chez les souris transgéniques drépanocytaires (souris Townes) qu'une activité physique régulière permet de diminuer le stress oxydant et d'améliorer la fonction endothéliale (Charrin *et al*, 2014). Cependant, si la sollicitation physiologique n'est pas suffisamment régulière (Hallmark *et al*, 2014), cette amélioration serait de courte durée et s'affaiblirait peu à peu (McAllister *et al*, 1996; Kingwell, 1997; Johnson & Laughlin, 2000). Ainsi chez les SS et SC, dont l'activité physique était très irrégulière et souvent de courte durée, il est probable que les effets bénéfiques n'aient pas persisté ou que l'activité physique n'ait pas été de durée et d'intensité suffisantes pour induire une réponse adaptative bénéfique au niveau de la fonction endothéliale (Kingwell *et al*, 1997; Maiorana *et al*, 2001; Green *et al*, 1994; Franke, 1998; Goto *et al*, 2003). Ainsi, il semble que les adaptations bénéfiques à l'exercice sont dépendantes de la durée, de l'intensité et de la forme de l'exercice (Green *et al*, 2004). Ces

paramètres varient en fonction de la pathologie. Une amélioration de la fonction vasculaire a été notée par exemple chez les enfants obèses après un exercice régulier pratiqué trois fois par semaine pendant deux mois (Watts *et al*, 2004). Les recommandations d'activité physique pour les patients drépanocytaires sont très imprécises (Martin *et al*, 2015) et la diversité des complications cliniques dans la drépanocytose et la variabilité de la réponse à l'exercice, rendent la mise en place d'un programme de réentraînement difficile.

Une question majeure concerne la détermination de la quantité d'activité physique minimale nécessaire pour d'obtenir un bénéfice en terme de santé. Ceci dépendra de l'état de santé de départ mais également du niveau d'activité physique du départ. Chez les personnes sédentaires, le gain en terme de bénéfices pour la santé est obtenu plus rapidement avec un niveau d'activité physique modéré que chez les personnes régulièrement actives (Bouchard, 2001). Toutefois, une activité physique aigue trop intense chez les sujets inactifs souffrant d'une vasculopathie renforcerait l'altération de la fonction endothéliale (Baskurt & Meiselman, 2010).

7. Le rôle de l'hydroxycarbamide (hydroxyuree, HU)

Depuis plusieurs années, les patients exposés à des évènements vaso-occlusifs fréquents sont traités à l'HU. Pour cette étude la raison principale pour la mise sous HU était un taux élevé de CVO ($\geq$ de 3 par an) et/ ou des STA répétés (au moins 2).

Quelques études (Charache *et al*, 1995) ont démontré les effets bénéfiques de cette molécule au niveau clinique, mais aussi hémorhéologique (amélioration de la déformabilité érythrocytaire et diminution de la force des agrégats érythrocytaires ; (Lemonne *et al*, 2017)). Récemment, un suivi thérapeutique par notre équipe sur une durée de deux ans de 28 patients adultes drépanocytaires SS dont la justification clinique a conduit à une mise sous hydroxyurée a démontré que ce traitement réduisait significativement la fréquence des

épisodes douloureux, des syndromes thoraciques aigus et des besoins en transfusion sanguine. Il a des effets bénéfiques sur les paramètres hématologiques (Lemonne *et al*, 2017) notamment en relation avec la synthèse d'HbF, l'augmentation du taux d'hémoglobine et l'amélioration de la déformabilité érythrocytaire (Lemonne *et al*, 2015, 2017). L'hydroxyurée est également connu pour diminuer le stress oxydant (Dasgupta *et al*, 2006; Silva *et al*, 2011; Torres *et al*, 2012) et d'améliorer la production locale de NO (King, 2004; Gladwin *et al*, 2002). Par conséquent, il sera intéressant d'évaluer les effets probablement bénéfiques sur la fonction vasculaire. Cependant seulement 5 patients, tous de génotype SS (*SS HU+*) suivaient un traitement le jour d'inclusion depuis plus de six mois (dose ~20 mg/kg/jour). Evidemment, une cohorte plus importante sera nécessaire pour comprendre les effets de l'HU. Néanmoins quelques analyses statistiques ont été effectuées (Tableau 12) en comparant les patients SS sous traitement HU (*HU+*) et les patients SS sans HU (*HU-*).

Tableau 12. Comparaison des paramètres de la fonction vasculaire et du stress oxydant entre les enfants SS sous traitement HU (*HU+*) et les enfants SS sans HU (*HU-*)

	SS <i>HU-</i> (n = 18)	SS <i>HU+</i> (n = 5)	
Flux sanguin basal (CVC, mm/Hg)	2.45 ± 1.30	3.30 ± 1.32	P > 0.05
Flux sanguin du Plateau (CVC, mm/Hg)	3.52 ± 1.69	3.82 ± 1.82	P > 0.05
Réponse NO-dépendante (%)	43.6 (4.8 ; 77.2)	31.2 (-9.0 ; 36.0)	P > 0.05
Nitrotyrosine (nmol/L)	17.6 (13.9 ; 31.5)	16.7 (10.3 ; 30.5)	P > 0.05
Nitrite_Nitrate (μmol/L)	25.9 (23.8 ; 29.8)	41.7 (30.4 ; 61.8)	P > 0.05
Catalase (μmol/L/min)	33.2 ± 10.8	42.6 ± 20.6	P > 0.05
GPX (nmol/L/min)	16.5 ± 3.2	15.4 ± 3.2	P > 0.05
SOD (μmol/L/min)	52.3 ± 13.1	49.2 ± 12.7	P > 0.05

Les valeurs sont représentées en moyenne ± écart-type ou médiane (25^e et 75^e percentiles).

GPX, glutathione peroxidase; SOD, superoxide dismutase; réponse NO-dépendante, l'augmentation du flux sanguin jusqu'au plateau.

Nos résultats indiquaient que l’HU n’avait pas d’effet ni sur le niveau du stress oxydant ni sur les paramètres micro– et macrovasculaires. Alors que l’HU est connue depuis plus de 30 ans, son utilisation en France reste assez nouvelle et le nombre d’enfants traités par HU reste restreint pour le moment. Pour évaluer les effets bénéfiques probables d’HU sur la réactivité vasculaire, un suivi des patients sera nécessaire en analysant les paramètres vasculaires avant, au cours et après le traitement.

8. L’impact de la dysfonction vasculaire sur la sévérité clinique

La sévérité clinique a été définie dans cette cohorte par le nombre de CVO et STA. Contrairement à ce que nous attendions et selon les résultats récents de Teixeira *et al*, (Teixeira *et al*, 2017), le degré de dysfonction vasculaire ne semble pas moduler la sévérité clinique chez les jeunes patients drépanocytaires de cette cohorte. Aucune association entre le taux de CVO / STA et les paramètres micro ou macrovasculaires n’a été constatée. Une étude prospective sera nécessaire sur plusieurs années pour suivre les changements de la fonction vasculaire et son impact clinique. Le suivi des patients permettra probablement d’évaluer si les patients avec une dysfonction marquée développeraient plus fréquemment des vasculopathies comparativement aux enfants dont la fonction vasculaire est maintenue. Une défaillance vasculaire progressive avec l’âge est bien connue dans la population générale. Ainsi, il est probable que la fonction vasculaire du patient drépanocytaire s’altère progressivement avec l’âge et que son impact sur la sévérité clinique devienne plus important. L’hémolyse et la perturbation du métabolisme de monoxyde d’azote jouent un rôle primordial dans le développement de la dysfonction vasculaire (Kato *et al*, 2007). Plusieurs études ont démontré une association entre les indices d’hémolyse (faible taux en Hb, concentration élevée en LDH, bilirubine etc.) et d’autres complications drépanocytaires comme l’hypertension pulmonaire (Gladwin *et al*, 2004; Morris *et al*, 2005c; Reiter *et al*, 2002; Ataga

et al, 2006; Akinsheye & Klings, 2010), l'ulcères de jambes (Nolan *et al*, 2006; Kato *et al*, 2006b), l'accident vasculaire cérébral (Ohene-Frempong *et al*, 1998), le priapisme (Kato *et al*, 2007) et les atteints rénales (Nath *et al*, 2004).

D. Conclusion &

Perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats de notre première étude (HYPOSNAD), réalisée sur une cohorte pédiatrique antillaise (n= 62 enfants ; 22 SC, 24 SS et 16 AA) démontrent que les fonctions microvasculaire et macrovasculaire sont altérées chez l'enfant drépanocytaire par rapport à des enfants non malades et que cette dysfonction est plus sévère chez l'enfant drépanocytaire homozygotes (SS) comparé aux enfants drépanocytaires hétérozygotes (SC). En outre, nos résultats indiquent que les patients SS comparés aux enfants SC, sont marqués par une défense anti-oxydante sur-sollicitée et saturée avec l'installation d'un état du stress oxydatif chronique, qui était associé à la dysfonction microvasculaire. Le faible taux d'hémolyse et le moindre stress oxydatif, pourraient expliquer la meilleure fonction vasculaire chez les enfants SC. Ainsi il semble que les patients drépanocytaires présentent, et ce dès le plus jeune âge, une dysfonction vasculaire marquée. Contrairement à ce que nous attendions, le degré d'altération vasculaire n'était pas associé à la fréquence des évènements vaso-occlusifs des enfants drépanocytaires. Cependant, dans cette même étude nous avons observé une altération de l'activité du système nerveux autonome chez les adolescents de plus de 15 ans, mais pas chez les enfants les plus jeunes, suggérant un risque sympatho-vasoconstricteur croissant avec l'âge dans cette maladie. L'étude de la fonction microvasculaire par Laser Doppler couplé au module thermique et le questionnaire d'AP ont été réalisés la première fois chez les patients drépanocytaires. Cependant, nos résultats préliminaires demandent confirmation par replication sur de plus grand échantillons. Pour cela quelques points sont également à améliorer : mieux caractériser la groupe des témoins, standardiser la température cutanée de départ et compléter et préciser les mesures du niveau d'activité physique.

L'effet du vieillissement sur le système cardiovasculaire et sur l'activité du système nerveux autonome est bien connu dans la population générale (Harris & Matthews, 2004). Parmi les changements vasculaires structurels liés au vieillissement (dans la population générale), on

note entre autres : une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire, une diminution de la quantité des fibres élastiques et une augmentation de collagène ainsi qu'une diminution de l'élasticité et de la distensibilité vasculaire, une déformation des cellules endothéliales et une calcification vasculaire (W. & LevyD, 2003). De plus la libération des molécules vasoactives (NO, bradykinine, facteurs hyperpolarisants dérivant de l'endothélium) diminue chez les personnes âgées (W. & LevyD, 2003). Les changements physiologiques résultant de ces modifications sont principalement une augmentation de la rigidité artérielle et une diminution de la compliance artérielle (D'Alessio, 2004), une augmentation de la pression artérielle systolique, de la pression artérielle moyenne et de la pression pulsée (Franklin *et al*, 1997). On assiste donc à une défaillance vasculaire progressive avec l'âge. Ainsi, l'hypothèse de l'étude suivante est que l'effet « normal » du vieillissement sur la fonction vasculaire devrait se surajouter aux altérations micro et macrovasculaires liées à la maladie, conduisant alors à un rôle clef de la fonction vasculaire dans la survenue des complications dégénératives survenant avec l'âge dans la maladie drépanocytaire (glomérulopathie, vasculopathie pulmonaire, etc). Nous avons démarré une nouvelle étude (VASCUDREPA) qui a commencé en avril 2016 et est actuellement en cours. Notre projet vise donc à étudier les fonctions micro- et macrovasculaires chez le drépanocytaire adulte (génotypes SS, SC et SB^o) en relation avec plusieurs complications cliniques. On suppose une altération vasculaire plus marquée chez les patients drépanocytaires les plus sévères, notamment ceux exposés à une fréquence de CVO et/ou de STA élevée. Nous testerons l'hypothèse d'un lien entre le niveau d'altération vasculaire et la concentration plasmatique en NO, le degré d'altération hémorhéologique, le niveau de dysfonction du SNA, le déficit d'oxygénation tissulaire (notamment au niveau cérébral), la concentration en microparticules circulantes et le niveau d'activité physique. Cette étude permettra de mieux appréhender le rôle et les déterminants de la dysfonction vasculaire dans la physiopathologie drépanocytaire, afin d'envisager dans un

futur approche des thérapies et stratégies adéquates pour réduire la sévérité clinique des patients. Nous testerons également les effets de l'HU sur la fonction vasculaire.

Le niveau d'activité physique pratiqué chez les enfants d'HYPOSNAD n'a pas permis de mettre en évidence des effets ni bénéfiques ni délétères sur la fonction micro ou macrovasculaire. L'activité physique a plusieurs dimensions. Elle se caractérise par son type (quelle activité physique), sa durée (pendant combien de temps), sa fréquence (quelle régularité et quel fractionnement), son intensité (quel investissement physique et quelle dépense énergétique), et son contexte (quel environnement). Les conditions sociales dans lesquelles elle est pratiquée ont également leur importance (Duncan *et al*, 2005). Ainsi un autre objectif de ce deuxième projet est de mieux caractériser et analyser l'impact de l'activité physique sur la réponse cardiovasculaire. Dans ce contexte, on vise à évaluer si l'activité physique pourrait réellement être une forme thérapeutique pour améliorer la dysfonction endothéliale grâce à sa capacité de stimuler la synthèse de NO et de diminuer le stress oxydant. L'exercice aigu induit des changements vasculaires en augmentant entre autres la libération des molécules vasoactives, ce qui devrait se traduire théoriquement par une amélioration de la fonction vasculaire (Tordi *et al*, 2010). Ainsi nous avons décidé d'évaluer la fonction micro et macrovasculaire avant et 10 min après le test de marche. Nous avons inclus, jusqu'à présent 39 participants (18 SS, 13 SC et 8 témoins AA). Cependant le nombre des participants est très restreint et le spectre d'âge est trop large pour pouvoir donner des premiers résultats. La haute autorité de santé (HAS) a défini clairement la place du réentraînement à l'effort dans la stratégie thérapeutique des patients ayant présenté un événement cardiaque ou vasculaire (Ministère de la santé et des sports, (Sports, 2010). Il pourrait être intéressant de tester dans un troisième temps l'effet d'un programme d'entraînement aérobie d'intensité modérée (inférieure ou égale au premier seuil ventilatoire) par exemple de 8 semaines sur les paramètres de la fonction vasculaire et ses déterminants.

E

BIBLIOGRAPHIE

*« Dance with the waves,
move with the sea,
let the rhythm of the water
set your soul free »*

Christy Ann Martine

- Adamopoulos, S., Parissis, J., Kroupis, C., Georgiadis, M., Karatzas, D., Karavolias, G., Koniavitou, K., Coats, A.J. & Kremastinos, D.T. (2001) Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *European heart journal*, **22**, 791–7
- Adams, McKie, Hsu & Al., F. et (1998) Prevention of stroke by transfusion in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl.J.Med.*, 5–11.
- Adelekan, D., Thurnham, D. & Adekile, A. (1989) Reduced antioxidant capacity in paediatric patients with homozygous sickle cell disease. *Eur J Clin Nutr*, **43**, 609–14.
- Aessopos, A., Farmakis, D., Tsironi, M., Diamanti-Kandarakis, E., Matzourani, M., Fragodimiri, C., Hatziliami, A. & Karagiorga, M. (2007) Endothelial function and arterial stiffness in sickle-thalassemia patients. *Atherosclerosis*, **191**, 427–432.
- Afshar-Kharghan, V. & Thiagarajan, P. (2006) Leukocyte adhesion and thrombosis. *Current opinion in hematology*, **13**, 34–9
- Akinsheye, I. & Klings, E.S. (2010) Sickle cell anemia and vascular dysfunction: The nitric oxide connection. *Journal of Cellular Physiology*, **224**, 620–625.
- Alcorn, R., Bowser, B., Henley, E.J. & Holloway, V. (1984) Fluidotherapy and exercise in the management of sickle cell anemia. A clinical report. *Physical therapy*, **64**, 1520–2
- Alderton, W.K., Cooper, C.E. & Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, **357**, 593–615.
- Alexandre, L., Keclar, L., Romana, M., Saint-Martin, C., Lavocat Bernard, E, Midonet, N., Diara, J., Petras, M., Berchel, C. & Merault, G. (1997) Efficiency of prenatal counselling for sickle cell disease in Guadeloupe. *Genet Couns*, **8**, 25–32.
- Alleyne, S.I., Rauseo, R.D.H. & Serjeant, G.R. (1981) Sexual development and fertility of Jamaican female patients with homozygous sickle cell disease. *Archives of Internal Medicine*, **141**, 1295–1297.
- Allison, A.C. (1954) Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British medical journal*, **1**, 290–4
- Allison, A.C. (1957) Malaria in carriers of the sickle-cell trait and in newborn children. *Experimental parasitology*, **6**, 418–47
- Alpert, B.S., Dover, E. V., Strong, W.B. & Covitz, W. (1984) Longitudinal exercise hemodynamics in children with sickle cell anemia. *American Journal of Diseases of Children*, **138**, 1021–1024.
- 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**, 108–13
- Arvidsson, D., Slinde, F. & Hulthén, L. (2005) Physical activity questionnaire for adolescents validated against doubly labelled water. *European journal of clinical nutrition*, **59**, 376–383.
- Ashcroft & Serjeant (1981) Growth, morbidity and mortality in a cohort of Jamaican adolescents with homozygous sickle cell disease. *W.Ind.Med.J.*, **30**, 197–201.
- Ashton, H. (1975) The effect of increased tissue pressure on blood flow. *Clinical orthopaedics and related research*, **113**, 15–26.
- Aslan, M. & Freeman, B.A. (2002) Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunologic research*, **26**, 107–118.
- Aslan, M., Ryan, T.M., Adler, B., Townes, T.M., Parks, D. a, Thompson, J. a, Tousson, a, Gladwin, M.T., Patel, R.P., Tarpey, M.M., Batinic-Haberle, I., White, C.R. & Freeman, B. a (2001) Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 15215–15220.
- 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.
- Ataga, K.I., Brittain, J.E., Desai, P., May, R., Jones, S., Delaney & Key, N.S. (2012) Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. *PLoS ONE*, **7**.
- 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**, 109–115.
- Atherton, A. & Born, G. (1972) Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel wall. *J Physiol*, **222**, 447–474.
- Aufradet, E., Douillard, A., Charrin, E., Romdhani, A., De Souza, G., Bessaad, A., Faes, C., Bourdeaux, V., Chirico, E., Canet-Soulas, E., Pialoux, V. & Martin, C. (2014) Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mic. *Blood*, **123**.
- Aufradet, E., Monchanin, G., Oyonno-Engelle, S., Feasson, L., Messonnier, L., Francina, A., Bezin, L., Serpero, L.D., Gozal, D., Dodogba, M., Wouassi, D., Banimbeck, V., Djoda, B., Thiriet, P. & Martin, C. (2010) Habitual physical activity and endothelial activation in sickle cell trait carriers. *Medicine and science in sports and exercise*, **42**, 1987–94

- Avogaro, A., Fadini, G.P., Gallo, A., Pagnin, E. & de Kreutzenberg, S. (2006) Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **16**, 39–45.
- Babbitt, D.M., Diaz, K.M., Fearheller, D.L., Sturgeon, K.M., Perkins, A.M., Veerabhadrapa, P., Williamson, S.T., Kretzschmar, J., Ling, C., Lee, H., Grimm, H., Thakkar, S.R., Crabbe, D.L., Kashem, M. a. & Brown, M.D. (2013) Endothelial activation microparticles and inflammation status improve with exercise training in African Americans. *International Journal of Hypertension*, **2013**, 1–11.
- Bailey, S.R., Mitra, S., Flavahan, S. & Flavahan, N.A. (2005) Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries. *Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **289**, H243–H250.
- Balayssac-Siransy, E., Connes, P., Tuo, N., Danho, C., Diaw, M., Sanogo, I., Hardy-Dessources, M.-D., Samb, A., Ballas, S.K. & Bogui, P. (2011) Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **154**, 398–407
- Ballas, S., Lewis, C., Noone, A., Krasnow, SH Kamarulzaman, E. & Burka, E. (1982) Clinical, hematological, and biochemical features of Hb SC disease. *Am J Hematol*, **13**, 37–51.
- Ballas, S.K. (1991) Sickle cell anemia with few painful crises is characterized by decreased red cell deformability and increased number of dense cells. *American journal of hematology*, **36**, 122–30
- Ballas, S.K. & Marcolina, M.J. (2006) Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion*, **46**, 105–10
- Ballas, S.K. & Mohandas, N. (2004) Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, **11**, 209–25
- Banerjee, A.K., Mandal, A., Chanda, D. & Chakraborti, S. (2003) Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and cellular biochemistry*, **253**, 307–12
- Bank, N., Aynedijan, H.S., Qiu, J.-H., Osei, S.Y., Ahima, R.S., Fabry, M.E. & Nagel, R.L. (1996) Renal nitric oxide synthases in transgenic sickle cell mice. *Kidney International*, **50**, 184–189.
- Barabino, Platt & Kaul (2010) Sickle cell biomechanics. *Ann Rev Biomed Eng.*, **12**, 345–67.
- Barbeau, P., Woods, K.F., Ramsey, L.T., Litaker, M.S., Pollock, D.M., Pollock, J.S., Callahan, L.A., Kutlar, A., Mensah, G.A. & Gutin, B. (2001) Exercise in sickle cell anemia: effect on inflammatory and vasoactive mediators. *Endothelium*, **8**, 147–155.

- Barden, E.M., Zemel, B.S., Kawchak, D.A., Goran, M.I., Ohene-Frempong, K. & Stallings, V.A. (2000) Total and resting energy expenditure in children with sickle cell disease. *J Pediatr*, **136**, 73–79.
- Bartelink, M.L., Wollersheim, H., Theeuwes, A., Van Duren, D. & Thien, T. (1990) Changes in skin blood flow during the menstrual cycle: the influence of the menstrual cycle on the peripheral circulation in healthy female volunteers. *Clinical Science*, **78**, 527–532.
- Bartzeliotou, A.I., Margeli, A.P., Tsironi, M., Skenderi, K., Bacoula, C., Chrousos, G.P. & Papassotiriou, I. (2007) Circulating levels of adhesion molecules and markers of endothelial activation in acute inflammation induced by prolonged brisk exercise. *Clinical biochemistry*, **40**, 765–70
- Baskurt & Meiselman (2010) Endothelial Function and Physical Activity. In *Exercise Physiology from a cellular to an integrative Approach* p 237.
- Baskurt, O. K., & Meiselman, H.J. (2003) Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **29**, 435–450.
- BAŞKURT, O.K. (2003) Pathophysiological significance of blood rheology. *y. Turkish Journal of Medical Sciences*, **33**, 347–355.
- 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
- Baskurt, O.K. & Hardeman, M. R., Rampling, M.W. (2007) Handbook of hemorheology and hemodynamics.
- Başkurt, O.K., Levi, E., Çağlayan, S., Dikmenoğlu, N., Ücer, O., Güner, R. & Yörükan, S. (1991) The role of hemorheologic factors in the coronary circulation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **11**, 121–127.
- Baskurt, O.K., Yalcin, O. & Meiselman, H.J. (2004a) Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **30**, 169–178.
- Baskurt, O.K., Yalcin, O. & Meiselman, H.J. (2004b) Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clin. Hemorheol. Microcirc*, **30**, 169–178.
- Baudin (2006) Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt cardio*, **2**, 43–52.
- Bäumler, H., Donath, E., Krabi, A., Knippel, W., Budde, A. & Kiesewetter, H. (1996) Electrophoresis of human red blood cells and platelets: evidence for depletion of dextran. *Biorheology*, **33**, 333–351.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. & Freeman, B.A. (1990) Apparent

- hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 1451–1464.
- Beer, A. (1852) Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik und Chemie*, **86**, 78–88.
- van Beers, E.J., Schaap, M.C., 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**, 1513–1519.
- Beers, V., Nieuwdorp, Duits, Evers, Schnog & Group., B.B.C.S. (2008) Sickle cell patients are characterized by a reduced glycocalyx volume. *Haematologica*, **93**, 307–8.
- Beet, E.A. (1946) Sickle cell disease in the Balovale District of Northern Rhodesia. *East African medical journal*, **23**, 75–86
- Belcher, J.D., Beckman, J.D., Balla, G., Balla, J. & Vercellotti, G. (2010) Heme degradation and vascular injury. *Antioxidants & redox signaling*, **12**, 233–48
- Belcher, J.D., Mahaseth, H., Welch, T.E., Otterbein, L.E., Hebbel, R.P. & Vercellotti, G.M. (2006) Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. *The Journal of clinical investigation*, **116**, 808–16
- Belcher, J.D., Mahaseth, H., Welch, T.E., Vilback, A.E., Sonbol, K.M., Kalambur, V.S., Bowlin, P.R., Bischof, J.C., Hebbel, R.P. & Vercellotti, G.M. (2005) Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **288**, H2715–25
- Belhassen, L., Pelle, G., Sediame, S., Bachir, D., Carville, C., Bucherer, C., Lacombe, C., Galacteros, F. & Adnot, S. (2001) Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood*, **97**, 1584–1589.
- Bensinger, T.A. & Gillette, P.N. (1974) Hemolysis in sickle cell disease. *Archives of Internal Medicine*, **133**, 624–631.
- Benzie, I. & Strain, J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods enzymol*, **299**, 15–27.
- Bernaudin, F., Verlhac, S., Chevret, S., Torres, M., Coic, L., Arnaud, C., Kamdem, A., Hau, I., Grazia Neonato, M. & Delacourt, C. (2008) G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for

- abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood*, **112**, 4314–7
- Bertles, J.F. & Döbler, J. (1969) Reversible and irreversible sickling: a distinction by electron microscopy. *Blood*, **33**, 884–98
- Bertuglia, S., Colantuoni, Coppini & Intaglietta (1991) Hypoxia-or hyperoxia-induced changes in arteriolar vasomotion in skeletal muscle microcirculation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **260**, H362–H372.
- Blair, S.N., Horton, E., Leon, A.S., Lee, I.M., Drinkwater, B.L., Dishman, R.K., Mackey, M. & Kienholz, M.L. (1996) Physical activity, nutrition, and chronic disease. *Medicine and science in sports and exercise*, **28**, 335–49
- Bloomer, R.J., Davis, P.G., Consitt, L.A. & Wideman, L. (2007) Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. *International journal of sports medicine*, **28**, 21–5
- Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., Wideman, L., McKenzie, M.J. & Consitt, L.A. (2005) Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *Journal of strength and conditioning research*, **19**, 276–85
- Blum, a, Yeganeh, S., Peleg, a, Vigder, F., Kryuger, K., Khatib, a, Khazim, K. & Dauerman, H. (2005) Endothelial function in patients with sickle cell anemia during and after sickle cell crises. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **19**, 83–86
- Boignard, A., Salvat-Melis, M., Carpentier, P.H., Minson, C.T., Grange, L., Duc, C. & Cracowski, J.L. (2005) Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis research & therapy*, **7**, R1103.
- Bonetti, Lerman, L. & Lerman, A. (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **23**, 168–175.
- Borel, M.J., Buchowski, M.S., Turner, E.A., Peeler, B.B., Goldstein, R.E. & Flakoll, P.J. (1998) Alterations in basal nutrient metabolism increase resting energy expenditure in sickle cell disease. *AmJ Physiol*, **274**, E357–E364.
- Bouchard, C. (2001) Physical activity and health: introduction to the dose-response symposium. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, **33**, 347–350.
- Bouguer, P. (1729) Essai d'optique sur la gradation de la lumière.
- Boutouyrie, P. (2008) New techniques for assessing arterial stiffness. *Diabetes & metabolism*, **34**, 21–26.
- Bouvrain, Y. & Levy, B. (1981) 'Windkessel' and coronary debit. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, **74**, 635–639.

- Braden, D.S., Covitz, W. & Milner, P.F. (1996) Cardiovascular function during rest and exercise in patients with sickle-cell anemia and coexisting alpha thalassemia-2. *American journal of hematology*, **52**, 96–102.
- Brooks-Asplund, E. M., Kenney, W.L. (1998) Chronic hormone replacement therapy does not alter resting or maximal skin blood flow. *Journal of Applied Physiology*, **85**, 505–510.
- Brugnara, C., Van Ha, T. & Tosteson, D.C. (1989) Acid pH induces formation of dense cells in sickle erythrocytes. *Blood*, **74**, 487–95
- Brun, J.F., Fons, I. & Supparo (1993) Could exercise-induced increase in blood viscosity at high shear rate be entirely explained by hematocrit and plasma viscosity changes ? *Clinical Hemohreology*, **13**, 187–199.
- Brun, J.-F. (2002) Exercise hemorheology as a three acts play with metabolic actors: is it of clinical relevance? *Clinical hemorheology and microcirculation*, **26**, 155–74
- Brun, J.F., Bouchahda, C., Chaze, D., Benhaddad, A.A., Micallef, J.P. & Mercier, J. (2000) The paradox of hematocrit in exercise physiology: which is the ‘normal’ range from an hemorheologist’s viewpoint? *Clinical hemorheology and microcirculation*, **22**, 287–303
- Brun, J.F., Khaled, S., Raynaud, E., Bouix, D., Micallef, J.P. & Orsetti, A. (1998) The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevance to physiology and pathophysiology? *Clinical hemorheology and microcirculation*, **19**, 89–104
- Brunt, V.E. & Minson, C.T. (2011) Cutaneous thermal hyperemia: more than skin deep. *Am Physiological Soc*, **111**, 5–7.
- Buchowski, M.S., Chen, K.Y., Byrne, D. & Wang, W.C. (2002a) Equation to estimate resting energy expenditure in adolescents with sickle cell anemia. *Am J Clin Nutr*, **76**, 1335–44.
- Buchowski, M.S., de la Fuente, F. a, Flakoll, P.J., Chen, K.Y. & Turner, E. a (2001) Increased bone turnover is associated with protein and energy metabolism in adolescents with sickle cell anemia. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **280**, E518–E527.
- Buchowski, M.S., Townsend, K.M., Williams, R. & Chen, K.Y. (2002b) Patterns and energy expenditure of free-living physical activity in adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr*, **140**, 86–92.
- Buga, G.M., Gold, M.E., Fukuto, J.M. & Ignarro, L.J. (1991) Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension*, **17**, 187–193
- Bull & Brenton-Gorius (1995) Morphology of the erythron. In T. Kipps (Ed.), *William’s Hematology*, McGraw-Hill (ed) pp 349–363. New York.
- Butler, A.R., Megson, I.L. & Wright, P.G. (1998) Diffusion of nitric oxide and scavenging by

- blood in the vasculature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1425**, 168–176.
- Cabel, Meiselman, H.J., Popel, A.S. & Johnson, P.C. (1997) Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **272**, H1020–H1032.
- Cabrera, G., Cot, M., Migot-Nabias, F., Kremsner, P.G., Deloron, P. & Luty, A.J.F. (2005) The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. *The Journal of infectious diseases*, **191**, 1631–8
- Cahill, L.S., Gazdzinski, L.M., Tsui, A.K., Zhou, Y.Q., Portnoy, S., Liu, E. & Sled, J.G. (2017) Functional and anatomical evidence of cerebral tissue hypoxia in young sickle cell anemia mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **37**, 994–1005.
- Callahan, L.A., Woods, K.F., Mensah, G.A., Ramsey, L.T., Barbeau, P. & Gutin, B. (2002) Cardiopulmonary response to exercise in women with sickle cell anemia. *AM J Respir Crit Care Med*, **165**, 1309–1316.
- Campbell, A., Minniti, C.P., Nouraie, M., Arteta, M., Rana, S., Onyekwere & Kato, G.J. (2009) Prospective evaluation of haemoglobin oxygen saturation at rest and after exercise in paediatric sickle cell disease patients. *British Journal of Haematology*, **147**, 352–359.
- Cao, J., Mathews, M.K., McLeod, D.S., Merges, C., Hjelmeland, L.M. & Luty, G.A. (1999) Angiogenic factors in human proliferative sickle cell retinopathy. *British journal of ophthalmology*, **83**, 838–846.
- Cao, Z. & Ferrone, F.A. (1996) A 50th order reaction predicted and observed for sickle hemoglobin nucleation. *Journal of molecular biology*, **256**, 219–22
- Carlos, T.M. & Harlan, J.M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, **84**, 2068–2101.
- Caro, C.G. (1978) *The mechanics of the circulation* Cambridge University Press.
- Carroll (2006) *The Making of the Fittest*.
- Caspersen, C.J., Powell, K.E. & Christenson, G.M. (1985) Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public health reports*, **100**, 126–31
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B. & Thannickal, V. J., Rajavashisth, T. B., Gimbrone Jr, M. A., ... & Liao, J.K. (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules

- and proinflammatory cytokines. *Journal of Clinical Investigation*, **96**, 60.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C. & Schumacker, P.T. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 11715–20.
- Chappell, D.C., Varner, S.E., Nerem, R.M., Medford, R.M. & Alexander, R.W. (1998) Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circulation Research*, **82**, 532–539.
- Charache, S., Terrin, M.L., Moore, R.D., Dover, G.J., Barton, F.B. & Eckert, S. V., I. of the M.S. of H. in S.C.A. (1995) Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *New England Journal of Medicine*, **332**, 1317–1322.
- Charkoudian, N., & Johnson, J.M. (1997) Modification of active cutaneous vasodilation by oral contraceptive hormones. *Journal of Applied Physiology*, **83**, 2012–2018.
- Charkoudian, N., & Johnson, J.M. (1999) Altered reflex control of cutaneous circulation by female sex steroids is independent of prostaglandins. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **276**, H1634–H1640.
- Charkoudian, N., Stephens, D.P., Pirkle, K.C., Kosiba, W.A. & Johnson, J.M. (1999) Influence of female reproductive hormones on local thermal control of skin blood flow. *Journal of Applied Physiology*, **87**, 1719–1723.
- Charlot, K., Antoine-Jonville, S., Moeckesch, B., Jumet, S., Romana, M., Waltz, X. & Tarer, V. (2017a) Cerebral and muscle microvascular oxygenation in children with sickle cell disease: Influence of hematology, hemorheology and vasomotion. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **65**, 23–28.
- Charlot, K., Hierso, R., Lemonne, N., Romana, M., Tressières, B. & Lalanne-Mistrih, M. L., ... & Connes, P. (2017b) Changes in autonomic nervous activity during vaso-occlusive crisis in patients with sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **177**, 484–486.
- Charlot, K., Moeckesch, B., Jumet, S., Romana, M., Waltz, X., Divialle-Doumdo, L. & Tarer, V. (2015) Physical activity level is not a determinant of autonomic nervous system activity and clinical severity in children/adolescents with sickle cell anemia: A pilot study. *Pediatric blood & cancer*, **62**, 1962–1967.
- Charrin, E., Aufradet, E., Douillard, A., Romdhani, A., Souza, G., DeBessaad, A., Faes, C., Chirico, E.N., Pialoux, V. & Martin, C. (2014) Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice. *British journal of haematology*, **168**, 747–56.

- Charrin, E., Dubé, J.J., Connes, P., Pialoux, V., Ghosh, S., Faes, C., Ofori-Acquah, S.F. & Martin, C. (2017) Moderate exercise training decreases inflammation in transgenic sickle cell mice. *Blood cells, molecules & diseases*
- Chien, S. (1975) Biophysical behavior of red cells in suspensions. *The red blood cell*, **2**, 1031–133.
- Chien, S., Usami, S. & JF, B. (1970) Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, **49**, 623–34.
- Chirico, E.N., Martin, C., Faës, C., Féasson, L., Oyono-Enguélé, S., Aufradet, E., Dubouchaud, H., Francina, A., Canet-Soulas, E., Thiriet, P., Messonnier, L. & Pialoux, V. (2012) Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **112**, 1445–53 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22323645>.
- Chirico, E.N. & Pialoux, V. (2012) Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB life*, **64**, 72–80.
- Christoph, G.W., Hofrichter, J. & Eaton, W.A. (2005) Understanding the shape of sickled red cells. *Biophysical journal*, **88**, 1371–6
- Clarkson, P., Montgomery, H.E., Mullen, M.J., Donald, a E., Powe, a J., Bull, T., Jubbs, M., World, M. & Deanfield, J.E. (1999) Exercise training enhances endothelial function in young men. *Journal of the American College of Cardiology*, **33**, 1379–1385.
- Clarkson, P.M. & Thompson, H.S. (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition*, **72**, 637S–46S
- Clausen, J.P. (1977) Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man. *Physiological reviews*, **57**, 779–815
- Cokelet, G.R. (1999) Viscometric, in vitro and in vivo blood viscosity relationships: how are they related? *Biorheology*, **36**, 343–358.
- Cokelet, G.R. & Meiselman, H.J. (2007) Macro-and micro-rheological properties of blood. In *Handbook of hemorheology and hemodynamics* pp 45–71.
- Colantuoni, A., Bertuglia, S. & Intaglietta, M. (1984) Quantitation of rhythmic diameter changes in arterial microcirculation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **246**, H508–H517.
- Collin, S. & Levy, B. (2008) Physiopathologie de l'hyporéactivité vasculaire au cours des états de choc Pathophysiological mechanisms of vascular hyporesponsiveness in shock states. *Reanimation*, **17**, 101–110.
- Colucci, W.S., Gimbrone, M. A., McLaughlin, M.K., Halpern, W. & Alexander, R.W. (1982)

- Increased vascular catecholamine sensitivity and α -adrenergic receptor affinity in female and estrogen-treated male rats. *Circ Res*, **50**, 805–811.
- Conference, C. (1987) Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *Jama*, **258**, 1205–9.
- Connes, P. (2011) Altered autonomic nervous system function in sickle cell disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **184**, 398–400
- Connes, P. & Boisseau, M.R. (2010) Hemorheology . *Sang Thrombose Vaisseaux*, **22**, 126–136
- Connes, P., Caillaud, C., Py, G., Mercier, J., Hue, O. & Brun, J.-F. (2007) Maximal exercise and lactate do not change red blood cell aggregation in well trained athletes. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **36**, 319–326
- Connes, P. & Coates, T.D. (2013) Autonomic nervous system dysfunction: Implication in sickle cell disease. *Comptes Rendus - Biologies*, **336**, 142–147
- Connes, P., Hue, O. & Perrey, S. (2010) Exercise physiology: From a cellular to an integrative approach.
- Connes, P., MacHado, R., Hue, O. & Reid, H. (2011) Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **49**, 151–163
- Connes, P., Simmonds, M.J., Brun, J.-F. & Baskurt, O.K. (2013a) Exercise hemorheology: Classical data, recent findings and unresolved issues. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **53**, 187–199
- Connes, P., Verlhac, S. & Bernaudin, F. (2013b) Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **161**, 484–498
- Conran, N., Franco-Penteado, C. & Costa, F. (2009) Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobine*, **33**, 1–16.
- Coquerel, D., Delile, E. & Tamion, F. (2013) Le glycocalyx: tapis protecteur de l'endothélium. *Réanimation*, **22**, 173–180.
- Cosentino, F. & Katusić, Z.S. (1995) Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation*, **91**, 139–44
- Covas, M.-I., Elosua, R., Fitó, M., Alcántara, M., Coca, L. & Marrugat, J. (2002) Relationship between physical activity and oxidative stress biomarkers in women. *Medicine and science in sports and exercise*, **34**, 814–9
- Covitz, W., Espeland, M., Gallagher, D., Hellenbrand, W., Leff, S. & Talner, N. (1995) The

- heart in sickle cell anemia. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD). *Chest*, **108**, 1214–9
- Coyole (1991) cardiovascular function during exercise: neural control factors. *sports science exchange*, **4**,.
- Crapo, R.O., Casaburi, R., Coates, A.L., Enright, P.L., MacIntyre, N.R., McKay, R.T., Johnson, D., Wanger, J.S., Zeballos, R.J., Bittner, V. & Mottram, C. (2002) ATS statement: Guidelines for the six-minute walk test. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **166**, 111–117.
- Crawford, J.H., Isbell, T.S., Huang, Z., Shiva, S., Chacko, B.K. & Schechter, A. N., ... & Ho, C. (2006) Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood*, **107**, 566–574.
- Crepeau, R.H., Dykes, G., Garrell, R. & Edelstein, S.J. (1978) Diameter of haemoglobin S fibres in sickled cells. *Nature*, **274**, 616–7
- Crilly, M., Coch, C., Bruce, M., Clark, H. & Williams, D. (2007) Indices of cardiovascular function derived from peripheral pulse wave analysis using radial applanation tonometry: a measurement repeatability study. *Vascular medicine (London, England)*, **12**, 189–197.
- Cyrklaff, M., Srismith, S., Nyboer, B., Burda, K., Hoffmann, A., Lasitschka, F., Adjalley, S., Bisseye, C., Simporé, J., Mueller, A.-K., Sanchez, C.P., Frischknecht, F. & Lanzer, M. (2016) Oxidative insult can induce malaria-protective trait of sickle and fetal erythrocytes. *Nature Communications*, **7**, 13401
- D'Alessio (2004) Aging and the endothelium. *Experimental gerontology*, **39**, 165–171.
- Dabadie, P., Erny, P. & Destribats, B. (1986) Hémodilution et oxygénation tissulaire. In *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, **5**, 204–210.
- Dart, A.M. & Kingwell, B.A. (2001) Pulse pressure—a review of mechanisms and clinical relevance. *Journal of the American College of Cardiology*, **37**, 975–984.
- Das, S. & Nair, R. (1980) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *British Journal of Haematology*, **44**, 87–92.
- Dasgupta, T., Fabry, M. & Kaul, D. (2006) Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free radical biology & medicine*, **41**, 1771–1780.
- Dedeken, L., Chapusett, R., Lê, P., Heijmans, C., Devalck, C., Huybrechts, S., Ziereisen, F., Hanssens, L., Rozen, L., Noubouossie, D., Mujinga, M. & Ferster, A. (2014) Reduction

- of the Six-Minute Walk Distance in Children with Sickle Cell Disease Is Correlated with Silent Infarct: Results from a Cross-Sectional Evaluation in a Single Center in Belgium. *PLoS ONE*, **9**.
- Delclaux, C., Zerah-Lancner, F., Bachir, D., Habibi, A., Monin, J.L., Godeau, B. & Galacteros, F. (2005) Factors associated with dyspnea in adult patients with sickle cell disease. *CHEST Journal*, **128**, 3336–3344.
- Diaw, M., Pialoux, V., Martin, C., Samb, A., Diop, S., Faes, C., Mury, P. & Diop, N.S. (2015) Sickle Cell Trait Worsens Oxidative Stress , Abnormal Blood Rheology , and Vascular Dysfunction in Type 2 Diabetes. , 1–9.
- Diggs, L.W., Ahmann, C.F. & Bibb, J. (1933) The incidence and significance of the sickle cell trait. *Annals of Internal Medicine*, **7**, 769–778.
- Donovan, R.J., Husain, D. & Kirsch, L.J. (1970) Reactions of atomic oxygen. Part 1.—The rate of the reaction $O + O_2 + M \rightarrow O_3 + M$ ($M = He, Ar$ and Kr). *Transactions of the Faraday Society*, **66**, 2551–2559.
- Duncan, S.C., Duncan, T.E. & Strycker, L.A. (2005) Sources and Types of social support in youth physical activity. *Health psychology*, **24**, 3.
- Eaton, J.W., Skelton, T.D., Swofford, H.S., Kolpin, C.E. & Jacob, H.S. (1973) Elevated erythrocyte calcium in sickle cell disease. *Nature*, **246**, 105–6
- Eaton, W.A. & Hofrichter, J. (1987) Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood*, **70**, 1245–66
- Edozien, J.C., Gilles, H.M. & Udeozo, I.O.K. (1962) Adult and cord-blood gamma-globulin and immunity to malaria in Nigerians. *The Lancet*, **280**, 951–955.
- El-Ghamrawy, M.K., Hanna, W.M., Abdel-Salam, A., El-Sonbaty, M.M., Youness, E.R. & Adel, A. (2014) Oxidant-antioxidant status in Egyptian children with sickle cell anemia: A single center based study. *Jornal de Pediatria*, **90**, 286–292
- El-Sayed, M.S., Ali, N. & El-Sayed Ali, Z. (2005) Haemorheology in exercise and training. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, **35**, 649–70
- Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, J.L., Covas, M.I., Ordoñez-Llanos, J. & Marrugat, J. (2003) Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis*, **167**, 327–34
- Embury, S.H. (1986) The clinical pathophysiology of sickle cell disease. *Annual review of medicine*, **37**, 361–76
- Embury, S.H., Clark, M.R., Monroy, G. & Mohandas, N. (1984) Concurrent sickle cell

- anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *The Journal of clinical investigation*, **73**, 116–23
- Embury, S.H., Matsui, N.M., Ramanujam, S., Mayadas, T.N., Noguchi, C.T., Diwan, B.A., Mohandas, N. & Cheung, A.T. (2004) The contribution of endothelial cell P-selectin to the microvascular flow of mouse sickle erythrocytes in vivo. *Blood*, **104**, 3378–3385.
- Emmel, V.E. (1917) A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. *Archives of Internal Medicine*, **20**, 586.
- Epstein, Gozal, Yang, Wurster & Cheng (2007) Morphology and topography of nucleus ambiguus projections to cardiac ganglia in rats and mice. *Neuroscience*, **149**, 845–860.
- Ergul, S., Parish, C., Puett, D. & Ergul, A. (1996) Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension*, **28**, 652–655.
- Ernst, E. (1987) Influence of regular physical activity on blood rheology. *European heart journal*, **8 Suppl G**, 59–62 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3443127>.
- Etteldorf, J.N., Smith, J.D., Tuttle, A.H. & Diggs, L.W. (1955) Renal hemodynamic studies in adults with sickle cell anemia. *The American journal of medicine*, **18**, 243–8
- Faes, C., Charrin, E., Connes, P., Pialoux, V. & Martin, C. (2015) Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice. *American Journal of Hematology*, **90**, E32–E33
- Fåhræus, R. (1929) The suspension stability of the blood. *Physiological Reviews*, **9**, 241–274.
- Fain, O. (2004) [Vitamin C deficiency]. *La Revue de medecine interne*, **25**, 872–80
- Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Villiotou, V., Pouliopoulou, S., Fotinakis, P., Taxildaris, K. & Deliconstantinos, G. (2004) Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Medicine and science in sports and exercise*, **36**, 2065–72
- Feihl, F., Waeber, B. & Askari, A.D. (2009) Hypertension artérielle: macrocirculation et microcirculation. *Revue Médicale Suisse*, **216**, 1778.
- Félétou, M. & Vanhoutte, P.M. (2006) Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award Lecture). *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **291**, H985–H1002.
- Ferrone, F.A., Hofrichter, J. & Eaton, W.A. (1985) Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism. *Journal of molecular biology*, **183**, 611–31 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4020873>.
- Ferrone, F.A., Ivanova, M. & Jasuja, R. (2002) Heterogeneous nucleation and crowding in sickle hemoglobin: an analytic approach. *Biophysical journal*, **82**, 399–406
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.

- Nature*, **408**, 239–47 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089981>.
- Fisher-Wellman, K. & Bloomer, R.J. (2009) Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic medicine : DM*, **8**, 1
- Flanders, K.C., Bhandiwad, A.R. & Winokur, T.S. (1997) Transforming growth factor-betas block cytokine induction of catalase and xanthine oxidase mRNA levels in cultured rat cardiac cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **29**, 273–80
- Florescu, M., Stoicescu, C., Magda, S., Petcu, I., Radu, M., Palombo, C. & Vinereanu, D. (2010) ‘Supranormal’ cardiac function in athletes related to better arterial and endothelial function. Echocardiography. *Echocardiography*, **27**, 659–667.
- Foy, H., Kondi, A., Timms, G.L., Brass, W. & Bushra, F. (1954) The variability of sickle-cell rates in the tribes of Kenya and the Southern Sudan. *British medical journal*, **1**, 294–7
- Di Francescomarino, S., Sciartilli, A., Di Valerio, V., Di Baldassarre, A. & Gallina, S. (2009) The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, **39**, 797–812
- Franke, W. D., Stephens, G. M., & S. (1998) Effects of intense exercise training on endothelium-dependent exercise-induced vasodilatation. Clinical. *Clinical physiology (Oxford, England)*, **18**, 521–528.
- Franklin, S.S., Gustin, W., Wong, N.D., Larson, M.G., Weber, M.A., Kannel, W.B. & Levy, D. (1997) Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. *Circulation*, **96**, 308–315.
- Frenette, P.S. & Atweh, G.F. (2007) Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The Journal of clinical investigation*, **117**, 850–8
- Furchgott, R. F., Jothianandan, D. (1991) Endothelium-dependent and-independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Journal of Vascular Research*, **28**, 52–61.
- Furchgott, R.F. & Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373–376.
- Gabriel, A., & Przybylski, J. (2010) Sickle-cell anemia: a look at global haplotype distribution.
- Galea, G. & Davidson, R.J. (1985) Hemorrheology of marathon running. *International journal of sports medicine*, **6**, 136–8
- Galinanes, M. & Matata, B. (2002) Protein nitration is predominantly mediated by a peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leucocytes. *Biochem J*, **367**, 467–473.

- Galley, H.F. & Webster, N.R. (2004) Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia*, **93**, 105–13
- Garcia-Cardena, Fan, Shah, Sorrentino, Cirino, Papapetropoulos & Sessa (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, **392**, 812–824.
- Gaz, S.L. (1970) Mécanique des fluides.
- Geffken, D.F., Cushman, M., Burke, G.L., Polak, J.F., Sakkinen, P.A. & Tracy, R.P. (2001) Association between physical activity and markers of inflammation in a healthy elderly population. *American journal of epidemiology*, **153**, 242–50
- Geiger, R., Strasak, A., Treml, B., Gasser, K., Kleinsasser, A., Fischer, V., Geiger, H., Loeckinger, A. & Stein, J.I. (2007) Six-minute walk test in children and adolescents. *The Journal of pediatrics*, **150**, 395–399, 399.e1–e2.
- Gibson, J.S., Speake, P.F. & Ellory, J.C. (1998) Differential oxygen sensitivity of the K⁺-Cl⁻ cotransporter in normal and sickle human red blood cells. *The Journal of physiology*, **511 Pt 1**, 225–34
- Gilligan, D.M., Badar, D.M., Panza, J.A., Quyyumi, A.A. & Cannon, R.O. (1994) Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*, **90**, 786–791.
- Gizi, A., Papassotiriou, I., Apostolakou, F., Lazaropoulou, C., Papastamataki, M., Kanavaki, I., Katoltychou, V., Goussetis, E., Kattamis, A., Rombos, 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 & diseases*, **46**, 220–225.
- Glader, B.E. & Nathan, D.G. (1978) Cation permeability alterations during sickling: relationship to cation composition and cellular hydration of irreversibly sickled cells. *Blood*, **51**, 983–9
- Gladwin, M.T., Sachdev, V., Jison, M.L., Shizukuda, Y., Plehn, J.F., Minter, K., Brown, B., Coles, W.A., Nichols, J.S., Ernst, I., Hunter, L.A., Blackwelder, W.C., Schechter, A.N., Rodgers, G.P., Castro, O., & Ognibene, F.. (2004) Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, **350**, 886–895.
- Gladwin, M.T., Schechter, A.N., Ognibene, F.P., Coles, W. a., Reiter, C.D., Schenke, W.H., Csako, G., Waclawiw, M. a., Panza, J. a. & Cannon, R.O. (2003) Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation*, **107**, 271–278.
- Gladwin, M.T., Shelhamer, J.H., Ognibene, F.P., Pease-Fye, M.E., Nichols, J.S., Link, B. & Rodgers, G.P. (2002) Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with

- sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, **116**, 436–444.
- Gladwin, M.T. & Vichinsky, E. (2008) Pulmonary complications of sickle cell disease. *The New England journal of medicine*, **359**, 2254–65
- Gleeson, M. (2007) Immune function in sport and exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **103**, 693–9
- Godin, C., Caprani, A., Dufaux, J. & Flaud, P. (1993) Interactions between neutrophils and endothelial cells. *Journal of cell science*, **106**, 441–452.
- Goldberg, M.F. (1976) Retinal vaso-occlusion in sickling hemoglobinopathies. *Birth defects original article series*, **12**, 475–515.
- Goldberg, M.F. (1977) Retinal neovascularization in sickle cell retinopathy. *Transactions. Section on Ophthalmology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, **83**, OP409–31 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/329529>.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E. & Viña, J. (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free radical biology & medicine*, **44**, 126–31
- Goswami, K. & Ray, D. (2011) NoPutative pathogenic effect of oxidative stress in sickle cell disorder. *Biomedical Research*, **22**, 23–27.
- Goto, C., Higashi, Y., Kimura, M., Noma, K., Hara, K., Nakagawa, K. & Nara, I. (2003) Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation*, **108**, 530–535.
- Goto, C., Nishioka, K., Umemura, T., Jitsuiki, D., Sakaguchi, A., Kawamura, M., Chayama, K., Yoshizumi, M. & Higashi, Y. (2007) Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through an increase in nitric oxide bioavailability in humans. *American journal of hypertension*, **20**, 825–30
- Graham, C., Maude, G. & Serjeant, G. (1986) Delayed menarche in homozygous sickle cell disease. *W.Ind.Med.J.*, **58**, 18–22.
- Graido-Gonzalez, E., Doherty, J.C., Bergreen, E.W., Organ, G., Telfer, M. & McMillen, M.A. (1998) Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E 2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood*, **92**, 2551–2555.
- Grau, M., Mozar, A., Charlot, K., Lamarre, Y., Weyel, L. & Suhr, F., ... & Lemonne, N. (2015a) 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**, 728–736.
- Grau, M., Mozar, A., Charlot, K., Lamarre, Y., Weyel, L., Suhr, F., Collins, B., Jumet, S.,

- Hardy-Dessources, M.-D., Romana, M., Lemonne, N., Etienne-Julan, M., Antoine-Jonville, S., Bloch, W. & Connes, P. (2015b) 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**, 728–736
- Green, D., Maiorana, A., O'Driscoll, G. & Taylor, R. (2004) Effect of exercise training on endothelium- derived nitric oxide function in humans. *J Physiol*, **561**, 1–25.
- Green, D.J., Cable, N.T., Fox, Rankin & Taylor, R.R. (1994) Modification of forearm resistance vessels by exercise training in young men. *Journal of Applied Physiology*, **77**, 1829–1833.
- Green, D.J., Spence, A., Rowley, N., Thijssen, D.H.J. & Naylor, L.H. (2012) Vascular adaptation in athletes: is there an ‘athlete’s artery’? *Experimental physiology*, **97**, 295–304
- Greenberg, M.S., Kass, E.H. & Castle, W.B. (1957) Studies on the destruction of red blood cells. XII. Factors influencing the role of S hemoglobin in the pathologic physiology of sickle cell anemia and related disorders. *The Journal of clinical investigation*, **36**, 833–43
- Gueguen-Duchesne, M., Durand, F., Beillot, J., Dezier, J.F., Rochcongar, P. & LeGoff, M. C., ... & Genetet, B. (1987) Could maximal exercise be a hemorheological risk factor? *Clin Hemorheol*, **7**, 418.
- Gürcan, N., Erbas, D., Ergen, E., Bilgehan, A., DüNDAR, S., Aricioglu, A. & Dikmenoglu, N. (1998) Changes in blood haemorheological parameters after submaximal exercise in trained and untrained subjects. *Physiological research*, **47**, 23–7
- Haber, F., & Weiss, J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **147**, 332–351.
- Habibi, A., Khellaf, M., Bachir, D., Schaeffer, A., Galactéros, F. & Godeau, B. (2005) La séquestration splénique aiguë: une complication rare et grave des syndromes drépanocytaires majeurs de l’adulte. À propos d'un cas. *La Revue de Médecine Interne*, **26**, 339–342.
- Hahn, E. V. & Gillespie, E.B. (1927) Sickle cell anemia: report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Archives of Internal Medicine*, **39**, 233–254.
- Haldane, J.S. (1949) The rate of mutation of human genes. *Hereditas*, **35**, 267–273.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C. & Chapelle, J.P. (2007) Le stress

- oxydant. *Revue Médicale de Liège*, **62**, 628–38.
- Hallmark, R., Patrie, J.T., Liu, Z., Gaesser, G. a, Barrett, E.J. & Weltman, A. (2014) The effect of exercise intensity on endothelial function in physically inactive lean and obese adults. *PloS one*, **9**, e85450
- Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Kränkel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J.F., Mohr, F.W. & Schuler, G. (2003) Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **107**, 3152–8
- Hardeman, M.R., Goedhart, P.T. & Shin, S. (2007) Methods in hemorheology. In *Handbook of hemorheology an dhemodynamics*.
- Hargrave, D.R., Wade, A., Evans, J.P., Hewes, D.K. & Kirkham, F.J. (2003) Nocturnal oxygen saturation and painful sickle cell crises in children. *Blood*, **101**, 846–848.
- Harms, S.J. & Hickson, R.C. (1983) Skeletal muscle mitochondria and myoglobin, endurance, and intensity of training. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, **54**, 798–802
- Harris, K.F. & Matthews, K.A. (2004) Interactions between autonomic nervous system activity and endothelial function: a model for the development of cardiovascular disease. *Psychosomatic medicine*, **66**, 153–164.
- Havell, T.C., Hillman, D. & Lessin, L.S. (1978) Deformability characteristics of sickle cells by microelastimetry. *American Journal of Hematology*, **4**, 9–16.
- Hayashi, T., Yamada, K., Esaki, T., Kuzuya, M., Satake, S., Ishikawa, T., ... & Iguchi, A. (1995) Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor mediated system. *Biochemical and biophysical research communications*, **214**, 847–855.
- Hayem, G. (1889) Du sang et de ses alterations anatomiques.
- Haynes, R.H. & Burton, A.C. (1959) Role of the non-Newtonian behavior of blood in hemodynamics. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, **197**, 943–950.
- Haynes, R.L. & Dunn, J.M. (1967) Oral contraceptives, thrombosis, and sickle cell hemoglobinopathies. *JAMA*, **200**, 994–996.
- Hebbel, R. (2011) Reconstructing sickle cell disease: a data-based analysis of the ‘hyperhemolysis paradigm’ for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. *Am J Hematol.*, **86**, 123–54.
- 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**, 237–41
- Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T., & Münzel, T. (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, **104**, 2673–2678.
- Herrick, J.B. (2001) Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *The Yale journal of biology and medicine*, **74**, 179–84 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11501714>.
- Hofrichter, J. (1976) A physical description of hemoglobin S gelation. *Proceedings of the Symposium on Molecular and Cellular Aspects of Sickle Cell Disease*.
- Hofrichter, J. (1986) Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. III. Nucleation rates determined from stochastic fluctuations in polymerization progress curves. *Journal of molecular biology*, **189**, 553–71
- Holloszy, J.O. (1967) Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, **242**, 2278–82
- Holowatz, L.A. & Thompson-Torgerson, C., Kenney, W.L. (2010) Aging and the control of human skin blood flow. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, **15**, 718.
- Horton (1874) *The diseases of tropical climates and their treatment* Churchill.
- Horton, E.S. (1983) Introduction: an overview of the assessment and regulation of energy balance in humans. *The American journal of clinical nutrition*, **38**, 972–7
- Huang, C.R., Pan, W.D., Chen, H.Q. & Copley, A.L. (1987) Thixotropic properties of whole blood from healthy human subjects. *Biorheology*, **24**, 795–801.
- Iemitsu, M., Miyauchi, T., Maeda, S., Yuki, K., Kobayashi, T., Kumagai, Y., Shimojo, N., Yamaguchi, I. & Matsuda, M. (2000) Intense exercise causes decrease in expression of both endothelial NO synthase and tissue NOx level in hearts. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **279**, R951–9
- Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M. & Wood, K.S. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*, **61**, 866–879.
- Ikenaga, Y., Nishi, S. & Komagata, Y. (2013) Experimental study on the pressure and pulse wave propagation in viscoelastic vessel tubes effects of liquid viscosity and tube stiffness. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr. Freq Control*, **60**, 2381–8.
- 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**, 311–312
- Ingram, V.M. (1957) Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*, **180**, 326–8
- Intaglietta, M. (1990) Vasomotion and flowmotion: physiological mechanisms and clinical evidence. *Vascular Medicine Review*, **2**, 101–112.
- Jackson, J.F., Odom, J.L. & Bell, W.N. (1961) Amelioration of sickle cell disease by persistent fetal hemoglobin. *J. JAMA*, **177**, 867–869.
- Jama, A.H. Al, Salem, A.H. Al & Dabbous, I.A. Al (2002) Massive splenic infarction in Saudi patients with sickle cell anemia: a unique manifestation. *American journal of hematology*, **69**, 205–9 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891808>.
- Jan, Y.K., Struck, B.D., Foreman, R.D. & Robinson, C. (2009) Wavelet analysis of sacral skin blood flow oscillations to assess soft tissue viability in older adults. *Microvascular Research*, **78**, 162–168.
- Jastaniah, W. (2011) Epidemiology of sickle cell disease in Saudi Arabia. *Annals of Saudi medicine*, **31**, 289.
- Ji, L. (1999) Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine*, **222**, 283–292.
- Jimenez, C.T., Scott, R.B., Henry, W.L. & Sampson, C. C., Ferguson, A.D. (1966) Studies in sickle cell anemia: XXVI. The effects of homozygous sickle cell disease on the onset of menarche, pregnancy, fertility, pubescent changes, and body growth in Negro subjects. *American Journal of Diseases of Children*, **111**, 497–504.
- Johansson, L.H. & Borg, L.H. (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical biochemistry*, **174**, 331–336.
- Johnson, L. R., & Laughlin, M.H. (2000) Chronic exercise training does not alter pulmonary vasorelaxation in normal pigs. *Journal of Applied Physiology*, **88**, 2008–2014.
- Kanczler, J.M., Millar, T.M., Bodamyali, T., Blake, D.R. & Stevens, C.R. (2003) Xanthine oxidase mediates cytokine-induced, but not hormone-induced bone resorption. *Free radical research*, **37**, 179–87
- Karakitsos, D., Patrianakos, A. P., De Groot, E., Boletis, J., Karabinis, A., Kyriazis, J., ... & Daphnis, E. (2006) Androgen deficiency and endothelial dysfunction in men with end-stage kidney disease receiving maintenance hemodialysis. *American journal of nephrology*, **26**, 536–543.
- Kasapis, C. & Thompson, P.D. (2005) The effects of physical activity on serum C-reactive

- protein and inflammatory markers: a systematic review. *Journal of the American College of Cardiology*, **45**, 1563–9
- Kato, G., Nouraie, S. & Gladwin, M. (2013) Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. *Blood*, **122**, 1091–2.
- 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**, 37–47.
- Kato, G.J., Hebbel, R.P., Steinberg, M.H. & Gladwin, M.T. (2009) Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *American Journal of Hematology*, **84**, 618–625.
- Kato, G.J., Martyr, S., Blackwelder, W.C., Nichols, J.S., Coles, W.A., Hunter, L.A., Brennan, M.-L., Hazen, S.L. & Gladwin, M.T. (2005) Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *British journal of haematology*, **130**, 943–53
- Kato, G.J., McGowan, V., Machado, R.F., Little, J.A., Taylor, J. 6th, Morris, C.R., Nichols, J.S., Wang, X., Poljakovic, M., Morris, S.M.J. & Gladwin, M.T. (2006a) 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**, 2279–2285.
- Kato, G.J., McGowan, V., Machado, R.F., Little, J.A., Taylor, J., Morris, C.R. & Gladwin, M.T. (2006b) 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**, 2279–2285.
- Kato, G.J., Steinberg, M.H. & Gladwin, M.T. (2017) Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *The Journal of clinical investigation*, **127**, 750–760
- Kaul, D., Finnegan, E. & Barabino, G. (2009) Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirculation*, **16**, 97–111.
- Kaul, D.K. & Fabry, M.E. (2004) In vivo studies of sickle red blood cells. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, **11**, 153–65
- Kaul, D.K., Liu, X.-D., Fabry, M.E. & Nagel, R. (2000) Impaired nitric oxide - mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, 1799–1806.
- Kaul, D.K., Zhang, X., Dasgupta, T. & Fabry, M.E. (2008) Arginine therapy of transgenic-

- knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **295**, H39–H47.
- Kawamoto, R., Tabara, Y., Kohara, K., Miki, T., Kusunoki, T., Katoh, T. & Abe, M. (2012) A slightly low hemoglobin level is beneficially associated with arterial stiffness in Japanese community-dwelling women. *Clinical and experimental hypertension*, **34**, 92–98.
- Kelishadi, R., Hashemi, M., Mohammadifard, N., Asgary, S., & Khavarian, N. (2008) Association of changes in oxidative and proinflammatory states with changes in vascular function after a lifestyle modification trial among obese children. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **54**, 147–153.
- Kennedy, a P., Williams, B., Meydrech, E.F. & Steinberg, M.H. (1988) Regional and temporal variation in oscillatory blood flow in sickle cell disease. *American journal of hematology*, **28**, 92–94.
- Khaleel, M., Puliyl, M., Sunwoo, J., Shah, P., Kato, R. M., Chalacheva, P. & Sposto, R. (2015) Thermal Pain and Pain Anticipation Induce a Decrease in Microvascular Perfusion in Sickle Cell and Normal Subjects. *Blood*, **126**.
- Kilham, H. (2001) Current pediatric diagnosis and treatment. *Journal of Paediatrics and Child Health*, **37**, 419–420.
- Kilic-Toprak, E., Ardic, F., Erken, G., Unver-Kocak, F., Kucukatay, V. & Bor-Kucukatay, M. (2012) Hemorheological responses to progressive resistance exercise training in healthy young males. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, **18**, CR351–60
- Kim, J., Yoon, J., Cho, M. & Lee, B. (2013) Blood characteristics effect on pulse wave velocity. *Clin Hemorheol Microcirc*, **55**, 193–203.
- Kim, Y.S., Nur, E., van Beers, E.J., Truijen, J., Davis, S.C., Biemond, B.J. & van Lieshout, J.J. (2009) Dynamic cerebral autoregulation in homozygous Sickle cell disease. *Stroke*, **40**, 808–814.
- King, B. (2004) Nitric oxid production from hydroxyurea. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, 737–744.
- Kingwell, B. a, Sherrard, B., Jennings, G.L. & Dart, a M. (1997) Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. *The American journal of physiology*, **272**, H1070–H1077.
- Kingwell, B.A. & Arnold, P. J., Jennings, G. Dart, A.M. (1997) Spontaneous running

- increases aortic compliance in Wistar-Kyoto rats. *Cardiovascular Research*, **35**, 132–137.
- Kislukhin, V. V (2010) Stochasticity of flow through microcirculation as a regulator of oxygen delivery. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, **7**, 29.
- Klabunde, R. (2005) Cardiovascular physiology concepts 2nd ed. Lippincott Williams&Wilkins.
- 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**, 280–5
- Klinken, S.P. (2002) Red blood cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **34**, 1513–1518.
- Knez, W.L., Jenkins, D.G. & Coombes, J.S. (2007) Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Medicine and science in sports and exercise*, **39**, 283–8
- Knight-Madden, J.M., Connes, P., Bowers, A., Nebor, D., Hardy-Dessources, M.-D., Romana, M., Reid, H., Pichon, A.P., Barthélémy, J.-C., Cumming, V.B., Elion, J. & 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**, 231–238
- Kohen, R. & Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, **30**, 620–50
- Konotey-Ahulu, F.I.D. (1968) Hereditary qualitative and quantitative erythrocyte defects in Ghana: an historical and geographical survey. *Ghana Med J*, **7**, 118–19.
- Koshy, M., Thomas, C. & Goodwin, J. (1990) Vascular lesions in the central nervous system in sickle cell disease (neuropathology). *Journal of the Association for Academic Minority Physicians: the official publication of the Association for Academic Minority Physicians*, **1**, 71–78.
- Kulozik, A.E., Wainscoat, J.S., Serjeant, G.R., Kar, B.C., Al-Awamy, B., Essan, G.J., Falusi, A.G., Haque, S.K., Hilali, A.M. & Kate, S. (1986) Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *American journal of human genetics*, **39**, 239–44.
- Kurtz, A. (1987) Adenosine stimulates guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 6296–6300.
- Kvernmo, H.D., Stefanovska, A., Kirkeboen, K.A., Kvernebo, K. (1999) Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and

- endothelium-independent vasodilators. *Microvascular Research*, **57**,3, 298-309.
- L'Esperance, V.S., Cox, S.E., Simpson, D., Gill, C., Makani, J., Soka, D. & Clough, G.F. (2013) Peripheral vascular response to inspiratory breath hold in paediatric homozygous sickle cell disease. *Experimental physiology*, **98**, 49–56.
- Labie, D. & Elion, J. (2005) Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie*, **2**, 220–239.
- Lamarre, Y., Hardy-Dessources, M.-D., Romana, M., Lalanne-Mistrih, M.-L., Waltz, X., Petras, M., Doumdo, L., Blanchet-Deverly, A., Martino, J., Tressières, B., Maillard, F., Tarer, V., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2014) Relationships between systemic vascular resistance, blood rheology and nitric oxide in children with sickle cell anemia or sickle cell-hemoglobin C disease. *Clinical hemorheology and microcirculation*, (In Press)
- Lamarre, Y., Romana, M., Waltz, X., Lalanne-Mistrih, M.-L., Tressieres, B., Divialle-Doumdo, L., Hardy-Dessources, M.-D., Vent-Schmidt, J., Petras, M., Broquere, C., Maillard, F., Tarer, V., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2012a) 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., Waltz, X., Lalanne, M.-L., Tressières, B., Divialle-Doumdo, L., Hardy, M.-D., Vent-Schmidt, J., Petras, M., Broquere, C., Maillard, F., Tarer, V., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2012b) Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica*, **97**, 1641–1647
- Lambert, J.. (1760)Photometria sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae Klett.
- Lange, R.D., Minnich, V. & Moore, C. V (1951) Effect of oxygen tension and of pH on the sickling and mechanical fragility of erythrocytes from patients with sickle cell anemia and the sickle cell trait. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **37**, 789–802
- Lapoumeroulie, C., Benkerrou, M., Odievr, M., Ducroq, R., Brun, M. & Elion, J. (2005) Decreased Plasma endothelin-1 Levels in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Haematologica*, **90**, 401–403.
- Lapouméroulie, C., Dunda, O., Ducroq, R., Trabuchet, G., Mony-Lobé, M., Bodo, J.M., Carnevale, P., Labie, D., Elion, J. & Krishnamoorthy, R. (1992) A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Human genetics*, **89**, 333–7
- Lappas, M., Mitton, A., Mition, A. & Permezel, M. (2010) In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in

- placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes. *The Journal of endocrinology*, **204**, 75–84
- Lazzaretti, L.L., Griebeler, I.H., Brandão, V.D.M., Benfato, M.S., Santin, A.P. & Castro, S. M., & Peralba, M.D.C.R. (2008) Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *Journal of the National Medical association*, **100**, 897–902.
- Ledingham, I.M. (1977) Factors influencing oxygen availability. *Journal of clinical pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*, **11**, 1–6
- Lee, A., Mowbray, P.I., Lowe, G.D., Rumley, A., Fowkes, F.G.. & Allan, P.. (1998) Blood viscosity and elevated carotid Intima-Media thickness in men and women. *Circulation*, **97**, 1467–73.
- Leeuwenburgh, C. & Heinecke, J.W. (2001) Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medicinal chemistry*, **8**, 829–38
- Lemaire, C., Lamarre, Y., Lemonne, N., Waltz, X., Chahed, S., Cabot, F., Botez, I., Tressieres, B., Lalanne-Mistrih, M.-L., Etienne-Julan, M. & 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**, 205–212
- Lemogoum, D., Van Bortel, L., Najem, B., Dzudie, A., Teutcha, C., Madu, E., Leeman, M., Degaute, J.P. & Van De Borne, P. (2004) Arterial stiffness and wave reflections in patients with sickle cell disease. *Hypertension*, **44**, 924–929.
- Lemonne, N., Charlot, K., Waltz, X., Ballas, S.K., Lamarre, Y., Lee, K., . & Connes, P. (2015) Hydroxyurea treatment does not increase blood viscosity and improves red blood cell rheology in sickle cell anemia. *Haematologica*, **100**, 383–386.
- Lemonne, N., Möckesch, B., Charlot, K., Garnier, Y., Waltz, X., Lamarre, Y. & Connes, P. (2017) Effects of hydroxyurea on blood rheology in sickle cell anemia: A two-years follow-up study. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*.
- Lemonne, N., Romana, M., Lamarre, Y., Hardy-Dessources, M.-D., Lionnet, F., Waltz, X., Tarer, V., Mougénel, D., Tressières, B., Lalanne-Mistrih, M.-L., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2014) Association between relative systemic hypertension and otologic disorders in patients with sickle cell-hemoglobin C disorder. *American Journal of Hematology*, **89**, 667
- Li, Y., Tian, X.. & Liu, T. (2015) Association between whole blood viscosity and arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*, **49**, 148–154.
- Libbey, J. (2013) *Annales de Biologie Clinique* Vol.71 (3).
- Lionnet, F., Hammoudi, N., Stojanovic, K., Avellino, V., Grateau, G., Girot, R. & Haymann,

- J. (2012) Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica*, **97**, 1136–1141.
- Lipowsky, H.H., Sheikh, N.U. & Katz, D.M. (1987) Intravital microscopy of capillary hemodynamics in sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, **80**, 117–127.
- Livingstone, F.B. (1957) Sickling and malaria. *British medical journal*, **1**, 762.
- Lonsdorfer, J., Bogui, P., Otayeck, A., Bursaux, E., Poyart, C. & Cabannes, R. (1983) Cardiorespiratory adjustments in chronic sickle cell anemia. *Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire*, **19**, 339–344.
- Lowe (1986) Blood rheology in arterial disease. *Clinical Science*, **71**, 137–146.
- Lubin, B., Chiu, D., Bastacky, J., Roelofsen, B. & Van Deenen, L.L. (1981) Abnormalities in membrane phospholipid organization in sickled erythrocytes. *The Journal of clinical investigation*, **67**, 1643–9
- Lundberg, J.O. & Weitzberg, E. (2005) NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **25**, 915 LP – 922
- Luster, A.D. (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine*, **338**, 436–45
- Lutty, G.A., Merges, C., Crone, S. & McLeod, D.S. (1994) Immunohistochemical insights into sickle cell retinopathy. *Current eye research*, **13**, 125–38
- Lux, S.E., John, K.M. & Karnovsky, M.J. (1976) Irreversible deformation of the spectrin-actin lattice in irreversibly sickled cells. *The Journal of clinical investigation*, **58**, 955–63
- Luzzatto, L., Nwachuku-Jarrett, E.S. & Reddy, S. (1970) Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. *Lancet (London, England)*, **1**, 319–21
- Ma, Q. (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **53**, 401–26
- Mack, A. & Kato, G. (2006) Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **38**, 1237–43.
- Mack, A.K., McGowan II, V.R., Tremonti, C.A., Ackah, D., Barnett, C., Machado, R.F., Gladwin, M.T. & Kato, G.J. (2008) Sodium nitrite promotes regional blood flow in patients with sickle cell disease: a phase I/II study. *British Journal of Haematology*, **142**, 971–978.
- Maiorana, A., O'Driscoll, G., Cheetham, C., Dembo, L., Stanton, K., Goodman, C., Taylor, R. & Green, D. (2001) The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. *Journal of the American College of Cardiology*, **38**,

860–866.

- Mairbäurl, H. (2013) Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Frontiers in physiology*, **4**, 332
- Makena Hightower, C., Salazar Vázquez, B.Y., Woo Park, S., Sriram, K., Martini, J., Yalcin, O., . & Intaglietta, M. (2011) Integration of cardiovascular regulation by the blood/endothelium cell-free layer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, **3**, 458–470.
- Manfredini, V., Lazzaretti, L., Griebler, I., Santin, A., Brandao, V., Wagner, S., Castro, S. & Al, E. (2008) Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *Journal of the National Medical association*, **100**, 897–902.
- Marossy, A., Svorc, P., Kron, I. & Gresová, S. (2009) Hemorheology and circulation. *Clinical hemorheology and microcirculation*, **42**, 239–58
- Marsac, J. (2013) Heart rate variability: a cardiometabolic risk marker with public health implications. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*, **197**, 175–186.
- Martin, C., Pialoux, V., Faes, C., Charrin, E., Skinner, S. & Connes, P. (2015) Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? *Br J Sports Med*.
- Mason, V.R. (1922) Sickle cell anemia. *Journal of the American Medical Association*, **79**, 1318–1320.
- McAllister, R.M., Kimani, J.K., Webster, J.L., Parker, J.L. & Laughlin, M.H. (1996) Effects of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. *Journal of Applied Physiology*, **80**, 216–225.
- McAllister, R.M. & Laughlin, M.H. (2006a) Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. *Essays in biochemistry*, **42**, 119–31
- McAllister, R.M. & Laughlin, M.H. (2006b) Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. *Essays in biochemistry*, **42**, 119–131.
- McCurdy, P.R. & Sherman, A.S. (1978) Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR. *The American journal of medicine*, **64**, 253–8
- Mestre, J.R., Hernandez, A., Agramonte, O. & Hernandez, P. (1997) Cardiovascular autonomic dysfunction in sickle cell anemia: a possible risk factor for sudden death?. *Clinical Autonomic Research*, **7**, 121–125.
- Miller, V.M. & Vanhoutte, P.M. (1991) Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. *American Journal of Physiology-*

- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **261**, R1022–R1027.
- Millet, C., Roustit, M., Blaise, S. & Cracowski, J.L. (2011) Comparison between laser speckler contrast imaging and laser Doppler imaging to assess skin blood flow in humans. *Microvascular Research*, **82**, 147–151.
- Minneci, P.C., Deans, K.J., Zhi, H., Yuen, P.S., Star, R.A., Banks, S.M., Schlechter, A.N., Natanson, C., Gladwin, M.T. & Solomon, S.B. (2005) Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J.Clin.Invest*, **115**, 3409–3417.
- Minniti, C.P., Sable, C., Campbell, A., Rana, S., Ensing, G., Dham, N., . & Castro, O.L. (2009) Elevated tricuspid regurgitant jet velocity in children and adolescents with sickle cell disease: association with hemolysis and hemoglobin oxygen desaturation. *Haematologica*, **94**, 340–347.
- Minson, C., Berry, L. & Joyner, M. (2001) Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J Appl Physiol*, **91**, 1619–26.
- Minson, C.T. (2010) Thermal provocation to evaluate microvascular reactivity in human skin. *Journal of Applied Physiology*, **109**, 1239–1246.
- Misko, T., Schilling, R., Salvemini, D., Moore, W. & Currie, M. (1993) A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem*, **214**, 11–16.
- Mitchell, G.F. (2008) Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *Journal of Applied Physiology*, **105**, 1652–1660.
- Mitton, B. (2014) Hemoglobin C Disease. *Medscape*.
- Mohan, J., Lip, G., Blann, A., Bareford, D. & Marshall, J. (2011) Endothelium-dependent and endothelium- independent vasodilatation of the cutaneous circulation in sickle cell disease. *Eur J Clin Invest*, **41**, 546–551.
- Mohandas, N.A.R.L.A. & 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**, 171–192.
- Moldoveanu, A.I., Shephard, R.J. & Shek, P.N. (2001) The cytokine response to physical activity and training. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, **31**, 115–44
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B. & Torres, R. (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters*, **12**, 75–92
- Moncada, S., & Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal*

- of Medicine, *New England Journal of Medicine*, **329**, 2002–2012.
- Moncada, S., Radomski, M. W., & Palmer, R.M. (1988) Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochemical pharmacology*, **37**, 2495–2501.
- Monostori, P., Baráth, Á., Fazekas, I., Hódi, E., Máté, A., Farkas, I. & Bereczki, C. (2010) Microvascular reactivity in lean, overweight, and obese hypertensive adolescents. *European journal of pediatrics*, **169**, 1369–1374.
- De Montalembert, M., Aggoun, Y., Niakate, A., Szezepanski, I. & Bonnet, D. (2007) Endothelial-dependent vasodilation is impaired in children with sickle cell disease. *Haematologica*, **92**, 1709–1710.
- Monteiro, C., Rueff, J., Falcao, A.B., Portugal, S. & Weatherall, D. J., & Kulozik, A.E. (1989) The frequency and origin of the sickle cell mutation in the district of Coruche/Portugal. *Human genetics*, **82**, 255–258.
- Montoya, J.J., Fernández, N., Monge, L., Diéguez, G. & Villalón, Á.L.G. (2011) Nitric Oxide-mediated Relaxation to Lactate of Coronary Circulation in the Isolated Perfused Rat Heart. *Journal of cardiovascular pharmacology*, **58**, 392–398.
- Morgan, T.E., Cobb, L.A., Short, F.A. & Ross, R., & Gunn, D.R. (1971) Effects of long-term exercise on human muscle mitochondria. In *Muscle metabolism during exercise* pp 87–95. Springer US.
- Morris, C.R. (2008) Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 177–185.
- Morris, C.R., Kato, G.J., Poljakovic, M., Wang, X. & Blackwelder, W. C., Sachdev, V., ... & Gladwin, M.T. (2005a) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, **294**, 81–90.
- Morris, C.R., Kato, G.J., Poljakovic, M., Wang, X., Blackwelder, W.C., Sachdev, V., Hazen, S.L., Vichinsky, E.P., Morris, S.M.J. & Gladwin, M.T. (2005b) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, **294**, 81–90.
- Morris, C.R., Kato, G.J., Wang, X., Hazen, S.L., Morris, S.M. & Gladwin, M.T. (2005c) Dysregulated Arginine Metabolism, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension, and Mortality in Sickle Cell Disease. *American Medical Association*, **294**,.
- Murrant & IH., S. (2000) Coupling of muscle metabolism and muscle blood flow in capillary units during contraction. *Acta Physiol Scand.*, **168**, 531–41.

- Nagasaka, T. (1987) Skin vasoconstriction induced by local skin heating. *The Japanese journal of physiology*, **37**, 761–772.
- Nagasaka, T., Hirata, K. & Nunomura, T. (1987). (1987) Contribution of arteriovenous anastomoses to vasoconstriction induced by local heating of the human finger. *The Japanese journal of physiology*, **37**, 425–433.
- Nagel, R.L., Fabry, M.E., Pagnier, J., Zohoun, I., Wajcman, H., Baudin, V. & Labie, D. (1985) Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *The New England journal of medicine*, **312**, 880–4
- Nagel, R.L., Fabry, M.E. & Steinberg, M.H. (2003) The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Reviews*, **17**, 167–178.
- Nagel, R.L. & Ranney, H.M. (1990) Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene. *Seminars in hematology*, **27**, 342–59.
- Nahavandi, M., Nichols, J.P., Hassan, M., Gandjbakhche, A. & Kato, G.J. (2009) Near-infrared spectra absorbance of blood from sickle cell patients and normal individuals. *Hematology*, **14**, 46–48.
- Naseem, K.M. (2005) The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular aspects of medicine*, **26**, 33–65.
- Nash, G.B., Johnson, C.S. & Meiselman, H.J. (1984) Mechanical properties of oxygenated red blood cells in sickle cell (HbSS) disease. *Blood*, **63**, 73–82.
- Nath, K.A., Katusic, Z.S. & Gladwin, M.T. (2004) The perfusion paradox and vascular instability in sickle cell disease. *Microcirculation*, **11**, 179–193.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal*, **6**, 3051–3064.
- Nathan, C. & Xie, Q.W. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, **78**, 915–918.
- Natta, C., Chen, L. & Chow, C. (1990) Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta haematologica*, **83**, 130–132.
- Nebor, D., Bowers, A., Hardy-Dessources, M.-D., Knight-Madden, J., Romana, M., Reid, H., Barthélémy, J.-C., Cumming, V., Hue, O., Elion, J., Reid, M. & 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**, 1589–1594
- Nebor, D., Broquere, C., Brudey, K., Mouguel, D., Tarer, V., Connes, P., Elion, J. & 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*,

- Neel, J.V. (1949) The inheritance of sickle cell anemia. *Science*, **110**, 64–66.
- Neu, B. & Meiselman, H.J. (2002) Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophysical journal*, **83**, 2482–2490.
- Neuhaus, Couch, Sutherland & Buchan (2017) Novel method to study pericyte contractility and responses to ischaemia in vitro using electrical impedance. *J Cereb Blood Flow Metab.*, **37**, 2013–2024.
- Neuhaus, D., Behn, C. & Gaetgens, P. (1992) Haemorheology and exercise: intrinsic flow properties of blood in marathon running. *International journal of sports medicine*, **13**, 506–11
- Nielsen, A.N., Mizuno, M., Ratkevicius, A., Mohr, T., Rohde, M., Mortensen, S.A. & Quistorff, B. (1999) No effect of antioxidant supplementation in triathletes on maximal oxygen uptake, ³¹P-NMRS detected muscle energy metabolism and muscle fatigue. *International journal of sports medicine*, **20**, 154–8
- Nilsson, H. & Aalkjær, C. (2003) Vasomotion: mechanisms and physiological importance. *Molecular interventions*, **3**, 79.
- Nolan, V.G., Adewoye, A., Baldwin, C. & Wang, L., Ma, Q., Wyszynski, D. F., Steinberg, M.H. (2006) Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- β /BMP pathway. *British Journal of Haematology*, **133**, 570–578.
- Noma, K., Oyama, N. & Liao, J.K. (2006) Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **290**, C661–C668.
- Norgan (1992) Physical activity and health. Vol 34 Cambridge University Press.
- Nouraei, M., Lee, J.S., Zhang, Y., Kanias, T., Zhao, X., Xiong, Z., Oriss, T.B., Zeng, Q., Kato, G.J., Gibbs, J.S., Hildesheim, M.E. Sachdev, V., Barst, R.J., Machado, R.F., Hassell, K.L., Little, J.A., Schraufnagel, D.E., Krishnamurti, L., Novelli, E., Girgis, R.E., Morris, C.R., Rosenzweig, E.B., et al (2013) The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica*, **98**, 464–472.
- Novelli, E.M., Hildesheim, M., Rosano, C., Vanderpool, R., Simon, M., Kato, G.J. & Gladwin, M.T. (2014) Elevated Pulse Pressure is Associated with Hemolysis, Proteinuria and Chronic Kidney Disease in Sickle Cell Disease. *PLoS ONE*, **9**,
- 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**, 484–489.
- Nur, E., Kim, Y., Truijen, J., van Beers, E.J., Davis, S.C., Brandjes, D.P., Biemond, B.J. & van Lieshout, J.J. (2009) Cerebrovascular reserve capacity is impaired in patients with sickle cell disease. *Blood*, **114**, 3473–3478.
- Oberley, L. & Spitz, D. (1985) Nitroblue tetrazolium. In : Handbook of methods for oxygen radical research Boca Raton FL: CRC.
- Oguanobi, N.I., Onwubere, B.J., 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**, 169–175.
- Ohene-Frempong, K., Weiner, S.J., Sleeper, L.A., Miller, S.T., Embury, S. & Moohr, J. W., C.S. of S.C.D. (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*, **91**, 288–294.
- Ohene-Frempong, K. (1991) Stroke in sickle cell disease: demographic, clinical, and therapeutic considerations. *Seminars in hematology*, **28**, 213–9
- Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, **95**, 351–358.
- Oner, C., Dimovski, A.J., Olivieri, N.F., Schiliro, G., Codrington, J.F., Fattoum, S., Adekile, A.D., Oner, R., Yüregir, G.T. & Altay, C. (1992) Beta S haplotypes in various world populations. *Human genetics*, **89**, 99–104
- Osei, S.Y., Ahima, R.S., Fabry, M.E., Nagel, R.L. & Bank, N. (1996) Immunohistochemical localization of hepatic nitric oxide synthase in normal and transgenic sickle cell mice: the effect of hypoxia. *Blood*, **88**, 3583–8
- Oztas, Y., Durukan, I., Unal, S. & Ozgunes, N. (2012) Plasma protein oxidation is correlated positively with plasma iron levels and negatively with hemolysate zinc levels in sickle-cell anemia patients. *International journal of laboratory hematology*, **34**, 129–135.
- Paglia, D. & Valentine, W. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, **70**, 158–167.
- Palek, J., Liu, A., Liu, D., Snyder, L.M., Fortier, N.L., Njoku, G., Kiernan, F., Funk, D. & Crusberg, T. (1977) Effect of procaine HCl on ATP: calcium-dependent alterations in red cell shape and deformability. *Blood*, **50**, 155–64
- Paniagua, O.A., Bryant, M.B. & Panza, J.A. (2001) Role of Endothelial Nitric Oxide in Shear Stress–Induced Vasodilation of Human Microvasculature. *Circulation*, **103**, 1752–1785.
- Park, K. H., & Park, W.J. (2015) Endothelial dysfunction: clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. *Journal of Korean medical science*,

30, 1213–1225.

- Parkhurst, K., Lin, H. & DeVan, A. (2012) Contribution of blood viscosity in the assessment of flow-mediated dilation and arterial stiffness. *Vascular medicine*, **17**, 231–234.
- Parthasarathi, K. & Lipowsky, H.H. (1999) Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **277**, H2145–H2157.
- Pasche, Feihl, Liaudet & Waeber. (2007) Mesure non-invasive de la pression artérielle centrale: comment et pourquoi? *Praxis*, **96**, 1137–1140.
- Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J. & Wells, I.C. (1949) Sick cell anemia, a molecular disease. *Science*, **110**, 543–548.
- Pearson, H.A., Spencer, R.P. & Cornelius, E.A. (1969) Functional asplenia in sickle-cell anemia. *The New England journal of medicine*, **281**, 923–6
- 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*, **15**, 400–407.
- Pedersen, B.K. & Hoffman-Goetz, L. (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological reviews*, **80**, 1055–81
- Pellegrin, M., Mazzolai, L., Berthelot, A., & Laurant, P. (2009) Endothelial dysfunction and cardiovascular risk. Exercise protects endothelial function and prevents cardiovascular disease. *Science et sports*, **24**, 63–73.
- Pepin, J. L. & Levy, P. (2002) Pathophysiology of cardiovascular risk in sleep apnea syndrome (SAS). *Revue neurologique*, **158**, 785–796.
- Perticone, F., Ceravolo, R., Pujia, A., Ventura, G. & Iacopino, S. (2001) Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*, **104**, 191–196.
- Perutz, R.R., Liquori, A.M. & Eirich, F. (1951) X-ray and solubility studies of the haemoglobin of sickle-cell anaemia patients. *Nature*, **167**, 929–31
- Pialoux, V., Brown, A.D., Leigh, R., Friedenreich, C.M. & Poulin, M.J. (2009) Effect of cardiorespiratory fitness on vascular regulation and oxidative stress in postmenopausal women. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, **54**, 1014–20
- Pianos, P.T., Johnson, J.N., Turchetta, A. & Johnson, B.D. (2009) Pulmonary function and ventilatory limitation to exercise in congenital heart disease. *Congenital heart disease*, **4**, 2–11.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.O. (2002) Mécanismes

- physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**, 233–239.
- Pittman, R.N. (2011) Regulation of tissue oxygenation. *Colloquium series on integrated systems physiology: from molecule to function*, **3**, 1–100.
- Platt, O.S. (1982) Exercise-induced hemolysis in sickle cell anemia: shear sensitivity and erythrocyte dehydration. *Blood*, **59**, 1055–60
- Platt, O.S., Rosenstock, W. & Espeland, M.A. (1984) Influence of sickle hemoglobinopathies on growth and development. *New England Journal of Medicine*, **311**, 7–12.
- Poredoš, P. (2002) Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, **32**, 274–277.
- Powars, D.R., Chan, L. & Schroeder, W.A. (1990) Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical implications. *The American journal of pediatric hematology/oncology*, **12**, 367–74
- Powers, S.K. & Jackson, M.J. (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, **88**, 1243–76
- Pruneau, J., Philippon, B., Maillard, F. & Hue, O. (2008) Sport et drépanocytose: le paradoxe dans l’itinéraire thérapeutique des adolescents drépanocytaires «SS» en Guadeloupe. *Sciences sociales et santé*, **26**, 5–32.
- Pryor, W.A. & Squadrito, G.L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *The American journal of physiology*, **268**, L699–722 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7762673>.
- Pyke, K.E. & Tschakovsky, M.E. (2005) The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *The Journal of physiology*, **568**, 357–369.
- Pyne, D.B. (1994) Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *Australian journal of science and medicine in sport*, **26**, 49–58
- Quinn, C.T. & Dowling, M.M. (2012) Cerebral tissue hemoglobin saturation in children with sickle cell disease. *Pediatric blood & cancer*, **59**, 881–887.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Koltai, E., Taylor, A.W. & Goto, S. (2008) Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing research reviews*, **7**, 34–42
- Radak, Z., Taylor, A.W., Ohno, H. & Goto, S. (2001) Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise immunology review*, **7**, 90–107
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C. & Castro, L. (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 1451–1464.

- Radomski, M.W., Vallance, P., Whitley, G., Foxwell, N. & Moncada, S. (1993) Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovascular research*, **27**, 1380–1382.
- Rahimi, Z., Karimi, M., Haghshenass, M. & Merat, A. (2003) Beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from southwest Iran. *American journal of hematology*, **74**, 156–60
- Raj, A., Bertolone, S.J., Mangold, S. & Edmonds Jr, H.L. (2004) Assessment of cerebral tissue oxygenation in patients with sickle cell disease: effect of transfusion therapy. *Journal of pediatric hematology/oncology*, **26**, 279–283.
- Ramplung, M.W., Meiselman, H.J., Neu, B. & Baskurt, O.K. (2004) Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology*, **41**, 91–112.
- Rank, B.H., Carlsson, J. & Hebbel, R.P. (1985) Abnormal redox status of membrane-protein thiols in sickle erythrocytes. *The Journal of clinical investigation*, **75**, 1531–7 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3998148>.
- Ranque, B., Menet, A., Boutouyrie, P., Diop, I.B., Kingue, S. & Diarra, M., ... & Sanogo, I. (2016) arterial stiffness impairment in sickle cell Disease associated With chronic Vascular complications. *Circulation*, **134**, 923–933.
- Ranque, B., Menet, A., Diop, I.B., Kingue, S., N’guetta, R. & Diarra, M., ... & Jouven, X. (2014) Pulse Wave Velocity and Augmentation Index as New Markers of Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Preliminary Results of the CADRE Study. *Circulation*, **130**.
- Ranque, B., Menet, A., Kingue, S., Lobe, M.M. & Diop, I. B., Diop, S., ... & Kramoh, K.E. (2012) Cadre: première étude africaine multicentrique des complications cardiovasculaires de la drépanocytose. *La Revue de Médecine Interne*, **33**, 60.
- Raper, A.B. (1949) The incidence of sicklaemia. *East Afr Med J*, **26**, 281–282.
- Rees, D.C., Williams, T.N. & Gladwin, M.T. (2010) Sickle-cell disease. *The Lancet*, **376**, 2018–2031
- Reinke, W., Gaehtgens, P. & Johnson, P.C. (1987) Blood viscosity in small tubes: effect of shear rate, aggregation, and sedimentation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **253**, H540–H547.
- Reiter, C.D. & Gladwin, M.T. (2003) An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. *Current Opinion in Hematology*, 99–107.
- Reiter, C.D., Wang, X., Tanus-Santos, J.E., Hogg, N., Cannon, R.O. 3rd, Schechter, A.N. & Gladwin, M.T. (2002) Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature medicine*, **8**, 1383–1389.

- Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., Van Zandvoort, M.A. & oude Egbrink, M.G. (2007) The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **454**, 345–359.
- Renoux, C., Romana, M., Joly, P., Ferdinand, S., Faes, C., Lemonne, N., Skinner, S., Garnier, N. & Etienne-Julan M, Bertrand Y, Petras M, Cannas G, Divialle-Doumido L, Nader E, Cuzzubbo D, Lamarre Y, Gauthier A, Waltz X, Kebaili K, Martin C, Hot A, Hardy-Dessources MD, Pialoux V, C.P. (2016) Effect of Age on Blood Rheology in Sickle Cell Anaemia and Sickle Cell Haemoglobin C Disease: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE*, **11**.
- Resnick, N. & Gimbrone, M.A. (1995) Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *The FASEB Journal*, **9**, 874–882.
- Rhinesmith, H. S., Schroeder, W.A. & Martin, N. (1958) The N-Terminal Sequence of the β Chains¹ of Normal Adult Human Hemoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, **80**, 3358–3361.
- Rhinesmith, H. S., Schroeder, W.A. & Pauling, L. (1957) Hemoglobin., A quantitative study of the hydrolysis of human dinitrophenyl (DNP) globin: the number and kind of polypeptide chains in normal adult human. *Journal of the American Chemical Society*, **79**, 4682–4686.
- Ribeiro, F., Alves, A.J., Duarte, J.A. & Oliveira, J. (2010) Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *International journal of cardiology*, **141**, 214–21
- Richardson, R.W. (1994) Handbook of Nonpathologic Variations in Human Blood Constituents.
- Rodgers, G.P., Schechter, a N., Noguchi, C.T., Klein, H.G., Nienhuis, a W. & Bonner, R.F. (1984a) Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. *The New England journal of medicine*, **311**, 1534–1538.
- Rodgers, G.P., Schechter, A.N., Noguchi, C.T., Klein, H.G., Nienhuis, A.W. & Bonner, R.F. (1984b) Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. *New England Journal of Medicine*, **311**, 1534–1538.
- Romain, A.-J., Brun, J.-F., Varlet-Marie, E. & Raynaud de Mauverger, E. (2011) Effects of exercise training on blood rheology: a meta-analysis. *Clinical hemorheology and microcirculation*, **49**, 199–205
- Rossi, M., Carpi, A., Di Maria, C., Galetta, F. & Santoro, G. (2006) Spectral analysis of laser Doppler skin blood flow oscillations in human essential arterial hypertension.

- Microvascular Research*, **72**, 34–41.
- 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**, 650–2
- Rother, R.P., Bell, L., Hillmen, P. & Gladwin, M.T. (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*, **293**, 1653–62
- Roustit, M. & Cracowski, J.-L. (2012) Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*, **19**, 47–64.
- Roustit, M. & Cracowski, J.-L. (2013) Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends in pharmacological Sciences*, **34**, 373–384.
- Rybicki, A.C. & Benjamin, L.J. (1998) Increased levels of endothelin-1 in plasma of sickle cell anemia patients. *Blood*, **92**, 2594–2596.
- Sacheck, J.M., Cannon, J.G., Hamada, K., Vannier, E., Blumberg, J.B. & Roubenoff, R. (2006) Age-related loss of associations between acute exercise-induced IL-6 and oxidative stress. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **291**,
- Safar, M., Balkau, B., Lange, C., Protogerou, A.D., Czernichow, S., Blacher, J., Levy, B. & Smulyan, H. (2013) Hypertension and Vascular Dynamics in Men and Women With Metabolic Syndrome. *J Am Coll Cardiol*, **62**, 12–19.
- Safar, M.E. & Struijker-Boudier, H. a. (2010) Cross-talk between macro- and microcirculation. *Acta Physiologica*, **198**, 417–430.
- Salgado, P., Melin, V., Contreras, D., Moreno, Y. & Mansilla, H. (2013) Fenton reaction driven by iron ligands. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **58**, 2096–2101.
- Sangkatumvong, S., Coates, T.D. & Khoo, M.C.K. (2008) Abnormal autonomic cardiac response to transient hypoxia in sickle cell anemia. *Physiological measurement*, **29**, 655.
- Sangkatumvong, S., Khoo, M.C., 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**, 474–481.
- Sanya, E.O., Soladoye, A., Olanrewaju, T.O., Kolo, P.M. & Durotoye, I. (2010) Cardiovascular autonomic reflex function in sickle cell anaemia patients. *he Nigerian postgraduate medical journal*, **17**, 266–269.
- Sassaroli, A. & Fantini, S. (2004) Comment on the modified Beer–Lambert law for scattering media. *Physics in Medicine and Biology*, **49**, N255.

- 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**, 237–43
- Schieber, M. & Chandel, N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*, **24**, R453–62
- Schmidt, J.A., Borgström, P., Firestone, G.P., von Wichert, P., Intaglietta, M. & Fronek, A. (1993) Periodic hemodynamics (flow motion) in peripheral arterial occlusive disease. *Journal of vascular surgery*, **18**, 207–215.
- Schwarz, Droogmans & Nilius (1992) Shear stress induced membrane currents and calcium transients in human vascular endothelial cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, **421**, 394–396.
- Serjeant, G.R. (2001) The emerging understanding of sickle cell disease. *British journal of haematology*, **112**, 3–18 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167776>.
- Setty, B.Y., Stuart, M.J., Dampier, C., Brodecki, D. & Allen, J.L. (2003) Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *The Lancet*, **362**, 1450–1455.
- Shapiro, S.A., Stansberry, K.B., Hill, M.A., Meyer, M.D., McNitt, P.M., Bhatt, B.A. & Vinik, A.I. (1998) Normal blood flow response and vasomotion in the diabetic Charcot foot. *Journal of diabetes and its complications*, **12**, 147–153.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1946) The life span of the human red blood cell. *Journal of Biological Chemistry*, **166**, 627–636.
- Shephard, R.J., Gannon, G., Hay, J.B. & Shek, P.N. (2000) Adhesion molecule expression in acute and chronic exercise. *Critical reviews in immunology*, **20**, 245–66
- Shepro, D. & Morel, N.M. (1993) Pericyte physiology. *The FASEB Journal*, **7**, 1031–1038.
- Sherwood, L., Klandorf, H. & Yancey, P. (2016) Physiologie animale. De Boeck Supérieur.
- Shi, P.A., Manwani, D., Olowokure, O. & Nandi, V. (2014) Serial assessment of laser Doppler flow during acute pain crises in sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **53**, 277–282.
- Silva, D.G., Belini Junior, E., Torres Lde, S., Ricci Junior, O., Lobo Cde, C., Bonini-Domingos, C.R. & de Almeida, E.A. (2011) Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood cells, molecules & diseases*, **47**, 23–28.
- Simmonds, M., Dettrich, J. & Connes, P. (2014) Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology*, **51**, 121–134.

- Sinoway, L., McLaughlin, D.P., Wilson, J., Shenberger, J., Musch, T.I., Minotti, J.R. & Zelis, R. (1986) The effects of systemic dynamic leg exercise training on maximal blood-flow to the untrained forearm. *Clinical research*, **34**, 344.
- Sinoway, L.I., Musch, T.I., Minotti, J.R. & Zelis (1986) Enhanced maximal metabolic vasodilatation in the dominant forearms of tennis players. *Journal of Applied Physiology*, **61**, 673–678.
- Sinoway, L.I., Shenberger, Wilson, McLaughlin, Musch & Zelis (1987) A 30-day forearm work protocol increases maximal forearm blood flow. *Journal of Applied Physiology*, **62**, 1063–1067.
- Smith, D.B., Janmey, P.A., Sherwood, J.A., Howard, R.J. & Lind, S.E. (1988) Decreased plasma gelsolin levels in patients with *Plasmodium falciparum* malaria: a consequence of hemolysis? *Blood*, **72**, 214–8
- Smith, J.A., Martin, D.T., Telford, R.D. & Ballas, S.K. (1999) Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes. *The American journal of physiology*, **276**, H2188–93
- Sokolnicki, L.A., Khosla, S. & Charkoudian, N. (2007) Effects of testosterone and estradiol on cutaneous vasodilation during local warming in older men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **293**, E1426–E1429.
- Soldin, S.J., Brugnara, C. & Wong, E.C. (2003) Pediatric reference ranges. *Amer. Assoc. for Clinical Chemistry*.
- 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**, 1584–90 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371854>.
- Solovey, A.A., Solovey, A.N., Harkness, J. & Hebbel, R.P. (2001) Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood*, **97**, 1937–41
- Sothorn, M.S. Obesity prevention in children: physical activity and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **20**, 704–8
- Sports., M. de la santé et des (2010) Catalogue des activités de rééducation-réadaptation. Version 3b-2010.
- Stansberry, K.B., Shapiro, S.A., Hill, M.A., McNitt, P.M., Meyer, M.D. & Vinik, A.I. (1996) Impaired peripheral vasomotion in diabetes. *Diabetes care*. *Diabetes Care*, **19**, 715–721.
- Steinberg, M., Forgeet, B., Higgs, D. & Weathrall, D. (2009) Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and clinical Management Second Edi. Cambridge University Press, New York.

- Steinberg, M.H., Hsu, H., Nagel, R.L., Milner, P.F., Adams, J.G., Benjamin, L., Fryd, S., Gillette, P., Gilman, J. & Josifovska, O. (1995) Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. *American journal of hematology*, **48**, 175–81 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532353>.
- Steinberg, M.H., Lu, Z.H., Barton, F.B., Terrin, M.L., Charache, S. & Dover, G.J. (1997) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. *Blood*, **89**, 1078–1088.
- Stephenson, L. A., & Kolka, M.A. (1985) Menstrual cycle phase and time of day alter reference signal controlling arm blood flow and sweating. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **249**, R186–R191.
- Strohacker, K., Wing, R.R. & McCaffery, J.M. (2013) Contributions of body mass index and exercise habits on inflammatory markers: a cohort study of middle-aged adults living in the USA. *BMJ open*, **3**.
- Stuart, M.J. & Nagel, R.L. (2004) Seminar Sickle-cell disease.
- Styles, L.A., Hoppe, C., Klitz, W., Vichinsky, E., Lubin, B. & Trachtenberg, E. (2000) Evidence for HLA-related susceptibility for stroke in children with sickle cell disease. *Blood*, **95**, 3562–3567.
- Suhr, F., Brenig, J., Müller, R., Behrens, H., Bloch, W. & Grau, M. (2012) Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. *PloS one*, **7**
- Switzer, J.A., Hess, D.C., Nichols, F.T. & Adams, R.J. (2006) Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *The Lancet*, **5**, 501–512.
- Sydenstricker, Mulherin & Houseal (1923) sickle cell anemia report of two cases in children, with necropsy in one case. *Am J. Dis. Child.*, **26**, 132–54.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H. & Radi, R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 662–680
- Szocs, K. (2004) Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *General physiology and biophysics*, **23**, 265–95
- Tarer, V., Etienne-Julan, M., Diara, J.P., Belloy, M.S., Mukizi-Mukaza, M., Elion, J. & Romana, M. (2006) Sickle cell anemia in Guadeloupean children: pattern and prevalence of acute clinical events. *European journal of haematology*, **76**, 193–199.
- Teixeira, R.S., Terse-Ramos, R., Ferreira, T.A., Machado, V.R., Perdiz, M.I., Lyra, I.M. & Ladeia, A.M. (2017) Associations between endothelial dysfunction and clinical and

- laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. *PLoS ONE*, **12**,
- Tessier, F., & Marconnet, P. (1995) Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & sports*, **10**, 1–13.
- Tharaux, P., Girot, R., Kanfer, A., Dussaule, J., Gaitz, J. & Tribout L, et al. (2002) Cutaneous microvascular blood flow and reactivity in patients with homozygous sickle cell anaemia. *Eur J Haematol*, **68**, 327–31.
- Thijssen, D., Maiorana, A., O’Driscoll, G., Cable, N., Hopman, M. & Green, D. (2010) Impact of inactivity and exercise on the vasculature in humans. *Eur J Appl Physiol*, **108**, 845–875.
- Thurston, G.B. (1972) Viscoelasticity of human blood. *Biophysical journal*, **12**, 1205–1217.
- Tinken, T.M., Thijssen, D.H., Black, M.A., Cable, N.T. & Green, D.J. (2008) Time course of change in vasodilator function and capacity in response to exercise training in humans. *The Journal of physiology*, **586**, 5003–5012.
- Tinken, T.M., Thijssen, D.H.J., Hopkins, N., Dawson, E. a., Cable, N.T. & Green, D.J. (2010) Shear stress mediates endothelial adaptations to exercise training in humans. *Hypertension*, **55**, 312–318.
- Tinti, G., Somera, R., Valente, F.M. & Domingos, C.R.B. (2010) Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report. *Genetics and molecular research : GMR*, **9**, 360–4
- Topper & Gimbrone (1999) Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Molecular medicine today*, **5**, 40–46.
- Tordi, N., Mourot, L., Colin, E. & Regnard, J. (2010) Intermittent versus constant aerobic exercise: effects on arterial stiffness. *European Journal of Applied Physiology*, **108**, 801–809.
- Torres Lde, S., da Silva, D.G., Belini Junior, E., de Almeida, E.A., Lobo, C.L., Cancado, R.D., Ruiz, M.A. & Bonini-Domingos, C.R. (2012) The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*, **34**, 421–425.
- Tracey, K. (2002) The inflammatory reflex. *Nature*, **420**, 853–859.
- Tripette, J., Alexy, T., Hardy-Dessources, M.-D., Mougénel, 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

- Tsai, A.G., Acero, C., Nance, P.R., Cabrales, P., Frangos, J.A., Buerk, D.G. & Intaglietta, M. (2005) Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **288**, H1730–H1739.
- Tsai, A.G. & Intaglietta, M. (1993) Evidence of flowmotion induced changes in local tissue oxygenation. *International journal of microcirculation, clinical and experimental*, **12**, 75–88.
- 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*, **99**, 3047–3051.
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B. & Dejana, E. (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, **437**, 426.
- Uda, M., Galanello, R., Sanna, S., Lettre, G., Sankaran, V.G., Chen, W. & Piras, M.G. (2008) Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 1620–1625.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J.P., Nishida, K., Murphy, T.J., Alexander, R.W., Nerem, R.M. & Harrison, D.G. (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *The American journal of physiology*, **269**, C1371–8
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **39**, 44–84
- Vandepitte, J.M., Zuelzer, W.W., Neel, J. V & Colaert, J. (1955) Evidence concerning the inadequacy of mutation as an explanation of the frequency of the sickle cell gene in the Belgian Congo. *Blood*, **10**, 341–50
- Vappou, J., Luo, J., Okajima, K., Di Tullio, M. & Konofagou, E. (2011) Tonometry., Aortic pulse wave velocity measured by pulse wave imaging (PWI): A comparison with applanation. *Artery research*, **5**, 65–71.
- Velez-Roa, S., Ciarka, A., Najem, B., Vachiery, J., Naeije, R. & van de Borne, P. (2004) Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. *Circulation*, **110**, 1308–1312.
- Verma, S., Buchanan, M. R., & Anderson, T.J. (2003) Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*, **108**, 2054–2059.
- W., L. & LevyD (2003) Special Review: Clinical Cardiology: New Frontiers Arterial and

- Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises. *Circulation*, **107**, 139–146.
- Walther, G., Nottin, S., Karpoff, L., Pérez-Martin, A., Dauzat, M. & Obert, P. (2008) Flow-mediated dilation and exercise-induced hyperaemia in highly trained athletes: comparison of the upper and lower limb vasculature. *Acta Physiologica*, **193**, 139–150.
- Waltz, X. & Connes, P. (2014) Pathophysiology and physical activity in patients with sickle cell anemia. *Movement and Sports Sciences - Science et Motricite*, **83**, 41–47
- Waltz, X., Pichon, A., Lemonne, N., Mougenel, D., Lalanne-Mistrih, M.-L., Lamarre, Y., Tarer, V., Tressières, B., Etienne-Julan, M., Hardy-Dessources, M.-D., Hue, O. & Connes, P. (2012a) Normal Muscle Oxygen Consumption and Fatigability in Sickle Cell Patients Despite Reduced Microvascular Oxygenation and Hemorheological Abnormalities. *PLoS ONE*, **7**
- Waltz, X., Pichon, A., Mougenel, D., Lemonne, N., Lalanne-Mistrih, M.-L., Sinnapah, S., Tarer, V., Tressières, 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
- Waltz, X., Pichon, A., Mougenel, D., Lemonne, N., Lalanne-Mistrih, M.L., Sinnapah, S., Tarer, V., Tressières, B., Lamarre, Y., Etienne-Julan, M., Hue, O., Hardy-Dessources, M.D. & Connes, P. (2012c) Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients. *American Journal of Hematology*, **87**, 1070–1073.
- Waltz, X., Romana, M., Lalanne-Mistrih, M.-L., Machado, R.F., Lamarre, Y., Tarer, V., Hardy-Dessources, M.-D., Tressières, B., Divialle-Doumido, L., Petras, M., Maillard, F., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2013) Hematologic and hemorheological determinants of resting and exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease. *Haematologica*, **98**, 1039–1044
- Watson, T.A., Callister, R., Taylor, R.D., Sibbritt, D.W., MacDonald-Wicks, L.K. & Garg, M.L. (2005) Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, **37**, 63–71
- Watts, K., Beye, P., Siafarikas, A., Davis, E. a., Jones, T.W., O’Driscoll, G. & Green, D.J. (2004) Exercise training normalizes vascular dysfunction and improves central adiposity in obese adolescents. *Journal of the American College of Cardiology*, **43**, 1823–1827.

- Welk, Wareham & Rennie (1998) The assessment of physical activity in individuals and populations: why try to be more precise about how physical activity is assessed? *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, **22**, 30–8.
- Williams, T.N. & Obaro, S.K. (2011) Sick cell disease and malaria morbidity: a tale with two tails. *Trends in parasitology*, **27**, 315–20
- Wilmore, J.H., Costill, D.L. & Kenney, L. (2009) Physiologie du sport et de l'exercice De Boeck Supérieur.
- Wilmore, J.H., Costill, D.L. & Kenney, L. (2017) Physiologie du sport et de l'exercice De Boeck Supérieur.
- Wilson, S.B., Jennings, P.E. & Belch, J.J.F. (1992) Detection of microvascular impairment in type I diabetics by laser Doppler flowmetry. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, **12**, 195–208.
- Witko-Sarsat, V., Gausson, V. & Descamps-Latscha, B. (2003) Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int Suppl*, 11–14.
- Witt, I. & Trendelenburg, C. (1982) Gemeinsame Studie zur Erstellung von Richtwerten für klinisch-chemische Kenngrößen im Kindesalter. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **20**, 235–242.
- Witztum, J.L. (1997) Immunological response to oxidized LDL. *Atherosclerosis*, **131** Suppl, S9–11
- Wood, K.C., Hebbel, R.P., Lefer, D.J. & Granger, D.N. (2006) Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction. *Free radical biology & medicine*, **40**, 1443–53
- 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**, 1506–28
- Wray, S., Cope, M., Delpy, D.T., Wyatt, J.S. & Reynolds, E.O.R. (1988) Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and haemoglobin for the non-invasive monitoring of cerebral oxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **933**, 184–192.
- Wrong, B.J. & Fieger, S.M. (2010) Transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV-1) channels contribute to cutaneous thermal hyperaemia in humans. *The Journal of physiology*, **588**, 4317–4326.
- Yalcin, O., Erman, A., Muratli, S., Bor-Kucukatay, M. & Baskurt, O.K. (2003) Time course of hemorheological alterations after heavy anaerobic exercise in untrained human subjects. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, **94**, 997–1002

- Yemisci, Gursoy-Ozdemir, Vural, Can, Topalkara & T., D. (2009) Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med*, **15**, 1031–7.
- Zhang, J., Johnson, P. & Popel, A. (2009) Effects of erythrocyte deformability and aggregation on the cell free layer and apparent viscosity of microscopic blood flows. *Microvascular Research*, **77**, 265–272.
- Zoppini, G., Targher, G., Zamboni, C., Venturi, C., Cacciatori, V., Moghetti, P. & Muggeo, M. (2006) Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, **16**, 543–9.

F

PUBLICATIONS

Publication 1:

Micro- and macrovascular function in children with sickle cell anaemia and sickle cell haemoglobin C disease.

Möckesch B, Charlot K, Jumet S, Romana M, Divialle-Doumbo L, Hardy-Dessources MD, Petras M, Tressieres B, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Connes P and Antoine-Jonville S.

Blood Cells Mol Dis. 2017;64:23-29.

Publication 2:

Association between oxidative stress and vascular reactivity in children with sickle cell anaemia and sickle haemoglobin C disease

Möckesch B, Connes P, Charlot K, Skinner S, Hardy-Dessources MD, Romana M, Jumet S, Petras M, Divialle-Doumbo L, Martin C, Tressieres B, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Antoine-Jonville S and Pialoux V.

Br J Haematol. 2017;178 (3): 468-475.

Publications en coauteur :

Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: Blood viscosity or microvascular dysfunction?

Charlot K, Romana M, Moeckesch B, Jumet S, Waltz X, Divialle-Doumbo L, Hardy-Dessources MD, Petras M, Tressieres B, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Antoine-Jonville S and Connes P.

Blood Cells Mol Dis. 2016;56:41-5.

Physical activity level is not a determinant of autonomic nervous system activity and clinical severity in children/adolescents with sickle cell anemia: A pilot study.

Charlot K, Moeckesch B, Jumet S, Romana M, Waltz X, Divialle-Doumido L, Hardy-Dessources MD, Petras M, Tressieres B, Pichon A, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Antoine-Jonville S and Connes P.

Pediatr Blood Cancer. 2015; 62:1962-7.

Cerebral and muscle microvascular oxygenation in children with sickle cell disease: Influence of hematology, hemorheology and vasomotion.

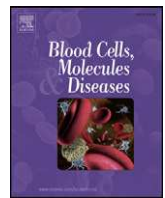
Charlot K, Antoine-Jonville S, Moeckesch B, Jumet S, Romana M, Waltz X, Divialle-Doumido L, Hardy-Dessources MD, Petras M, Tressieres B, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M and Connes P.

Blood Cells Mol Dis. 2017; 65:23-28.

Effects of hydroxyurea on blood rheology in sickle cell anemia : A two-years follow-up study

Lemonne N, Möckesch B, Charlot K, Garnier Y, Waltz X, Lamarre Y, Antoine-Jonville S, Etienne-Julan M, Hardey-Dessources MD, Romana M and Connes P.

Clinical Hemorheology and Microcirculation 2017



Micro- and macrovascular function in children with sickle cell anaemia and sickle cell haemoglobin C disease



Berenike Möckesch^{a,b,c}, Keyne Charlot^{a,b,c}, Stéphane Jumet^a, Marc Romana^{b,c}, Lydia Divialle-Doumbo^d, Marie-Dominique Hardy-Dessources^{b,c}, Marie Petras^d, Benoît Tressières^e, Vanessa Tarer^d, Olivier Hue^a, Maryse Etienne-Julan^d, Philippe Connes^{b,c,f,g,1}, Sophie Antoine-Jonville^{a,*,1}

^a Laboratory ACTES (EA 3596), French West Indies University, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^b UMR Inserm U1134, French West Indies University, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^c Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (LABEX GR-Ex), PRES Sorbonne, Paris, France

^d Sickle Cell Center, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^e Centre Investigation Clinique Antilles Guyane, 1424 Inserm, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^f Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

^g Laboratory LIBM EA7424, Team "Vascular Biology and Red Blood Cell", University of Lyon 1, France

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 14 November 2016

Revised 2 February 2017

Accepted 3 February 2017

Available online 4 February 2017

Keywords:

Vascular function

Sickle cell anaemia

Sickle cell haemoglobin C disease

Physical activity

ABSTRACT

It is unclear whether vascular function is affected similarly in children with sickle cell anaemia (SS) and children with sickle haemoglobin C (SC) disease. Therefore, we compared micro and macrovascular functions in healthy (AA) children, children with SS and SC disease, and assessed their association with physical activity. Participants (24 SS, 22 SC and 16 AA), were compared in terms of 1) thermal hyperaemic response (finger pad warming to 42 °C) measured by Laser Doppler techniques, 2) arterial stiffness determined by pulse wave velocity, 3) daily energy expenditure related to moderate and intense physical activities estimated by questionnaire and 4) fitness level, evaluated by the six-minute walk test. Response to heating differed between SS, SC and controls. Peripheral microvascular reactivity was lower and pulse wave velocity higher in SS compared to AA. SC had blunted microvascular reactivity in response to heating compared to AA but pulse wave velocity was not different within the two groups. Physical activity and fitness levels were markedly lower in sickle cell patients compared to healthy controls but no association was observed with vascular function. Microvasodilatory reserve is decreased in both SS and SC patients but only SS patients were also characterised by impaired macrovascular function.

© 2017 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Sickle cell disease (SCD) is a hereditary haemoglobinopathy characterised by red blood cell abnormalities (*i.e.*, decreased deformability and increased fragility) leading to chronic anaemia and vascular occlusions [1]. The term SCD encompasses a group of symptomatic disorders defined by the presence of predominantly haemoglobin S, or haemoglobin S along with other variants. The two most common forms are homozygous sickle cell disease (SS) and sickle haemoglobin C (SC) disease. SS was previously mainly considered as a haemorheological disease [2] but growing evidence suggest also the involvement of vascular dysfunction in the pathophysiology of this disease [3–5]. However, most of previous studies on vascular function in sickle cell patients concentrated on adults [3,6–8]. Whether vascular function is impaired from childhood on and which vascular

compartments (*i.e.* micro- and/or macrocirculation) are primary affected, is still not clear, particularly in SC disease.

Micro- and macrocirculatory functions are designed to operate in a closely integrated manner. Coordination and regulated interplay throughout the vascular system are indispensable to maintain instantaneous adjustments [9]. However, haemodynamic parameters differ in micro- and macrocirculation [10]. Furthermore micro- and macrovascular systems distinguish in vascular structure, function and control mechanisms [10]. Thus, vascular function impairments may have different effects according to the circulatory level/vascular compartment affected. Arterial stiffness, known as an indicator for macrovascular function, has been analysed in sickle cell adults [11,12] but whether arterial hardening also occurs in children and whether it is associated with microvascular dysfunction have never been assessed, especially in SC disease.

Physical activity is known to improve vascular function in healthy population and in different cardio-metabolic diseases [13,14]. The mechanisms involved are not yet well understood but regular aerobic exercise is supposed to stimulate nitric oxide (NO) production, to

* Corresponding author.

E-mail address: s_antoine@ymail.com (S. Antoine-Jonville).

¹ Equivalent position.

decrease oxidative stress and thereby enhances NO-bioavailability and arterial reactivity [13]. Although acute intense exercise may increase the risk of vaso-occlusive crises in sickle cell patients [15], a moderate submaximal exercise is generally well tolerated and do not extend risks of acute complications in these patients [16,17]. Studies performed with transgenic sickle mice further demonstrated an improvement of anti-oxidant defence and endothelial function as well as blood rheology by regular physical activity [18,19]. Whether regular physical activity in sickle cell patients can enhance vascular function remains unknown.

The primary aim of the present study was to determine and to compare micro- and macrovascular functions between children/adolescents with SS, SC disease and healthy children/adolescents. The second objective was to clarify whether the degree of vascular dysfunction in children/adolescents with sickle cell disease could be related to the level of regular physical activity/physical fitness.

2. Materials and methods

2.1. Study population

Sixty-two children/adolescents from 10 to 16 years old took part in the study, which was conducted in accordance to the Declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France, registration number: 2009-A00211-56/2013, SAPOTILLE/HYPOSNAD project). This study included 24 SS patients (10 girls, 14 boys), 22 SC patients (13 girls, 9 boys) and 16 healthy control children with normal haemoglobin (AA; 8 girls, 8 boys), matched for ethnic origin (African Guadeloupians). Children/adolescents with SCD were recruited from the Sickle Cell Unit of the Academic Hospital of Pointe-à-Pitre (Guadeloupe) where they are regularly followed since birth. They were at steady state at the time of the study (i.e., no blood transfusion within the last three months, absence of acute episodes of infection, vaso-occlusive crisis or acute chest syndrome at least one month before inclusion in the study). Four patients were under hydroxyurea treatment for more than six months (dose ~20 mg/kg per day).

2.2. Design of the study

When all annual examinations were done and blood samples were taken, each child answered an appropriate questionnaire concerning their daily physical activity. Then, all children were equipped and remained on a comfortable bed in lying position in a quiet room (room temperature fixed at ~24 °C, skin temperature ~33 °C). After a 10-min baseline recording, local thermal hyperaemia was conducted for 40 min. Afterwards pulse-wave velocity (PWV) was measured. Children with SCD also performed a 6-minute walk test (6MWT) under medical surveillance.

2.3. Haematological and blood viscosity measurements

Venous blood was sampled in sitting position from the antecubital vein in children with haemoglobin SS and SC. Haematological and haemorheological parameters were measured within 1–2 h after sampling and after full reoxygenation of blood for 10–15 min as recommended [20]. Haemolytic indicators like serum lactate dehydrogenase concentration, bilirubin levels, reticulocyte counts (expressed as a percentage) and aspartate aminotransferase content were determined by standard biochemical methods. The haemolytic component value was derived from haemolytic markers (bilirubin, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and reticulocytes) by principal component analysis [21]. Foetal haemoglobin level was quantified using cation-exchange high performance liquid chromatography (VARIANTTM, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and haematological data were obtained using an automated cell counter (Beckman Coulter MAXM AL, FL, USA). Blood viscosity was measured at native haematocrit and at room

temperature (25 °C) using a cone-plate viscometer (Brookfield DVII+ with CPE40 spindle, Brookfield Engineering Labs. Natick, MA, USA) at 225 s^{-1} . Measurements were performed according to the recent international guidelines for haemorheological laboratory techniques [20].

2.4. Assessment of microvascular function by heat-mediated vasodilation

In all children, peripheral microcirculatory cutaneous blood flow and microvascular response to local heating were evaluated using a Laser Doppler flowmeter (Periflux System 5000, Perimed, Järfälla, Sweden) and its associated software Perisoft (Perimed), which enables continuous skin blood flow recording (mV). A combined laser Doppler and thermostatic metallic probe (PR457) was attached to the distal pad of the middle finger of the left hand. After a 10-min baseline recording, skin temperature was raised to 42 °C (within 5 s) and the microvascular response to local heating was measured for 40 min. Local cutaneous heating results in a biphasic increase in blood flow: a rapid increase (initial peak) related to axon reflex followed by a nadir and a prolonged plateau mainly NO-dependent [22,23]. Taking into account any individual fluctuations of skin blood flow (due to blood pressure changes), laser Doppler blood flow (perfusion unit, recorded in mV) was divided by the individual mean arterial pressure (MAP). In this way, baseline blood flow, initial peak and the plateau were expressed as cutaneous vascular conductance (CVC, mV/mm Hg) [24]. Reactive hyperaemia was calculated as percentage change in flow during thermal stress (peak and plateau) compared with baseline as previously recommended [22,23]. Increase of skin blood flow up to peak and up to plateau served as indicators for microvascular function [22,23].

2.5. Non-invasive assessment of arterial stiffness by pulse wave velocity

Arterial stiffness, assessed by PWV, can be considered as an indicator of macrovascular function [25]. In this study, we measured PWV (m/s) from the carotid to radial (CR-PWV) arteries with a non-invasive automated device (SphygmoCor System, Colson, Sydney, Australia) using an arterial tonometer for recording pressure waveforms and a 3-lead electrocardiogram. PWV is defined as the distance between the measuring sites divided by the transit time (in seconds) of the related pulse waves. Transit time is defined as the difference between the delay of the distal pulse wave to the R wave of the ECG and the delay of the proximal pulse wave to R wave of the ECG. The pulse wave delay can be determined by calculating the time elapsed from the peak of the R wave and the foot of the pressure pulse wave.

The device used here is highly reproducible (inter- and intra-operator) in both healthy and diseased populations [26]. Measurements were obtained by the same experienced operator during the whole study and repeated two times for each site of measurement, but only the mean value was retained. Additionally we recorded heart rate (bpm), resting diastolic blood pressure (DBP, mm Hg), resting systolic blood pressure (SBP, mm Hg), pulse pressure (Pulse pressure = SBP-DBP (in mm Hg) and mean arterial pressure ($\text{MAP} = (2 * \text{DBP} + \text{SBP}) / 3$).

2.6. Physical activity questionnaire for children/adolescents

Each child answered the International Physical Activity Questionnaire adapted for adolescents [27]. The questionnaire involved physical activities related to the mode of transportation to and from school (walking, bicycling or motor vehicle), physical activities inside and outside school settings, as well as leisure-time activities to estimate the level of physical activity energy expenditure (PAEE). Therefore each activity has been associated with a number of metabolic equivalent, which was then multiplied by the corresponding activity duration (min). PAEE represents the sum of all moderate-to-intense physical activities. Afterwards, PAEE has been adjusted to weight and resting metabolic rate

according to Buchowski et al. [28]. Finally, PAEE was expressed as kcal/day.

2.7. Six-minute walk test (6MWT)

Physical fitness was measured in all children with SCD by the 6MWT, which was performed according to the guidelines set by the American Thoracic Society [29]. The 6MWT is not correlated with maximal exercise capacity in children with SCD and young adults but reflects the functional exercise level for daily physical activities since most activities of daily living are performed at submaximal levels of exertion [30]. During 6 min, the participant has to walk as fast as possible, without running. Then the distance walked was noted and the percentage of predicted distance was calculated by Geigers' standardised formula [31] according to age, sex and height, as previously done [32]. The 6MWT was considered as normal if the performance was >80% of the age-standardised predicted value and abnormal otherwise [33].

2.8. Statistics

The results are presented as mean $\pm$ standard deviation or median (25th and 75th percentiles). After testing the normality and homogeneity of variance, we compared anthropometric, physiological, microvascular, macrovascular and physical activity parameters between the three groups using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post-hoc test. Kruskal Wallis ANOVA was applied for non-parametric parameters (body mass index, MAP, PAEE, percentage blood flow increase up to peak and up to plateau). Haemorheological and biological parameters were measured in SS and SC patients only and compared between the two patient groups using unpaired Student *t*-test or Mann-Whitney comparison test. Parametric or non-parametric correlation tests (Pearson or Spearman, respectively) were performed in each group (AA, SC and SS) in order to test the associations between micro- and macrovascular function and to identify whether physical activity and vascular function parameters were associated. The significance level was defined as $P < 0.05$. Analyses were conducted using SPSS (v. 20, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL) and Statistica (Statistica, v5.5, Statsoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Population characteristics

A total of 62 children with similar anthropometric characteristics were enrolled in the study (Table 1). SBP, DBP and MAP did not differ significantly between patients and controls whereas pulse pressure was significantly higher in SS patients compared to SC patients ($P = 0.013$) but not different to controls (Table 1). As expected, haemoglobin, haematocrit levels and blood viscosity were significantly lower in SS than in SC patients ($P < 0.001$, Table 1). Haemolytic parameters (lactate dehydrogenase, bilirubin, reticulocytes, aspartate aminotransferase, haemolytic index) and foetal haemoglobin were significantly higher in SS compared to SC patients ($P < 0.001$, Table 1). In both groups, no correlation was observed between vascular function, physical activity parameters and haemolytic parameters (data not shown).

3.2. Microvascular function

All data are reported in Table 2 and Fig. 1. Baseline blood flow was significantly higher in SS than in SC ($P < 0.05$) and healthy ($P < 0.01$) children. No association was found between baseline blood flow and haematocrit level in SS and SC group. In response to local heating, peak and plateau blood flow were not different between the three groups. However, when expressed as a percentage (Fig. 1), the increase of skin blood flow up to peak and plateau were higher in controls than in SS patients ($P = 0.004$ and $P = 0.001$, respectively). SC patients showed

Table 1
Population characteristics of children with SCD and children with haemoglobin A.

	AA (n = 16)	SC (n = 22)	SS (n = 24)
Boys/girls	8/8	9/13	14/10
Age (yrs.)	14.3 $\pm$ 3.0	15.1 $\pm$ 2.6	15 $\pm$ 2.4
Weight (kg)	50 $\pm$ 16	50 $\pm$ 13	49 $\pm$ 14
Height (cm)	162.0 $\pm$ 0.1	160.0 $\pm$ 0.1	162.0 $\pm$ 0.1
Body mass index (kg/m ²)	19.8 (15.8; 21.2)	18.8 (17.6; 20.8)	17.8 (16.0; 20.0)
SBP (mm Hg)	114 $\pm$ 9	112 $\pm$ 14	115 $\pm$ 8
DBP (mm Hg)	57 $\pm$ 6	61 $\pm$ 9	56 $\pm$ 8
MAP (mm Hg)	74.2 (70.6; 81.3)	75.0 (69.5; 82.9)	74.7 (71.8; 79.5)
PP (mm Hg)	57 $\pm$ 9	51 $\pm$ 10	59 $\pm$ 12 [#]
Heart rate (beats/min)	77 $\pm$ 12	76 $\pm$ 10	84 $\pm$ 12 [#]
Haemoglobin (g/dl)	–	11.5 $\pm$ 0.8	8.4 $\pm$ 1.2 ^{###}
Haematocrit (%)	–	33.0 $\pm$ 3.2	25.4 $\pm$ 3.8 ^{###}
Blood viscosity (mPa·s)	–	6.0 $\pm$ 1.0	4.8 $\pm$ 0.8 ^{###}
Lactate dehydrogenase (IU/L)	–	293 $\pm$ 85	546 $\pm$ 172 ^{###}
Foetal haemoglobin (%)	–	2.3 (1.4; 3.6)	6.8 (3.6; 10.3) ^{###}
Bilirubin	–	20.5 (14.0; 32.0)	44.0 (31.5; 78.5) ^{###}
Reticulocytes (%)	–	2.9 $\pm$ 1.1	9.9 $\pm$ 4.3 ^{###}
Haemolytic index (a.u.)	–	−0.72 $\pm$ 0.35	0.69 $\pm$ 0.93 ^{###}
Aspartate aminotransferase (IU/L)	–	23.8 $\pm$ 8.6	35.4 $\pm$ 13.7 ^{###}

Values are given as mean $\pm$ standard deviation and median (25th and 75th percentiles). AA, healthy controls; SS, children with homozygous sickle cell disease; SC, children with sickle cell haemoglobin-C disease; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial blood pressure; PP, pulse pressure. [#] $P < 0.05$ vs. AA; ^{*} $P < 0.05$ vs. SC; ^{##} $P < 0.01$ vs. SC; ^{###} $P < 0.001$ vs. SC. Blood sampling was not possible in controls because of ethical reasons. Haematological parameters of controls are available in Renoux et al. 2016 [67].

a blunted “peak” response compared to controls ($P = 0.03$) whereas flow increase up to plateau (expressed as a percentage) was not statistically different from controls ($P = 0.08$). No association was found in SS or SC patients between haematocrit or haemoglobin and vascular reactivity.

3.3. Macrovascular function

SS patients had statistically higher CR-PWV compared to controls ($P = 0.03$, Fig. 2) and no correlation was found between CR-PWV and blood viscosity or haematocrit level (data not shown). CR-PWV of SC patients was not different from AA or SS values. Macrovascular function (CR-PWV) was related to microvascular function (blood flow increase up to plateau) in children with SS ($r = -0.57$, $P = 0.04$) but not in children with SC ($P = 0.72$) and controls ($P = 0.81$).

3.4. Physical activity level and physical fitness

Daily energy expenditure related to moderate and intense physical activities (PAEE) was significantly lower in both sickle cell groups compared to controls ($P = 0.02$, Fig. 3A). 78% of patients (SS: 79%, SC: 77%) performed an abnormal 6MWT compared to the age-standardised predicted distance (Fig. 3B). However, there was no statistically significant

Table 2
Skin blood flow variations in response to local heating in children with sickle cell disease and control subjects.

	AA	SC	SS
Baseline flow (mV/mm Hg)	2.00 $\pm$ 1.50	2.22 $\pm$ 1.22	3.46 $\pm$ 1.62 ^{##}
Peak flow (mV/mm Hg)	4.82 $\pm$ 1.25	4.32 $\pm$ 1.65	4.68 $\pm$ 1.23
Plateau flow (mV/mm Hg)	4.43 $\pm$ 1.42	3.65 $\pm$ 1.58	3.72 $\pm$ 1.72

Values are given as mean $\pm$ standard deviation. AA, healthy controls; SS, children with homozygous sickle cell disease; SC, children with sickle cell haemoglobin-C disease. Baseline, Peak and Plateau blood flow are expressed as cutaneous vascular conductance. ^{*} $P < 0.05$ vs. AA; ^{##} $P < 0.01$ vs. AA; ^{###} $P < 0.001$ vs. AA; ^{*} $P < 0.05$ vs. SC, using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post-hoc test.

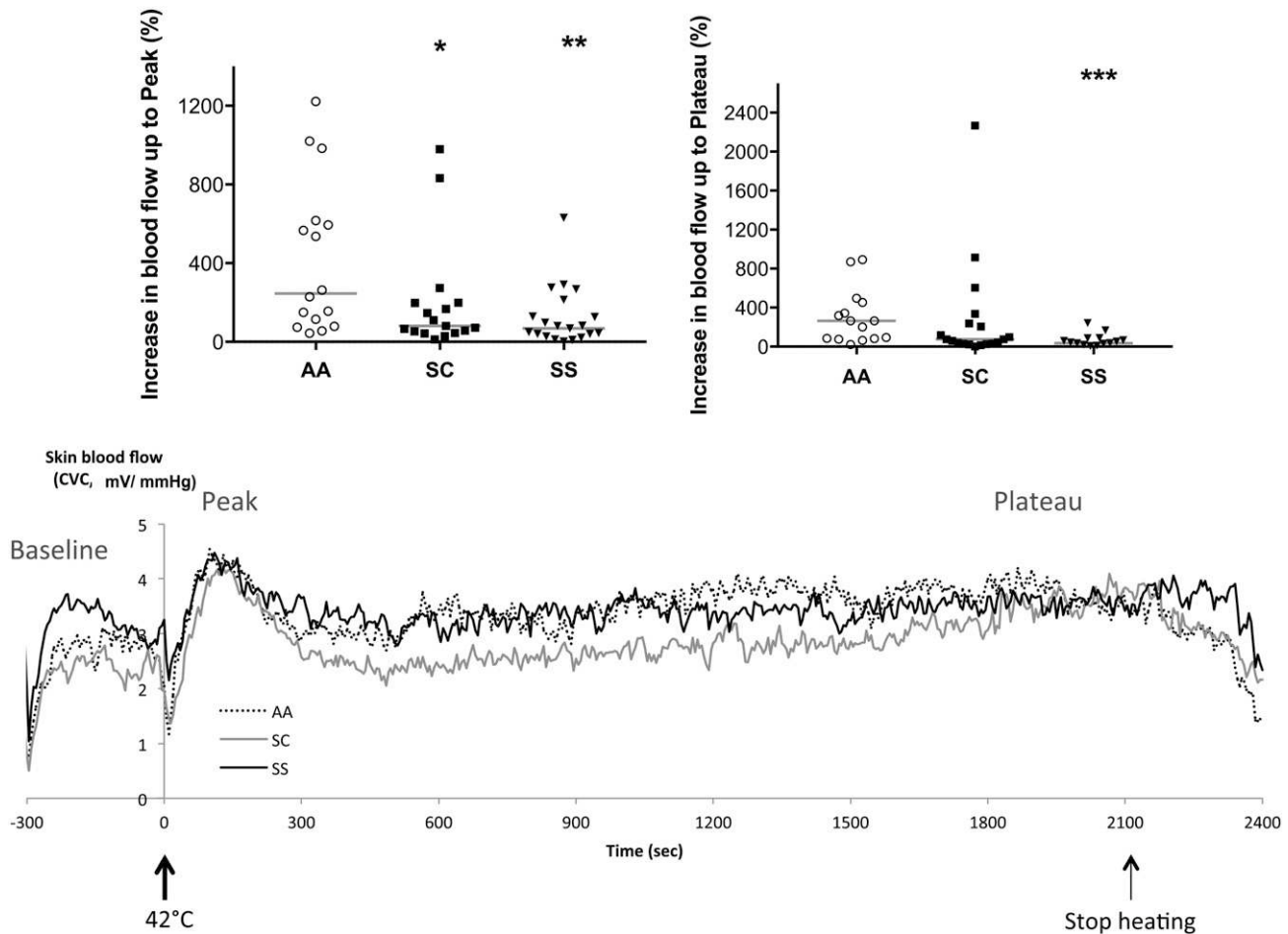


Fig. 1. Tracing of the mean skin blood flow (expressed as CVC in mV/mm Hg) in response to local heating to 42 °C in children with sickle cell SC, SS and control children. Above, percentage increase in skin blood flow from baseline up to peak and plateau in SS, SC patients and controls. Groups had been compared using Kruskal Wallis Anova. * $P < 0.05$ vs. AA; ** $P < 0.01$ vs. AA; *** $P < 0.001$ vs. AA.

difference in total walk distance between the two sickle groups. Statistical analysis revealed that neither micro- nor macrovascular function was correlated to PAEE or walked distance in each group (data not shown).

4. Discussion

The major findings are that SS patients present abnormal microvascular reactivity compared to AA. Both micro- and macrovascular

function appeared to be affected in children with homozygous sickle cell disease. Only neurological related microvascular response to heating (percentage of flow increase from baseline to peak) was decreased in SC compared to AA. Furthermore, physical activity and fitness levels were markedly affected in children with SCD but no association was observed with vascular parameters.

4.1. Vascular function

According to previous findings and to our results, baseline blood flow is apparently increased in SS. Severe anaemia and increased cardiac output participate to the rise in blood flow [6]. As a consequence, vascular wall shear stress is supposed to raise [6], promoting nitric oxide production to stimulate vasodilation in order to compensate for elevated shear rate, so as to finally normalize wall shear stress [6]. In this study, no correlation could be observed between haematocrit level and vascular reactivity or baseline blood flow. Our findings are in agreement with previous studies [36]. Anaemia leads to important cardiovascular adaptations in order to compensate the decrease in haematocrit, but vascular impairments in SCD may result from multiple sources [37]. However, as previously demonstrated, vascular function appears to be impaired in SS [38]. Decreased NO bioavailability, as a consequence of intravascular haemolysis and oxygen free radical production [38,39], are suspected to impair vascular function in SS patients [6,7,40]. This study illustrated that NO-dependent vasodilation (Plateau phase) as well as neurological control mechanisms (axon reflex) of peripheral microcirculation were altered in young SS patients. Vascular control is

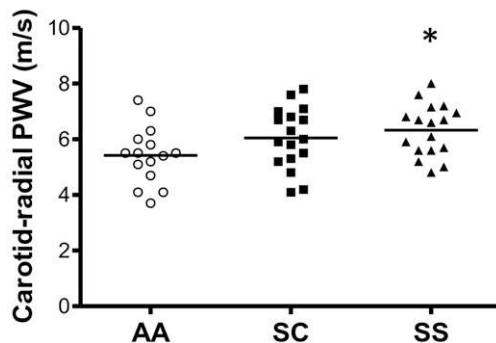


Fig. 2. Carotid to radial pulse wave velocity (PWV) measured by applanation tonometry in children with sickle haemoglobin C and haemoglobin S disease and control subjects (AA). Means were compared between the three groups using one-way analysis of variance followed by a Newman-Keuls post-hoc test. * $P < 0.05$ vs. AA.

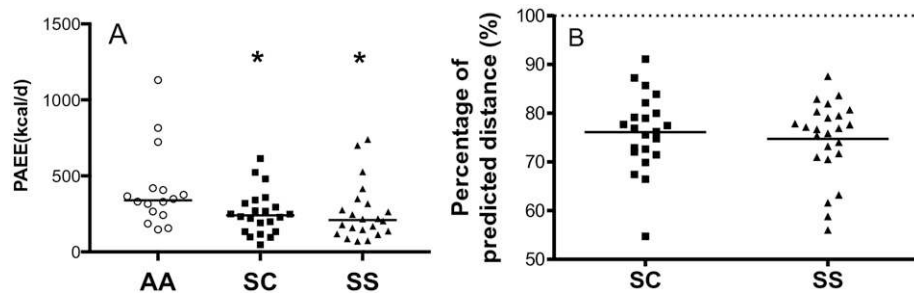


Fig. 3. (A) Comparison of physical activity energy expenditure (PAEE) between children with sickle cell SC and SS disease and in control (AA) subjects using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post-hoc test. ** $P < 0.01$ vs. AA. (B) percentage of the predicted six minute walk distance in children with sickle haemoglobin C disease and children with sickle cell anaemia. Both groups did not differ, obtained using unpaired Student *t*-test.

relevant for compensation of flow resistance. In this context, it is suspected that any increase in blood viscosity in SS patients with vascular dysfunction would lead to a rise in vascular resistance, which may probably slow blood flow and therefore could promote sickling and, thus, painful vaso-occlusive crises [41].

Chronic vasculopathy has been reported to affect also large blood vessels in SS and is supposed to rise risks for several complications such as stroke [5] and pulmonary hypertension [42]. Unlike previous work in sickle cell adults [11], our findings suggest an increase of peripheral arterial stiffness in SS compared to AA group. Although peripheral arterial stiffness cannot be considered as a principal indicator of arterial hardening compared to central arterial stiffness, our results indicate that SC and SS patients do not respond in a similar manner. Blood viscosity was significantly higher in SC than in SS. The impact of abnormal blood rheology on PWV has been poorly investigated and is debated [43–47]. Most of the patients with cardiovascular diseases, such as obesity, sleep apnea or atherosclerosis are characterised by both increased PWV and impaired blood rheology [48–50] but whether increased PWV is due to increased blood viscosity is unknown. In this study, correlations analyses do not suggest any association between haematocrit or blood viscosity and PWV but further works are needed to address this question in sickle cell disease, as well as in cardiovascular diseases in general. Despite the difference in PWV found between SS and AA, blood pressure parameters were similar in all the three groups. Decreased functionality in peripheral microcirculation and increased stiffness in larger peripheral arteries were significantly correlated in children with SS, suggesting that the same mechanisms could be involved and responsible for these dysfunctions.

SS and SC differ in several haemorheological, haemodynamic and clinical outcomes [51,52]. SC was previously considered as a less severe sickle cell syndrome than SS but nowadays several authors [34,53] suggest that these two genotypes should be rather seen as two distinct diseases. SS patients are usually exposed more frequently to vaso-occlusive crises and haemolysis, favouring possibly the development of chronic micro- and macrovascular dysfunctions, as suggested in the present study. In contrast, SC patients are usual more likely to develop retinopathy, osteonecrosis and thromboembolism which has been associated to the higher blood viscosity compared to SS [34,35]. Baseline blood flow and micro- and macrovascular function in children with SC tend to be normal, regarding statistical analysis, except for the initial response to heating which suggest, like in children with SS, blunted axonal reflex vasodilatory response [23]. Further studies are needed to address the exact mechanisms. Although SC patients are marked by blood hyperviscosity, it appears that NO-dependent vascular function and vessels elasticity are preserved which may enable normalization of vascular resistance and may reduce the risk of painful vaso-occlusive crises [54]. Children with sickle cell haemoglobin C disease had also a low pulse pressure, which is probably the consequence of well-functioned central and peripheral arterial elasticity [55]. This may lower the risks for cardiovascular co-morbidities [56]. Nevertheless the representation of blood flow increase up to plateau revealed large

intragroup difference. Some SC patients responded like controls whereas the majority reached values comparable to SS patients. Higher sample size would be necessary to clarify the reasons for this heterogeneity. Regarding the clinical charts, none of the participants of this study had signs of glomerulopathy or retinopathy. A next step would be to follow these children in a prospective way in order to test whether children with marked vascular dysfunction are more likely to develop vasculopathies than those with retained vascular reactivity.

4.2. Physical activity level and fitness

The time spent for moderate and intense physical activity was decreased in both SS and SC compared to healthy controls. In addition, the two groups exhibited a low performance at the 6MWT.

It has been reported that SS patients are characterised by greater resting energy expenditure than their healthy counterparts due to higher protein turnover and higher cardiac output [57,58]. In order to maintain total energy expenditure to normal level, physical activity energy expenditure is decreased [60] resulting in low physical fitness level. Mechanisms responsible for this exercise limitation are partly known in SS patients. We may mention chronic anaemia [59], haemorheological alterations [60], pulmonary dysfunction [61], increased arterial hypoxemia [62], chronic haemolysis and vascular function impairments [61,63]. Exercise responses in SC patients are not yet well studied. Although vascular function seems to be better preserved in children with SC, both sickle cell groups had a decreased exercise capacity compared to healthy children. In SC, mild anaemia and blood hyperviscosity could be responsible for decreased physical fitness, due to their known adverse effects on tissue oxygenation [64].

4.3. Vascular function, physical activity level and fitness

This study is the first to explore the associations between vascular function and physical activity level in children with sickle cell disease. Regular physical activity is known to improve NO production and bioavailability and to decrease oxidative stress [13,14]. Several studies in various chronic diseases demonstrated improved vascular function by regular physical activity [13,65]. However we could not observe any correlation between regular physical activity/fitness and vascular parameters, neither in SS, nor in SC patients. In our paediatric cohort, physical activity level was probably too low [14] to induce large biological and physiological adaptations, which could enhance physical fitness and vascular function. The use of accelerometer in future studies could be useful to quantify physical activity level. Recent studies with transgenic sickle mice demonstrated that regular physical activity was able to decrease oxidative stress and improve endothelial function [19,66]. A large prospective and longitudinal study in children with SCD would be needed to clarify the effects of a moderate training rehabilitation program on the clinical outcome and the potential physiological benefits.

5. Conclusion

In conclusion, peripheral micro- and macrovascular functions were reduced and associated to each other in SS children/adolescents. Micro- and macrovascular functions in SC appear to be better preserved than in SS. No association was found between physical activity- and vascular function parameters. Further research is necessary to differentiate mechanisms involved in SS and SC pathophysiology and to clarify the potential benefits of physical activity on vascular function in patients with haemoglobin SCD.

Conflict of interest

The authors declare to not have any conflict of interest.

Author contributions

Ms. Möckesch and Dr. Charlot designed the data collection instruments, coordinated and supervised data collection, carried out the study, conducted the statistical analyses, drafted the initial manuscript and approved the final manuscript. Mr. Jumet designed the data collection instruments, coordinated and supervised data collection, carried out the study and approved the final manuscript. Dr. Romana designed the study, drafted the initial manuscript and approved the final manuscript. Drs Divialle-Doumido and Petras, Mr. Tressières and Ms. Tarer carried out the study and approved the final manuscript. Dr. Hardy-Dessources designed the study and critically reviewed and approved the final manuscript. Dr. Hue approved the final manuscript. Dr. Etienne-Julan designed the study and approved the final manuscript. Drs Connes and Antoine-Jonville designed the study and the data collection instruments, coordinated and supervised data collection, carried out the study, conducted the statistical analyses, drafted the initial manuscript and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Academic Hospital of Pointe-à-Pitre grant B91122-40 (2009-A00211-56).

The authors would like to thank the patients who participated in the study.

References

- [1] D. Rees, T.N. Williams, M.T. Gladwin, Sickle-cell disease, *Lancet* 376 (2010) 2018–2031.
- [2] S. Chien, S. Usami, J.F. Bertles, Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia, *J. Clin. Invest.* 49 (1970) 623–634.
- [3] M.T. Gladwin, A.N. Schechter, F.P. Ognibene, W.A. Coles, C.D. Reiter, W.H. Schenke, G. Csako, M.A. Wadlaw, J.A. Panza, R.O. Cannon, Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease, *Circulation* 107 (2003) 271–278.
- [4] D.K. Kaul, X.-D. Liu, M.E. Fabry, R. Nagel, Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 (2000) 1799–1806.
- [5] P. Connes, S. Verlhac, F. Bernaudin, Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia, *Br. J. Haematol.* 161 (2013) 484–498.
- [6] L. Belhassen, G. Pelle, S. Sediame, D. Bachir, C. Carville, C. Bucherer, C. Lacombe, F. Galacteros, S. Adnot, Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation, *Blood* 97 (2001) 1584–1589.
- [7] P. Tharaux, R. Girot, A. Kanfer, J. Dussault, J. Gaitz, L. Tribout, et al., Cutaneous microvascular blood flow and reactivity in patients with homozygous sickle cell anaemia, *Eur. J. Haematol.* 68 (2002) 327–331.
- [8] J. Mohan, G. Lip, A. Blann, D. Bareford, J. Marshall, Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of the cutaneous circulation in sickle cell disease, *Eur. J. Clin. Invest.* 41 (2011) 546–551.
- [9] R. Klabunde, Cardiovascular Physiology Concepts, second ed. Lippincott Williams&Wilkins, 2005.
- [10] M.E. Safar, H.A. Struijker-Boudier, Cross-talk between macro- and microcirculation, *Acta Physiol.* 198 (2010) 417–430.
- [11] D. Lemogoum, L. Van Bortel, B. Najem, A. Dzudie, C. Teutcha, E. Madu, M. Leeman, J.P. Degaut, P. Van De Borne, Arterial stiffness and wave reflections in patients with sickle cell disease, *Hypertension* 44 (2004) 924–929.
- [12] B. Ranque, F. Jouven, Prognostic value of pulse wave velocity in sickle cell disease: the cadre study, *Cardiovasc. J. Afr.* 24 (2013) 28.
- [13] G. Kojda, R. Hambrecht, Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc. Res.* 67 (2005) 187–197.
- [14] D. Green, A. Maiorana, G. O'Driscoll, R. Taylor, Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans, *J. Physiol.* 561 (2004) 1–25.
- [15] X. Waltz, P. Connes, Pathophysiology and physical activity in patients with sickle cell anemia, *Mov. Sport. Sci. – Sci. Mot.* 83 (2014) 41–47.
- [16] E. Balayssac-Siransy, P. Connes, N. Tuo, C. Danho, M. Diaw, I. Sanogo, M.-D. Hardy-Dessources, A. Samb, S.K. Ballas, P. Bogui, Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia, *Br. J. Haematol.* 154 (2011) 398–407, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08728.x>.
- [17] P. Barbeau, K.F. Woods, L.T. Ramsey, M.S. Litaker, D.M. Pollock, J.S. Pollock, L.A. Callahan, A. Kutlar, G.A. Mensah, B. Gutin, Exercise in sickle cell anemia: effect on inflammatory and vasoactive mediators, *Endothelium* 8 (2001) 147–155.
- [18] C. Faes, E. Charrin, P. Connes, V. Pialoux, C. Martin, Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice, *Am. J. Hematol.* 90 (2015) E32–E33.
- [19] E. Charrin, E. Aufradet, A. Douillard, A. Romdhani, G. Souza, A. DeBessaad, C. Faes, E.N. Chirico, V. Pialoux, C. Martin, Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice, *Br. J. Haematol.* 168 (2014) 747–756.
- [20] O.K. Baskurt, M. Boynard, G.C. Cokelet, P. Connes, B.M. Cooke, S. Forconi, F. Liao, M.R. Hardeman, F. Jung, H.J. Meiselman, G. Nash, N. Nemeth, B. Neu, B. Sandhagen, S. Shin, G. Thurston, J.L. Wautier, New guidelines for hemorheological laboratory techniques, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 42 (2009) 75–97.
- [21] M. Nouraie, J. Lee, Y. Zhang, M.T. Gladwin, et al., The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe, *Haematologica* 98 (2013) 464–472.
- [22] C. Minson, L. Berry, M. Joyner, Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating, *J. Appl. Physiol.* 91 (2001) 1619–1626.
- [23] M. Roustit, J.-L. Cracowski, Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods, *Microcirculation* 19 (2012) 47–64.
- [24] A. Boignard, M. Salvat-Melis, P. Carpentier, C. Minson, L. Grange, C. Duc, et al., Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon, *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) 1103–1112.
- [25] H. Tomiyama, A. Yamashina, Non-invasive vascular function tests, *Circ. J.* 74 (2010) 24–33.
- [26] I.B. Wilkinson, I.R. Hall, H. MacCallum, I.S. Mackenzie, C.M. McEniery, B.J. Van der Arend, Y.E. Shu, L.S. MacKay, D.J. Webb, J.R. Cockcroft, Pulse-wave analysis: clinical evaluation of a noninvasive, widely applicable method for assessing endothelial function, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 147–152.
- [27] D. Arvidsson, F. Slinde, L. Hulthén, Physical activity questionnaire for adolescents validated against doubly labelled water, *Eur. J. Clin. Nutr.* 59 (2005) 376–383.
- [28] M.S. Buchowski, K.Y. Chen, D. Byrne, W.C. Wang, Equation to estimate resting energy expenditure in adolescents with sickle cell anemia, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 1335–1344.
- [29] R.O. Crapo, R. Casaburi, A.L. Coates, P.L. Enright, N.R. MacIntyre, R.T. McKay, D. Johnson, J.S. Wanger, R.J. Zeballos, V. Bittner, C. Mottram, ATS statement: guidelines for the six-minute walk test, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) 111–117, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.166/1/111>.
- [30] R. Liem, M. Nevin, A. Prestidge, L. Young, A. Thompson, Functional capacity in children and young adults with sickle cell disease undergoing evaluation for cardiopulmonary disease, *Am. J. Hematol.* 84 (2009) 645–649.
- [31] R. Geiger, A. Strasak, B. Tremel, K. Gasser, A. Kleinsasser, V. Fischer, H. Geiger, A. Loeckinger, J.I. Stein, Six-minute walk test in children and adolescents, *J. Pediatr.* 150 (2007) 395–399, 399.e1–e2.
- [32] X. Waltz, M. Romana, M.-D. Hardy-Dessources, P. Connes, et al., Hematological and hemorheological determinants of the six-minute walk test performance in children with sickle cell anemia, *PLoS One* 8 (2013).
- [33] L. Dedeken, R. Chapusett, P. Lé, C. Heijmans, C. Devalck, S. Huybrechts, F. Ziereisen, L. Hanssens, L. Rozen, D. Noubouossie, M. Muijinga, A. Ferster, reduction of the six-minute walk distance in children with sickle cell disease is correlated with silent infarct: results from a cross-sectional evaluation in a single center in Belgium, *PLoS One* 9 (2014).
- [34] F. Lionnet, N. Hammoudi, K. Stojanovic, V. Avellino, G. Grateau, R. Girot, J. Haymann, Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases, *Haematologica* 97 (2012) 1136–1141.
- [35] N. Lemonne, Y. Lamarre, M. Romana, M.-D. Hardy-Dessources, F. Lionnet, X. Waltz, V. Tarer, D. Mougenel, B. Tressières, M.-L. Lalanne-Mistrih, M. Etienne-Julan, P. Connes, Impaired blood rheology plays a role in the chronic disorders associated with sickle cell-hemoglobin C disease, *Haematologica* 99 (2014) e74–e75.
- [36] E. Nur, Y. Kim, J. Truijen, E.J. van Beers, S.C. Davis, D.P. Brandjes, B.J. Biemond, J.J. van Lieshout, Cerebrovascular reserve capacity is impaired in patients with sickle cell disease, *Blood* 114 (2009) 3473–3478.
- [37] G.J. Kato, R.P. Heibel, M.H. Steinberg, M.T. Gladwin, Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions, *Am. J. Hematol.* 84 (2009) 618–625.
- [38] G.J. Kato, M.T. Gladwin, M.H. Steinberg, Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes, *Blood Rev.* 21 (2007) 37–47.
- [39] A. Mack, G. Kato, Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (2005) 1237–1243.
- [40] M. Aslan, T.M. Ryan, B. Adler, T.M. Townes, D. Parks, J. Thompson, A. Tousson, M.T. Gladwin, R.P. Patel, M.M. Tarpey, I. Batinic-Haberle, C.R. White, B.A. Freeman, Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 15215–15220.
- [41] C.D. Reiter, M.T. Gladwin, An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy, *Curr. Opin. Hematol.* 99–107 (2003).

- [42] K. Charlot, M. Romana, B. Möckesch, S. Jument, X. Waltz, E. Al, Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: blood viscosity or microvascular dysfunction, *Blood Cells Mol. Dis.* 56 (2016) 41–45.
- [43] F. Gladwin, M.T. Sachdev, V. Jison, M.L. Shizukuda, Y. Plehn, J.F. Minter, K. Brown, B. Coles, W.A. Nichols, J.S. Ernst, I. Hunter, L.A. Blackwelder, W.C. Schechter, A.N. Rodgers, G.P. Castro, O. Ognibene, Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 886–895.
- [44] R. Kawamoto, Y. Tabara, K. Kohara, A slightly low haemoglobin level is beneficially associated with arterial stiffness in Japanese community-Dwelling Women, *Clin. Exp. Microcirc.* 55 (2013) 193–203.
- [45] K. Parkhurst, H. Lin, A. DeVan, Contribution of blood viscosity in the assessment of flow-mediated dilation and arterial stiffness, *Vasc. Med.* 17 (2012) 231–234.
- [46] Y. Ikenaga, S. Nishi, Y. Komagata, Experimental study on the pressure and pulse wave propagation in viscoelastic vessel tubes effects of liquid viscosity and tube stiffness, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 60 (2013) 2381–2388.
- [47] J. Kim, J. Yoon, M. Cho, B. Lee, Blood characteristics effect on pulse wave velocity, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 55 (2013) 193–203.
- [48] Y. Li, X. Tian, T. Liu, Association between whole blood viscosity and arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus, *Endocrine* 49 (2015) 148–154.
- [49] D. Toraldo, F. Peverini, M. De Benedetto, F. De Nuccio, Obstructive sleep apnea syndrome: blood viscosity, blood coagulation abnormalities and early atherosclerosis, *Lung* 191 (2013) 1–7.
- [50] M. Guiraudou, E. Varlet-Marie, E. Raynaud de Mauverger, J. Brun, Obesity-related increase in whole blood viscosity includes different profiles according to fat localization, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 55 (2013) 63–73.
- [51] A. Lee, P.I. Mowbray, G.D. Lowe, A. Rumley, F.G. Fowkes, P. Allan, Blood viscosity and elevated carotid Intima-Media thickness in men and women, *Circulation* 97 (1998) 1467–1473.
- [52] J. Trippette, T. Alexy, M.-D. Hardy-Dessources, D. Mouguel, E. Beltan, T. Chalabi, R. Chout, M. Etienne-Julan, O. Hue, H.J. Meiselman, P. Connes, 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 (2009) 1060–1065, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2008.005371>.
- [53] Y. Lamarre, M. Romana, X. Waltz, M.-L. Lalanne, B. Tressières, L. Divialle-Doumido, M.-D. Hardy, J. Vent-Schmidt, M. Petras, C. Broquere, F. Maillard, V. Tarer, M. Etienne-Julan, P. Connes, Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease, *Haematologica* 97 (2012) 1641–1647.
- [54] A. Hannemann, E. Weiss, D. Rees, S. Dalibalta, J. Ellory, J. Gibson, The properties of red blood cells from patients heterozygous for HbS and HbC (HbSC genotype), *Anemia* 2011 (2011).
- [55] Y. Lamarre, M.-D. Hardy-Dessources, M. Romana, M.-L. Lalanne-Mistrih, X. Waltz, M. Petras, L. Doumido, A. Blanchet-Deverly, J. Martino, B. Tressières, F. Maillard, V. Tarer, M. Etienne-Julan, P. Connes, Relationships between systemic vascular resistance, blood rheology and nitric oxide in children with sickle cell anemia or sickle cell-hemoglobin C disease, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 58 (2014) 307–316.
- [56] M. Safar, B. Balkau, C. Lange, S. Protogerou, A.D. Czernichow, J. Blacher, B. Levy, H. Smulyan, Hypertension and vascular dynamics in men and women with metabolic syndrome, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013) 12–19.
- [57] E.M. Novelli, M. Hildesheim, C. Rosano, R. Vanderpool, M. Simon, G.J. Kato, M.T. Gladwin, Elevated pulse pressure is associated with hemolysis, proteinuria and chronic kidney disease in sickle cell disease, *PLoS One* 9 (2014).
- [58] E.M. Barden, B.S. Zemel, D.A. Kawchak, M.I. Goran, K. Ohene-Frempong, V.A. Stallings, Total and resting energy expenditure in children with sickle cell disease, *J. Pediatr.* 136 (2000) 73–79.
- [59] M.J. Borel, M.S. Buchowski, E.A. Turner, B.B. Peeler, R.E. Goldstein, P.J. Flakoll, Alterations in basal nutrient metabolism increase resting energy expenditure in sickle cell disease, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) E357–E364.
- [60] M.S. Buchowski, K.M. Townsend, R. Williams, K.Y. Chen, Patterns and energy expenditure of free-living physical activity in adolescents with sickle cell anemia, *J. Pediatr.* 140 (2002) 86–92.
- [61] P. Connes, R. MacHado, O. Hue, H. Reid, Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 49 (2011) 151–163.
- [62] L.A. Callahan, K.F. Woods, G.A. Mensah, L.T. Ramsey, P. Barbeau, B. Gutin, Cardiopulmonary response to exercise in women with sickle cell anemia, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (2002) 1309–1316.
- [63] X. Waltz, M. Romana, M.-L. Lalanne-Mistrih, R.F. Machado, Y. Lamarre, V. Tarer, M.-D. Hardy-Dessources, B. Tressières, L. Divialle-Doumido, M. Petras, F. Maillard, M. Etienne-Julan, P. Connes, Hematologic and hemorheological determinants of resting and exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease, *Haematologica* 98 (2013) 1039–1044.
- [64] X. Waltz, M.-D. Hardy-Dessources, N. Lemonne, D. Mouguel, M.-L. Lalanne-Mistrih, Y. Lamarre, V. Tarer, B. Tressières, M. Etienne-Julan, O. Hue, P. Connes, Is there a relationship between the hematocrit-to-viscosity ratio and microvascular oxygenation in brain and muscle? *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 59 (2015) 37–43.
- [65] K. Watts, P. Beye, A. Siafarikas, E.A. Davis, T.W. Jones, G. O'Driscoll, D.J. Green, Exercise training normalizes vascular dysfunction and improves central adiposity in obese adolescents, *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (2004) 1823–1827.
- [66] C. Martin, V. Pialoux, C. Faes, E. Charrin, P. Connes, Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? *Br. J. Sports Med.* (2015).
- [67] C. Renoux, M. Romana, V. Pialoux, et al., Effect of age on blood rheology in sickle cell anaemia and sickle cell haemoglobin C disease: a cross-sectional study, *PLoS One* 11 (2016).

Association between oxidative stress and vascular reactivity in children with sickle cell anaemia and sickle haemoglobin C disease

Berenike Möckesch,^{1,3,4} Philippe Connes,^{2,3,4,6}  Keyne Charlot,^{1,3,4,5} Sarah Skinner,^{2,4} Marie-Dominique Hardy-Dessources,^{3,4} Marc Romana,^{3,4} Stéphane Jumet,¹ Marie Petras,⁷ Lydia Divialle-Doumdo,⁷ Cyril Martin,^{2,4} Benoît Tressières,⁸ Vanessa Tarer,⁷ Olivier Hue,¹ Maryse Etienne-Julan,⁷ Sophie Antoine^{1*} and Vincent Pialoux^{2,4,6*}

¹Laboratory ACTES (EA 3596), French West Indies University, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe,

²Laboratory LIBM EA7424, Team "Vascular Biology and Red Blood Cell", University of Lyon 1, Villeurbanne, ³UMR Inserm U1134, French West Indies University, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, ⁴Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (LABEX GR-Ex), PRES Sorbonne, Paris, ⁵Armed Forces Biomedical Research Institute, Brétigny-sur-Orge, ⁶Institut Universitaire de France (IUF), Paris, ⁷Sickle Cell Center, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, and

⁸Centre Investigation Clinique Antilles Guyane, 1424 Inserm, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

Received 2 September 2016; accepted for publication 6 February 2017

Correspondence: Philippe Connes, Laboratory LIBM EA7424, Team "Vascular Biology and Red Blood Cell", Université Claude Bernard Lyon 1, Campus de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.

E-mails: pconnes@yahoo.fr and philippe.connes@univ-lyon1.fr

*Equivalent position.

Summary

Oxidative stress and haemolysis-associated nitric oxide (NO) depletion plays a crucial role in the development of vasculopathy in sickle cell anaemia (SS). However it remains unknown whether oxidative stress and haemolysis levels influence vascular function in patients with sickle haemoglobin C disease (SC). Microvascular response to heat (using Laser Doppler flowmetry on finger), oxidative stress biomarkers, NO metabolites, endothelin-1 and haematological parameters were compared between patients with SS and SC. Vascular function, oxidative and nitrosative markers were also measured in healthy (AA) children. SS and SC had increased plasma advanced oxidation protein products (AOPP), malondialdehyde, plasma antioxidant activities and NO end products, compared to AA. SC had lower catalase activity compared to AA and SS. Haemolytic rate, glutathione peroxidase and nitrotyrosine concentrations were significantly increased in children with SS compared to SC and AA. SS and SC had impaired microvascular reactivity compared to AA. In SS, the plateau phase of the response to local thermal heating was negatively associated with nitrotyrosine and AOPP. No association between vascular function parameters and oxidative stress markers was observed in SC. Mild haemolysis in SC, compared to SS, may limit oxidative and nitrosative stress and could explain the better preserved microvascular function in this group.

Keywords: sickle cell disease, haemolysis, vascular function.

Sickle cell anaemia (SS; i.e., homozygous form of sickle cell disease) is a hereditary haemoglobinopathy characterized by the presence of an abnormal haemoglobin, named haemoglobin S (HbS) (Ingram, 1959). Deoxygenated HbS polymerizes and distorts red blood cells into sickle shaped cells (Eaton &

Hofrichter, 1990). Repeated sickling-unsickling events damage red blood cell membranes, causing them to become less flexible. The increased red blood cell fragility and rigidity are at the origin of chronic haemolytic anaemia and frequent vaso-occlusive crises in SS, respectively (Stuart & Nagel,

2004; Rees *et al*, 2010). Vascular dysfunction has also been shown to be involved in several SS-related complications (Gladwin *et al*, 2004; Kato *et al*, 2007). Several studies have suggested that increased haemolysis and oxidative stress may play a major role in the development of chronic vasculopathy in SS (Reiter *et al*, 2002; Morris *et al*, 2005; Kato *et al*, 2006, 2007; Nur *et al*, 2011; Chirico & Pialoux, 2012).

Sickle cell haemoglobin C disease (SC) has long been considered to be a mild variant of sickle cell disease. However, retinopathy and otological disorders were found to occur more frequently in patients with SC than SS patients (Lionnet *et al*, 2012). Furthermore, evidence suggests that a significant proportion of patients with SC are likely to develop glomerulopathy, osteonecrosis, priapism and vaso-occlusive crises (Hannemann *et al*, 2011; Lionnet *et al*, 2012; Lemonne *et al*, 2014a). In SC, abnormal blood rheology seems to contribute to clinical outcomes and severity (Lemonne *et al*, 2014b). However, few studies have focused on vascular function in SC (Mohan *et al*, 2011). Moreover, the influence of oxidative stress and haemolysis level on the vascular function of patients with SC disease is still unknown.

In this context, this study aimed to determine whether microvascular reactivity, blood viscosity, levels of several vasoactive molecules and several biomarkers reflecting haemolysis and oxidative stress differed between children with SS and SC disease and to determine the associations between these parameters. Moreover, in order to define the degree of vascular dysfunction and of oxidative stress in SC children, as well as in SS children, oxidative stress and vascular function markers were compared to those of well-matched healthy children (AA).

Methods

Patients

Forty-three sickle cell children/adolescents, all native Guadeloupeans, were recruited from the Sickle Cell Unit of the Academic Hospital of Pointe-à-Pitre (Guadeloupe) where they have been regularly followed since birth. Twenty (11 girls, nine boys) patients with SS disease and 23 (nine girls, 14 boys) patients with SC disease participated in this study. All patients were volunteers and gave written consent before participating in the study. Written informed consent was also obtained from the parent or guardian of each child. They were in steady state at the time of the study (i.e., no blood transfusion within the last 3 months, absence of acute episodes of infection, vaso-occlusive crisis or acute chest syndrome at least 1 month before inclusion in the study). Five SS patients had been receiving hydroxycarbamide (also termed hydroxyurea) treatment for more than 6 months (dose *c.* 20 mg/kg/day). Twelve well matched non-sickle children, all native Guadeloupeans, participated as controls. The study was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France, registration number:

2009-A00211-56/2013, SAPOTILLE/HYPOSNAD project) and conducted in accordance to the Declaration of Helsinki.

Blood samples

Venous blood was sampled at baseline in the sitting position from the antecubital vein into EDTA tubes before vascular function measurement. Haematological parameters and blood viscosity were measured within 1–2 h after sampling and full reoxygenation (Baskurt *et al*, 2009) in sickle cell children. After centrifugation, plasma was extracted and used for the determination of oxidative stress markers, endothelin-1 (ET-1, also termed EDN1) and nitric oxide (NO) metabolites.

Haematological and blood viscosity measurements

Haematological data were obtained using an automated cell counter (MAXM AL; Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Blood viscosity was measured at native haematocrit and at room temperature (25°C) using a cone-plate viscometer (Brookfield DVII+ with CPE40 spindle; Brookfield Engineering, Natick, MA, USA) at 225/s. Measurements were performed according to the recent international guidelines for haemorheological laboratory techniques (Baskurt *et al*, 2009). Biochemical parameters reflecting haemolysis were determined by standard methods: serum lactate dehydrogenase, total bilirubin, aspartate aminotransferase levels and percentage of reticulocytes. Of these four haemolytic parameters, one resuming variable (haemolytic index) was calculated by principal component analysis, as reported previously (Nouriaie *et al*, 2013). This standard statistical approach is appropriate when several biological measurements reflect similar aspects of a single underlying process (Genser *et al*, 2007).

Oxidative stress, nitric oxide and endothelin-1 plasma markers

Because of high reactive instability, reactive oxygen species (ROS) production cannot be easily and directly measured in plasma. Assessment of oxidative stress was therefore based on the measurement of more stable plasma products of oxidative reactions and of plasma antioxidant defences (Nur *et al*, 2011).

Plasma biomarkers of oxidative stress [advanced oxidation protein products (AOPP), malondialdehyde (MDA)], antioxidant status [catalase, glutathione peroxidase (GPX), and superoxide dismutase (SOD) activities, ferric reducing antioxidant power (FRAP)], NO markers [NO end-products (NOx), sum of nitrite and nitrate and nitrotyrosine] and ET-1 were determined by spectrophotometry on a microplate reader (Infinite M200; Tecan, Männedorf, Switzerland).

Plasma AOPPs. AOPPs were determined using the semi-automated method developed by Witko-Sarsat *et al* (2003), as previously described (Diaw *et al*, 2015).

MDA. Concentrations of plasma MDA were determined as previously described (Diaw *et al*, 2015) using a modified method reported by Ohkawa *et al* (1979) based on thiobarbituric acid reactions.

Catalase. Plasma Catalase activity, represented by the formation rate of formaldehyde, was determined by the method of Johansson and Borg (1988).

GPX. Plasma GPX activity was identified by the modified method of Paglia and Valentine (1967) using H_2O_2 . GPX activity represents the oxidation rate of NADPH to $NADP^+$ after addition of glutathione reductase, reduced glutathione and NADPH.

SOD. SOD activity was evaluated using a previously reported method (Oberley & Spitz, 1985), which employs the hypoxanthine-xanthine oxidase system. Superoxide radical production is observable using nitroblue tetrazolium colouration.

FRAP. FRAP was measured as previously described (Diaw *et al*, 2015) based on the ferric-reducing ability of plasma (Benzie & Strain, 1999).

NOx. NO end products (NOx) were measured using the Griess method (Misko *et al*, 1993). Nitrate reductase and NADPH were added to plasma in order to reduce nitrate to nitrite.

Nitrotyrosine. Concentrations of plasma nitrotyrosine, as the end product of protein nitration induced by peroxynitrite, were measured using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described (Galimanes & Matata, 2002).

ET-1. ET-1 is a potent vasoconstrictor produced mainly by endothelial cells. Circulating ET-1 levels were determined in sickle cell children only, as previously reported (Ergul *et al*, 1996), using an ELISA kit specifically designed for measurement of plasma ET-1 (American Research Product, Inc., Waltham, MA USA).

Assessment of microvascular function

Peripheral microcirculatory cutaneous blood flow and microvascular response to local heating of the middle finger of the left hand was evaluated, as previously described (Roustit & Cracowski, 2012) using a Laser Doppler flowmeter (Periflux System 5000; Perimed, Järfälla, Sweden) and its associated software Perisoft (Perimed). A combined laser Doppler and thermostatic metallic probe (PR457) was attached to the distal pad of the middle finger of the left hand. This device enables skin blood flow recording (mV) and is a simple, non-invasive method (Roustit & Cracowski, 2012). The same operator placed the metallic probe in all patients, in order to reduce spatial variability due to vessels'

anatomy. Children were well matched to limit ethnical, gender and age influences on skin blood flow. The advantages and limitations of this method have been previously described (Roustit & Cracowski, 2012).

After a 10-min baseline recording to allow patients/subjects acclimation and to limit the effects of mental stress on microcirculatory blood flow, the skin temperature was raised to 42°C (within 5 s) and the microvascular response to local heating was measured for 40 min. Participants were asked to avoid any movement of the left hand until the reactivity test was completed. Local cutaneous heating results in a biphasic increase in blood flow: a rapid increase (initial peak), related to axon reflex, followed by a nadir and a prolonged plateau, mainly NO-dependent (Minson *et al*, 2001; Roustit & Cracowski, 2012). Taking into account any individual fluctuations of skin blood flow (due to blood pressure changes), laser Doppler blood flow (recorded in mV) was divided by the individual mean arterial pressure. Indeed, baseline blood flow, initial peak and the plateau were expressed as cutaneous vascular conductance (CVC, mV/mmHg) (Boignard *et al*, 2005). The increase in blood flow from baseline to peak or plateau, expressed as a percentage, represented the capacity of vessels to dilate, as previously reported (Roustit & Cracowski, 2012). Heart rate (beats/min), resting diastolic blood pressure (mmHg) and resting systolic blood pressure (mmHg) were also recorded.

Statistical analysis

Results are presented as mean $\pm$ standard deviation or median (25th and 75th percentiles). Anthropometric, physiological, haematological parameters and ET-1 levels were compared between SC and SS children using unpaired Student *t* test or Mann–Whitney comparison test for non-parametric parameters. Parametric or non-parametric correlation tests (Pearson or Spearman, respectively) were performed in order to test whether microvascular function/dysfunction level and biological parameters were associated. Microvascular function and oxidative stress/NO markers were compared between the AA, SC and SS children using a one-way ANOVA and Turkey honest significant difference post hoc test or the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA followed by a Mann–Whitney test. The significance level was defined as $P < 0.05$. Analyses were conducted using SPSS (v. 20; SPSS Statistics, Chicago, IL, USA) and Statistica (Statistica, v5.5; Statsoft, Tulsa, OK, USA). Graphs were drawn using GraphPad Prism (v. 7, Graph Pad Software for mac; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Anthropometric and haematological characteristics

Anthropometric characteristics were not significantly different between SS and SC children (Table I). Haemoglobin,

Table I. Anthropological characteristics, biological parameters and haemolytic markers of patients with sickle cell anaemia (SS) and patients with sickle haemoglobin C disease (SC).

	SC (n = 20)	SS (n = 23)
Male/female	9/11	14/9
Age (years)	15.1 ± 2.6	15.1 ± 2.3
Weight (kg)	50 ± 13	50 ± 14
Height (cm)	160 ± 0.1	163 ± 0.1
Systolic blood pressure (mmHg)	112 ± 14	116 ± 8
Diastolic blood pressure (mmHg)	62 ± 9	56 ± 9*
Heart rate (beats/min)	76 ± 11	83 ± 12*
Haemoglobin (g/l)	115 ± 9.0	84 ± 11***
Haematocrit (%)	33.1 ± 3.3	25.4 ± 3.9***
Blood viscosity (mPa.s)	6.0 ± 1.1	4.9 ± 0.8***
Lactate dehydrogenase (iu/l)	294 ± 85	542 ± 168***
Fetal haemoglobin (%)	2.2 (1.4; 3.6)	6.8 (3.8; 10.3)***
Total bilirubin (μmol/l)	21.0 (16.5; 32.0)	44.0 (32.0; 61.5)***
Aspartate aminotransferase (iu/l)	24.3 ± 8.8	34.6 ± 13.5**
Reticulocytes (%)	2.9 ± 1.1	9.0 ± 4.2***
Haemolytic index	-0.72 ± 0.35	0.69 ± 0.93***

Values are given as mean ± standard deviation (parametric tests) or median (25th and 75th percentiles; non parametric tests). SS, children with homozygous sickle cell disease; SC, children with sickle cell haemoglobin-C disease.

* $P < 0.05$ versus SC.

** $P < 0.01$ versus SC.

*** $P < 0.001$ versus SC.

haematocrit levels and blood viscosity were significantly lower in children with SS than in children with SC disease ($P < 0.001$, Table I). Haemolytic parameters (lactate dehydrogenase, total bilirubin, reticulocytes, aspartate aminotransferase content, haemolytic index) and fetal haemoglobin were significantly higher in SS compared to SC patients ($P < 0.05$, Table I).

Oxidative stress and antioxidant status

SS and SC children had increased MDA and AOPP levels compared to healthy controls (Fig 1). MDA did not differ between SS and SC but AOPP was higher in SS group ($P < 0.01$, Fig 1). SOD activity was higher in SS ($P < 0.01$) and SC ($P < 0.05$) than in AA children. Catalase activity was lower in SC than in SS ($P < 0.05$) and AA ($P < 0.001$) children (Fig 1). GPX ($P < 0.01$) was significantly increased in SS patients compared to the SC group (Fig 1). The SS group had higher levels of FRAP compared to both AA and SC children ($P = 0.001$), while FRAP level was higher in SC than in AA ($P < 0.001$). In patients with SS, total bilirubin concentrations were positively correlated with plasma AOPP ($P < 0.01$, $r = 0.54$) and FRAP content ($P < 0.01$, $r = 0.66$).

In SC children, total bilirubin level was correlated with total antioxidant power ($P < 0.01$, $r = 0.66$). Furthermore, in SC, AOPP was associated with Catalase ($P < 0.001$, $r = 0.775$) and FRAP ($P = 0.05$, $r = 0.406$).

Haemolytic index did not correlate with any vascular function and oxidative stress parameters in both groups. Nevertheless, in SS children, the haemolytic index tended to be associated with AOPP ($P = 0.065$, $r = 0.391$). Haematocrit level was negatively associated, exclusively in SS group, to AOPP ($P < 0.01$, $r = -0.63$). Oxidative stress grade did not differ between the five SS children receiving hydroxycarbamide and those without (data not shown).

Plasma levels of NOx, nitrotyrosine and ET-1

NOx were similar in SS and SC but both groups had higher levels than AA ($P < 0.001$). Nitrotyrosine was significantly higher in SS patients compared to SC ($P < 0.05$, Fig 1) and AA ($P < 0.01$, Fig 1). ET-1 concentration tended to be higher in SS compared to SC children: 3.35 ± 1.57 vs. 2.55 ± 1.31 pg/ml, respectively ($P = 0.056$). In children with SS disease, nitrotyrosine correlated with haemoglobin ($P < 0.05$, $r = -0.48$) and haematocrit ($P < 0.05$, $r = -0.43$) level.

Microvascular function

Baseline blood flow was significantly higher in SS than in SC ($P < 0.05$) and AA ($P < 0.01$) children. In response to local heating, peak and plateau blood flow were not different between the three groups (Fig 2). However, when expressed as a percentage, the increase of skin blood flow up to peak was lower in both SS ($P < 0.01$) and SC ($P < 0.05$) than in AA but was not statistically different between SS and SC: 414.5 (124; 892) %, 74.55 (36.61; 150.44) % and 74.52 (29.23; 206.28) %, in AA, SC and SS children, respectively. The percentage of blood flow increase up to the plateau was higher in AA ($P < 0.001$) and SC ($P < 0.05$) than in SS patients: 291.5 (203; 767) %, 90.96 (50.71; 198.42) % and 34.95 (-0.93; 70.58) % in AA, SC and SS children, respectively.

Given that blood flow may be affected by the degree of anaemia, baseline blood flow and both peak and plateau responses were corrected by the haematocrit in SS and SC (haematological parameters were not available in AA). After haematocrit correction, microvascular function parameters were compared between the two groups. The results demonstrated that baseline blood flow remained higher (0.06 ± 0.04 vs. 0.11 ± 0.06 , $P < 0.05$ in SC and SS, respectively) and microvascular reactivity remained lower in SS compared to SC children (blood flow increase up to plateau: 75 (29; 206)% vs. 35 (-1; 70)%, $P < 0.05$ in SC and SS, respectively). In addition, no correlation was observed between haematocrit/haemoglobin level and vascular reactivity or baseline blood flow.

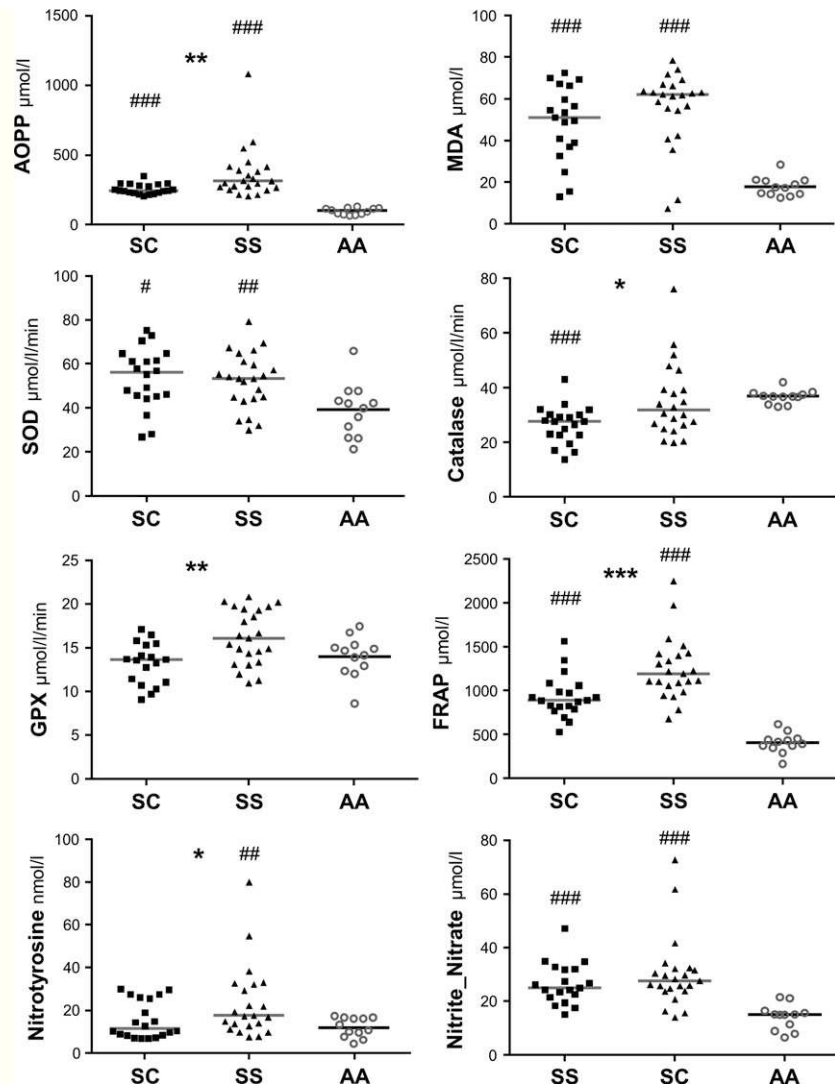


Fig 1. Comparison of oxidative stress-, antioxidant status- and nitric oxide metabolism parameters between sickle cell SC and SS and non sickle, AA children. AA, healthy children with normal haemoglobin; SS, children with homozygous sickle cell disease; SC, children with sickle cell haemoglobin C disease; AOPP, advanced oxidation protein products; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; GPX, glutathione peroxidase; FRAP, ferric reducing antioxidant power. * $P < 0.05$ versus SC; ** $P < 0.01$ versus SC; *** $P < 0.001$ versus SC; # $P < 0.05$ versus AA; ## $P < 0.01$ versus AA; ### $P < 0.001$ versus AA.

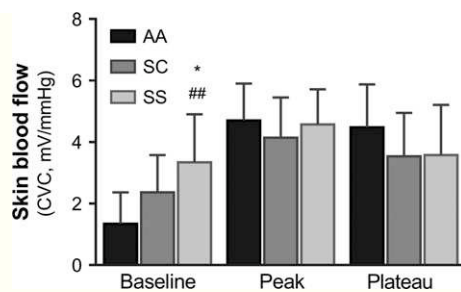


Fig 2. Baseline, initial thermal peak and plateau cutaneous vascular conductance (CVC) in children with sickle haemoglobin C disease (SC) and sickle cell anaemia (SS) and with normal haemoglobin A (AA). All data are presented as mean $\pm$ standard deviation. * $P < 0.05$ versus SC; ** $P < 0.01$ versus AA.

Plasma nitrotyrosine ($P < 0.05$, $r = -0.62$), NOx ($P < 0.05$, $r = -0.56$) and AOPP ($P < 0.05$, $r = -0.45$) were negatively correlated with the blood flow increase up to the

plateau in SS children but not in SC patients. ET-1 level did not correlate with vascular function in both groups. The vascular reactivity of SS children receiving hydroxycarbamide treatment did not differ from SS children not receiving hydroxycarbamide (data not shown).

Discussion

The major results of this study are: (1) microvascular reactivity in response to local heating was impaired in SS and SC children compared to AA children with the degree of impairment being higher in SS than in SC patients, (2) oxidative stress and antioxidant enzyme activities were elevated in both SS and SC groups compared to AA children but oxidative stress was less severe in SC than in SS children, (3) haemolysis and nitrotyrosine level were increased in SS compared to SC (and AA for nitrotyrosine), (4) microvascular function correlated with oxidative and nitrosative stress in SS but not in SC children.

Self-regulation of blood vessel diameter, in response to shear stress and various biological stimuli, facilitates the maintenance of adequate tissue perfusion throughout the vascular system (Segal, 1994). NO-mediated vasodilation and ET-1-mediated vasoconstriction are important antagonists of endothelium-dependent vasomotor control (Baskurt *et al*, 2004). Thus, disruption of this balance may lead to structural and functional vascular changes associated with perfusion alterations.

Elevated plasma free haemoglobin (Reiter *et al*, 2002) and plasma arginase-1 content (Morris *et al*, 2005), due to increased haemolysis, have been reported to limit NO bioavailability in SS patients (Kato *et al*, 2007). As expected, haemolysis was higher in SS than in SC children. Haemolytic rate and anaemia are known to be milder in SC than in SS compared to AA individuals (Ballas *et al*, 1982). Thus, it was not surprising that SS children had reduced NO-dependent vasodilation (plateau phase of the thermal hyperaemic response) compared to SC and AA children. However, the SS and SC populations had similar resting NO_x levels, though we could have expected to find impaired NO bioavailability in SS subjects. Nevertheless, endothelial NO synthase activity has been reported to be increased in transgenic sickle mice compared to controls (Bank *et al*, 1996; Kaul *et al*, 2000), probably as a result of the chronic high shear stress applied to the endothelial cells (Kaul *et al*, 2000; Belhassen *et al*, 2001). Vascular wall shear stress has never been assessed in SC patients. However, although blood viscosity was 20% greater in SC children compared to SS, baseline skin blood flow was 40% lower in the SC group, which could lead to lower wall shear stress in this group. The subsequent lower mechanical stimulation of endothelial NO synthase activity in SC could thus result in lower NO production compared to SS children. However, the higher plasma nitrotyrosine content found in SS children suggests that the extra NO, that could possibly be produced, would probably be rapidly converted into peroxynitrite by reacting with superoxide radicals, thereby reducing the impact of NO on vasodilation. The correlation found between AOPP and nitrotyrosine supports a role of oxidative stress in the decrease of NO bioavailability in SS children.

Interestingly, in SS, plasma nitrotyrosine level was also negatively correlated with the percentage change in blood flow between baseline and plateau. Peroxynitrite may exert deleterious effects on the vascular function of SS children, as previously described in other disease cases (Szabo *et al*, 2007). In addition, the higher ET-1 levels in SS compared to SC children, could participate in the loss of microvascular reactivity and vascular tone imbalance in SS. Repeated periods of sickling and hypoxia, pain intensity and NO depletion – all exacerbated in SS patients (Stuart & Nagel, 2004) – are known to promote sympathetic nervous system activity and ET-1 production (Lapoumeroulie *et al*, 2005; Steinberg *et al*, 2009).

Conversely, in the SC group no correlation between vascular function parameters and nitrotyrosine was found. Although SC children showed impaired thermal hyperaemic

peak response compared to the AA group, the plateau response was not significantly different between the two groups. Our findings suggest that the NO-related vasodilation during the thermal hyperaemic challenge is better preserved in SC than in SS children. The degree of anaemia may influence blood flow and vascular reactivity (Belhassen *et al*, 2001). Our study demonstrated that despite haematocrit adjustment, microvascular reactivity remained lower in SS than in SC children. In addition, no association was observed between the degree of anaemia and microvascular reactivity. Indeed, the loss of vascular reactivity does not seem to be modulated by anaemia only. Our findings are in agreement with the study of Nur *et al* (2009) who previously reported that neither increased cerebral blood flow velocity, nor decreased cerebrovascular responsiveness to carbon dioxide was related to the degree of anaemia in SS (Nur *et al*, 2009).

Five of the 23 SS children were under hydroxycarbamide treatment. Hydroxycarbamide is supposed to increase NO bioavailability (King, 2004), which could probably improve vascular function. The comparison between these two subgroups did not show any difference in the magnitude of oxidative stress and microvascular dysfunction. Prospective studies in larger cohorts would be necessary to clarify this result.

Enzymatic antioxidant activity and capacity has been widely studied in patients with homozygous sickle cell disease (Das & Nair, 1980; Adelekan *et al*, 1989; Natta *et al*, 1990; Goswami & Ray, 2011; Chirico & Pialoux, 2012; El-Ghamrawy *et al*, 2014) and in murine models of sickle cell disease (Dasgupta *et al*, 2006; Charrin *et al*, 2015) compared to controls. However, to the best of our knowledge no study has previously compared enzymatic antioxidant activity between SS, SC and AA children. According to our findings, SS and SC groups had elevated oxidative stress levels and upregulated enzymatic antioxidant activities, compared to healthy controls. Compared to SC children, SS had greater levels of GPX, Catalase and FRAP along with higher plasma AOPP concentrations, suggesting higher ROS generation in SS children. Indeed, the increased antioxidant activity was probably not sufficient to entirely counterbalance the overproduction of ROS (Chirico & Pialoux, 2012) in SS patients. In contrast to SS children, oxidative stress markers correlated well with each other in the SC group, probably underlying a more equilibrated balance between oxidants and antioxidants. The source of oxidative stress in sickle cell disease is multiple (Chirico & Pialoux, 2012). The positive correlation observed between haemolytic markers and AOPP plasma levels observed in SS, but not in SC patients, suggests that elevated oxidative stress is probably partly related to increased haemolysis in SS children. Furthermore, the expected higher amount of haemoglobin released into the plasma of SS children, a mechanism thought to be one of the main sources of ROS production in the context of sickle cell disease (Voskou *et al*, 2015), may also contribute to the higher oxidative and nitrosative stresses in the SS group.

In conclusion, microvascular function is better preserved in SC than in SS young patients compared to healthy children. The mild haemolysis found in SC compared to SS children may limit oxidative and nitrosative stresses, which may further preserve microvascular function. These results could explain why SC patients may develop leg ulcers, pulmonary hypertension, priapism or stroke less frequently than SS patients (Kato *et al*, 2007). Instead, higher blood viscosity in SC could increase the risks for retinopathy, otological disorders and osteonecrosis, as previously described (Lemonne *et al*, 2014b).

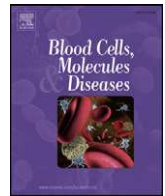
References

- Adekan, D.A., Thurnham, D.I. & Adekile, A.D. (1989) Reduced antioxidant capacity in paediatric patients with homozygous sickle cell disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, **43**, 609–614.
- Ballas, S.K., Lewis, C.N., Noone, A.M., Krasnow, S.H., Kamarulzaman, E. & Burka, E.R. (1982) Clinical, hematological, and biochemical features of Hb SC disease. *American Journal of Hematology*, **13**, 37–51.
- Bank, N., Aynedjian, H.S., Qiu, J.H., Osei, S.Y., Ahima, R.S., Fabry, M.E. & Nagel, R.L. (1996) Renal nitric oxide synthases in transgenic sickle cell mice. *Kidney International*, **50**, 184–189.
- 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., Harde-man, 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.
- Belhassen, L., Pelle, G., Sediame, S., Bachir, D., Carville, C., Bucherer, C., Lacombe, C., Galacteros, F. & Adnot, S. (2001) Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood*, **97**, 1584–1589.
- Benzie, I.F. & Strain, J.J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, **299**, 15–27.
- Boignard, A., Salvat-Melis, M., Carpentier, P.H., Minson, C.T., Grange, L., Duc, C., Sarrot-Reynaud, F. & Cracowski, J.L. (2005) Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Research & Therapy*, **7**, R1103–R1112.
- Charrin, E., Aufradet, E., Douillard, A., Romdhani, A., Souza, G.D., Bessaad, A., Faes, C., Chirico, E.N., Pialoux, V. & Martin, C. (2015) Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice. *British Journal of Haematology*, **168**, 747–756.
- Chirico, E.N. & Pialoux, V. (2012) Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*, **64**, 72–80.
- 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**, 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 and Medicine*, **41**, 1771–1780.
- Diaw, M., Pialoux, V., Martin, C., Samb, A., Diop, S., Faes, C., Murry, P., Sall Diop, N., Diop, S.N., Ranque, B., Mbaye, M.N., Key, N.S. & Connes, P. (2015) Sickle cell trait worsens oxidative stress, abnormal blood rheology, and vascular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **38**, 2120–2127.
- Eaton, W.A. & Hofrichter, J. (1990) Sickle cell hemoglobin polymerization. *Advances in Protein Chemistry*, **40**, 63–279.
- El-Ghamrawy, M.K., Hanna, W.M., Abdel-Salam, A., El-Sonbaty, M.M., Youness, E.R. & Adel, A. (2014) Oxidant-antioxidant status in Egyptian children with sickle cell anemia: a single center based study. *Jornal de pediatria*, **90**, 286–292.
- Ergul, S., Parish, D.C., Puett, D. & Ergul, A. (1996) Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension*, **28**, 652–655.
- Galinanes, M. & Matata, B.M. (2002) Protein nitration is predominantly mediated by a peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leucocytes. *The Biochemical Journal*, **367**, 467–473.
- Genser, B., Cooper, P.J., Yazdanbakhsh, M., Barreto, M.L. & Rodrigues, L.C. (2007) A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunology*, **8**, 27.
- Gladwin, M.T., Sachdev, V., Jison, M.L., Shizukuda, Y., Plehn, J.F., Minter, K., Brown, B., Coles, W.A., Nichols, J.S., Ernst, I., Hunter, L.A., Blackwelder, W.C., Schechter, A.N., Rodgers, G.P., Castro, O. & Ognibene, F.P. (2004) Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, **350**, 886–895.
- Goswami, K. & Ray, D. (2011) No putative pathogenic effect of oxidative stress in sickle cell disorder. *Biomedical Research*, **22**, 23–27.
- Hannemann, A., Weiss, E., Rees, D.C., Dalibalta, S., Ellory, J.C. & Gibson, J.S. (2011) The properties of red blood cells from patients heterozygous for HbS and HbC (HbSC genotype). *Anemia*, **2011**, 248527.
- Ingram, V.M. (1959) Abnormal human haemoglobins. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **36**, 402–411.
- Johansson, L.H. & Borg, L.A. (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, **174**, 331–336.
- Kato, G.J., McGowan, V., Machado, R.F., Little, J.A., Taylor, J.T., Morris, C.R., Nichols, J.S., Wang, X., Poljakovic, M., Morris, Jr, S.M. & 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**, 2279–2285.
- 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**, 37–47.
- Kaul, D.K., Liu, X.D., Fabry, M.E. & Nagel, R.L. (2000) Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **278**, H1799–H1806.
- King, B. (2004) Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**, 737–744.
- Lapoumeroulie, C., Benkerrou, M., Odievre, 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**, 401–403.
- Lemonne, N., Romana, M., Lamarre, Y., Hardy-Dessources, M.D., Lionnet, F., Waltz, X., Tarer, V., Mouguel, D., Tressieres, B., Lalanne-Mistrih, M.L., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2014a) Association between relative systemic hypertension and otological disorders in patients with sickle cell-hemoglobin C disorder. *American Journal of Hematology*, **89**, 667.

Author contributions

BK, PC, KC, SK, MDHD, MR, SJ, SA and VP performed the research. MP, LDD and MEJ recruited the patients. PC, KC, MDHD, MR, BT and SA designed the research study. BK, PC, KC, MDHD, MR, BT, SA and VP analysed the data. BK, PC, KC, SK, MR, CM, SA and VP wrote the paper. MDHD, SJ, MP, LDD, BT, VT, OH and MEJ carefully revised the paper.

- Lemonne, N., Lamarre, Y., Romana, M., Hardy-Dessources, M.D., Lionnet, F., Waltz, X., Tarer, V., Mouguel, D., Tressieres, B., Lalanne-Mistrih, M.L., Etienne-Julan, M. & Connes, P. (2014b) Impaired blood rheology plays a role in the chronic disorders associated with sickle cell-hemoglobin C disease. *Haematologica*, **99**, 74–75.
- Lionnet, F., Hammoudi, N., Stojanovic, K.S., Avelino, V., Grateau, G., Girot, R. & Haymann, J.P. (2012) Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica*, **97**, 1136–1141.
- Minson, C.T., Berry, L.T. & Joyner, M.J. (2001) Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.:1985)*, **91**, 1619–1626.
- Misko, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M. & Currie, M.G. (1993) A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Analytical Biochemistry*, **214**, 11–16.
- Mohan, J.S., Lip, G.Y., Blann, A.D., Bareford, D. & Marshall, J.M. (2011) Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of the cutaneous circulation in sickle cell disease. *European Journal of Clinical Investigation*, **41**, 546–551.
- Morris, C.R., Kato, G.J., Poljakovic, M., Wang, X., Blackwelder, W.C., Sachdev, V., Hazen, S.L., Vichinsky, E.P., Morris, Jr, S.M. & Gladwin, M.T. (2005) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, **294**, 81–90.
- Natta, C.L., Chen, L.C. & Chow, C.K. (1990) Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematologica*, **83**, 130–132.
- Nouraei, M., Lee, J.S., Zhang, Y., Kanias, T., Zhao, X., Xiong, Z., Oriss, T.B., Zeng, Q., Kato, G.J., Gibbs, J.S., Hildesheim, M.E., Sachdev, V., Barst, R.J., Machado, R.F., Hassell, K.L., Little, J.A., Schraufnagel, D.E., Krishnamurti, L., Novelli, E., Girgis, R.E., Morris, C.R., Rosenzweig, E.B., Badesch, D.B., Lanzkron, S., Castro, O.L., Goldsmith, J.C., Gordeuk, V.R. & Gladwin, M.T.; Walk-PHASST Investigators and Patients. (2013) The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica*, **98**, 464–472.
- Nur, E., Kim, Y., Truijen, J., van Beers, E.J., Davis, S.C., Brandjes, D.P., Biemond, B.J. & van Lieshout, J.J. (2009) Cerebrovascular reserve capacity is impaired in patients with sickle cell disease. *Blood*, **114**, 3473–3478.
- Nur, E., Biemond, B.J., Otten, H.M., Brandjes, D.P. & Schnog, J.J.; CURAMA Study Group. (2011) Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *American Journal of Hematology*, **86**, 484–489.
- Oberley, L. & Spitz, D. (1985) Nitroblue tetrazolium. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, (ed. R.A. Greenwald) pp. 217–220. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA
- Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**, 351–358.
- Paglia, D.E. & Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **70**, 158–169.
- Rees, D.C., Williams, T.N. & Gladwin, M.T. (2010) Sickle-cell disease. *Lancet*, **376**, 2018–2031.
- Reiter, C.D., Wang, X., Tanus-Santos, J.E., Hogg, N., Cannon, 3rd, R.O., Schechter, A.N. & Gladwin, M.T. (2002) Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine*, **8**, 1383–1389.
- Roustit, M. & Cracowski, J.L. (2012) Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*, **19**, 47–64.
- Segal, S.S. (1994) Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. *Hypertension*, **23**, 1113–1120.
- Steinberg, M.H., Forget, B., Higgs, D. & Weatherall, D. (2009) Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, 2nd edn. Cambridge University Press, New York.
- Stuart, M.J. & Nagel, R.L. (2004) Sickle-cell disease. *Lancet*, **364**, 1343–1360.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H. & Radi, R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **6**, 662–680.
- Voskou, S., Aslan, M., Fanis, P., Phylactides, M. & Kleanthous, M. (2015) Oxidative stress in beta-thalassemia and sickle cell disease. *Redox Biology*, **6**, 226–239.
- Witko-Sarsat, V., Gausson, V. & Descamps-Latscha, B. (2003) Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney International. Supplement*, S11–S14.



Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: Blood viscosity or microvascular dysfunction?



Keyne Charlot^{a,b,c}, Marc Romana^{a,c}, Berenike Moeckesch^{a,b,c}, Stéphane Jumet^b, Xavier Waltz^{a,b,c}, Lydia Divialle-Doumido^d, Marie-Dominique Hardy-Dessources^{a,c}, Marie Petras^d, Benoît Tressières^e, Vanessa Tarer^d, Olivier Hue^b, Maryse Etienne-Julan^d, Sophie Antoine-Jonville^{b,1}, Philippe Connes^{a,c,f,g,*,1}

^a UMR Inserm U1134, Université des Antilles et de la Guyane, Hôpital de Pointe-à-Pitre, Hôpital Ricou, 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe, France²

^b Laboratoire ACTES (EA 3596), Université des Antilles et de la Guyane, UFR STAPS Campus Fouillole, BP 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe, France

^c Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (LABEX GR-Ex), PRES Sorbonne, Paris, France

^d Unité Transversale de la Drépanocytose, Hôpital de Pointe-à-Pitre, Hôpital Ricou, 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe, France²

^e Centre Investigation Clinique Antilles Guyane, 1424 Inserm, Hôpital de Pointe-à-Pitre, Hôpital Ricou, 97159, Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe, France

^f Institut Universitaire de France (IUF), Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche 1, rue Descartes, 75231 Paris Cedex 05 Paris, France

^g Laboratoire CRIS EA647, Equipe "Biologie Vasculaire et Globule Rouge", Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 8 October 2015

Accepted 26 October 2015

Available online 7 November 2015

Editor: Mohandas Narla

Keywords:

Sickle cell disease

Microcirculation

Microcirculatory oxygenation

Hemorheology

ABSTRACT

Vascular resistance and tissue perfusion may be both affected by impaired vascular function and increased blood viscosity. Little is known about the effects of vascular function on the occurrence of painful vaso-occlusive crises (VOC) in children with sickle cell anemia (SCA). The aim of the present study was to determine which side of the balance (blood viscosity or vascular function) is the most deleterious in SCA and increases the risk for frequent hospitalized VOC. Microvascular function, microcirculatory oxygenation and blood viscosity were determined in a group of 22 SCA children/adolescents at steady state and a group of 13 healthy children/adolescents. Univariate analyses demonstrated blunted microvascular reactivity during local thermal heating test and decreased microcirculatory oxygenation in SCA children compared to controls. Multivariate analysis revealed that increased blood viscosity and decreased microcirculatory oxygenation were independent risk factors of frequent VOC in SCA. In contrast, the level of microvascular dysfunction does not predict VOC rate. In conclusion, increased blood viscosity is usually well supported in healthy individuals where vascular function is not impaired. However, in the context of SCA, microvascular function is impaired and any increase of blood viscosity or decrease in microcirculatory oxygenation would increase the risks for frequent VOC.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Vaso-occlusive crises (VOC) are the most frequent complications occurring in patients with sickle cell anemia (SCA). Each painful VOC may

last for several days [1] and is caused by the physical entrapment of the rigid and adherent sickle red blood cells (RBC) into the microcirculation [2]. However, the identification of biomarkers and/or physiological factors to predict the occurrence of frequent VOC in SCA patients still remains an important challenge for physicians.

Previous studies demonstrated that SCA patients with the highest hematocrit or blood viscosity are frequently exposed to hospitalized VOC [1,3–5]. However, although blood hyper-viscosity could trigger VOC, not all the SCA patients with high blood viscosity develop VOC [6]. It is now well admitted that preserved vascular function may limit the deleterious effects of increased blood viscosity on the cardiovascular system and tissue oxygenation in the general population [7]. SCA patients are characterized by macro- [8,9] and micro-vascular [10] dysfunction, as well as decreased microcirculatory oxygenation level [11]. Basal blood flow is higher in SCA than in healthy subjects but NO-dependent vasodilation is reduced in the former population [8–10,12,13]. The role of vascular/endothelial dysfunction in pulmonary

* Corresponding author at: Laboratoire CRIS EA647, Equipe "Biologie Vasculaire et Globule Rouge", Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69100 Villeurbanne, France.

E-mail addresses: keynecharlot@gmail.com (K. Charlot), marc.romana@inserm.fr (M. Romana), berenike-moeckesch@web.de (B. Moeckesch), stephanejumet@gmail.com (S. Jumet), xavier.waltz@wanadoo.fr (X. Waltz), ldoumccd@yahoo.fr (L. Divialle-Doumido), marie-dominique.hardy-dessources@inserm.fr (M.-D. Hardy-Dessources), eleonore.petras@chu-guadeloupe.fr (M. Petras), benoit.tressieres@gmail.com (B. Tressières), vanessa.tarer@chu-guadeloupe.fr (V. Tarer), ohue@univ-ag.fr (O. Hue), maryse.etienne-julan@chu-guadeloupe.fr (M. Etienne-Julan), s.antoine@ymail.com (S. Antoine-Jonville), pconnes@yahoo.fr, philippe.connes@uiv-lyon1.fr (P. Connes).

¹ Contributed equally to this work.

² Where the study was conducted.

hypertension is somewhat well established in SCA [3] but its role in painful VOC is poorly described. Whether the level of vascular dysfunction in SCA patients may help to identify those at the highest risk to develop frequent hospitalized VOC is currently unknown.

The aim of the present study was to determine which side of the balance (blood viscosity or vascular function) is the most deleterious in SCA and increases the risk for frequent hospitalized VOC. Blood viscosity, microvascular function and microcirculatory oxygenation were determined in a group of SCA children/adolescents regularly followed at the Sick Cell Centre of Pointe-à-Pitre (Guadeloupe).

2. Patients and methods

2.1. Patients and participants

Twenty-two SCA (i.e., HbSS) children/adolescents at steady-state [4] were included in this study (age: 15.2 ± 2.3 y; height: 1.62 ± 0.12 m; weight: 50.1 ± 13.9 kg). Four patients were under hydroxyurea treatment for more than 6 months (dose ~20 mg/kg per day). Charts were retrospectively reviewed by three physicians to recognize all VOC episodes in SCA from birth to the time of the study, based on previous described criteria [4,14]. The rate of VOC [4] was calculated for each patient. Thirteen healthy children/adolescents of the same ethnic origin than the SCA group, were also included for the measurement of physiological markers only.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France, registration number: 2009-A00211-56/2013, SAPOTILLE/HYPOSAD project). Children and their parents were informed of the purpose and procedures of the study, and both gave written informed consent.

2.2. Design

Participants came in a fasted state at 9:00 a.m. Blood was drawn (for SCA patients only) by venipuncture into EDTA tubes for hematological (Beckman Coulter, MAXM AL, FL, USA) [4] and blood viscosity measurements [4,15]. Then, subjects were equipped and remained on a comfortable bed in lying position for 10 min in a quiet room with temperature fixed at ~24 °C to allow them to reach thermal equilibrium (skin temperature ~33 °C) [16]. During this period, microvascular oxygen saturation was measured with near-infrared spectroscopy (NIRS, NIRO-200, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) on the flexor digitorum superficialis muscle at the proximal third of the forearm (see [11,17] for details). Hemoglobin oxygen saturation (SpO_2) was also obtained by finger pulse oximetry (Oxycon Mobile, Jaeger, Germany). Skin blood flow was measured with a laser Doppler flowmeter (Periflux 5000 LDPM, Perimed, Järfälla, Sweden) on the left middle fingertip distal pad (Probe 457, Perimed, Järfälla, Sweden) [18]. Individual RBC flux values were divided by individual mean arterial pressure to yield individual values of cutaneous vascular conductance (CVC; mV/mm Hg) [19]. The oscillations of the skin microvascular blood perfusion signal (flowmotion and vasomotion activities) were analyzed using Matlab and Welch's method with segments of 100 s, a 50% overlap and a Hanning window [20]. The non-heating 10-min period was quickly followed by a local thermal hyperemia (LTH) test (temperature increased from 33 °C to 42 °C) for 35 min. The initial peak observed in the first 1–2 min of heating exposure was followed by a plateau reached 20–30 min later. The initial peak is considered as an axon reflex caused by the activation of afferent C-fibers during nociceptive stimulation [21, 22]. The late plateau is mainly related to NO-dependent vasodilation [22].

2.3. Statistics

Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. After Shapiro–Wilk tests, differences between groups were assessed with parametric or non-parametric tests (unpaired Student *t* test or Mann–Whitney test, respectively). Parametric (Pearson) or non-parametric (Spearman) correlation tests were used to test the associations between VOC rates and biological and physiological parameters. To identify factors associated with VOC rate in SCA children/adolescents, we used a multivariate linear regression model [4,23]. The significance level was defined as $P < 0.05$ (SPSS, v. 20, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL).

3. Results

The inclusion or exclusion of the 4 patients under hydroxyurea did not affect the results. Results below include all the patients.

3.1. Biological parameters

Hematological and blood viscosity characteristics of SCA patients are displayed in Table 1 and are in the same range of values previously described in SCA children/adolescents [24].

3.2. Microvascular function

Analyses showed that basal microvascular blood flow was higher ($+57.9\%$; $P = 0.002$; $ES = 0.38$; 95% confidence interval [CI], 0.13 to 2.39; Figure A) and vascular reactivity assessed by LTH test was lower in SCA than in controls. Peak and plateau microvascular blood flow reached during LTH (expressed in $\%CVC_{BL}$) were 68.5% ($P = 0.027$; $ES = 0.39$; 95% CI, 0.06 to 4.39) and 82.8% ($P = 0.001$; $ES = 0.44$; 95% CI, 0.34 to 4.35) lower in SCA compared to controls, respectively (Fig. 1). In contrast, neither flowmotion, nor vasomotion activity differed between SCA and controls: the power of each band frequency was not significantly different between the two groups (Fig. 2)..

3.3. Systemic and microvascular oxygenation

SpO_2 and microvascular oxygenation were lower in SCA than in controls (-3.3% , $P = 0.002$; $ES = 0.57$; 95% CI, 1.75 to 4.87 and -15.3% , $P < 0.001$; $ES = 0.70$; 95% CI, 6.99 to 15.36, respectively; Fig. 3). These two parameters were not correlated ($r = 0.057$, $P = 0.401$).

3.4. Associations between VOC rates and biological/physiological parameters in SCA

VOC rate was positively correlated with blood viscosity ($r = 0.407$, $P = 0.034$) and microvascular oxygenation ($r = -0.425$, $P = 0.024$) but not with baseline flow (CVC_{BL}) ($r = 0.012$, $P = 0.480$) or vascular

Table 1

Participants characteristics and hematological and hemorheological data of SCA children.

	Controls (n = 13)	SCA (n = 22)
Gender (male/female)	6/7	13/9
Age (y)	14.5 (3.2)	15.2 (2.3)
Height (m)	1.63 (0.15)	1.62 (0.12)
Weight (cm)	51.8 (16.5)	50.1 (13.9)
Mean VOC rate (episode/y)	–	0.39 (0.36)
Fetal hemoglobin (%)	–	7.92 (5.92)
Red blood cells count ($10^{12}/l$)	–	3.09 (0.83)
Hemoglobin concentration ($g \cdot dl^{-1}$)	–	8.42 (1.28)
Hematocrit (%)	–	25.4 (3.9)
Lactate dehydrogenase (IU)	–	541 (177)
Blood viscosity ($mPa \cdot s^{-1}$)	–	4.89 (0.81)

Mean (SD). VOC = vaso-occlusive crises.

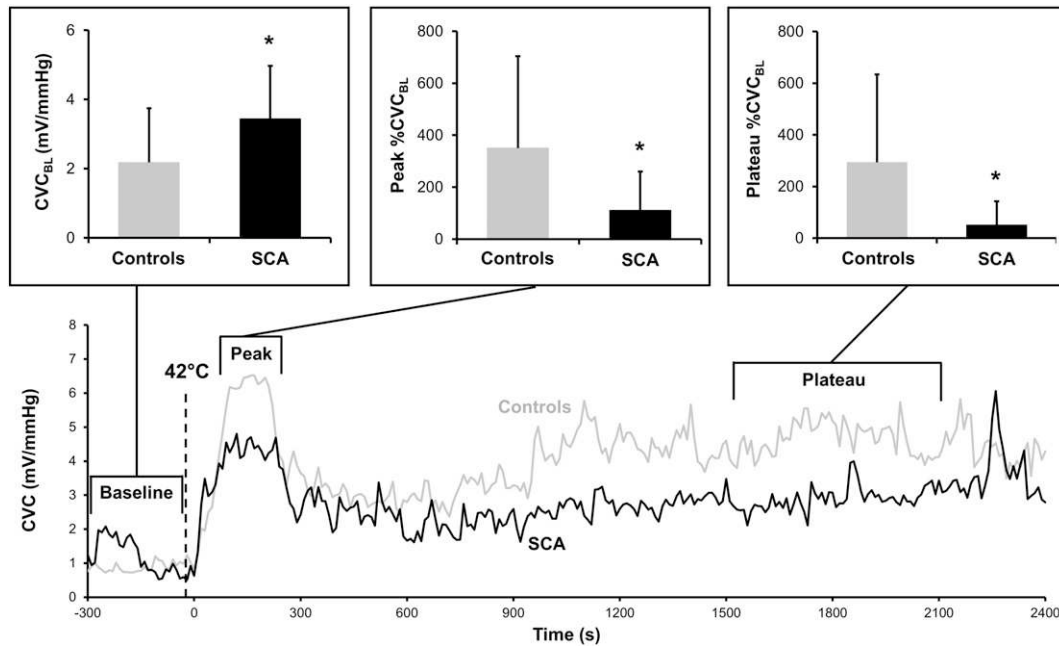


Fig. 1. Skin blood flow at steady-state and during a local thermal heating assessed by laser-Doppler flowmetry in children/adolescents with sickle cell anemia (SCA) and healthy control individuals (controls). CVC_{BL}: Cutaneous vascular conductance at baseline; %CVC_{BL} reflects the magnitude of the microcirculatory blood flow increase during the peak (Peak %CVC_{BL}) or during the plateau (Plateau %CVC_{BL}) of the local thermal heating stimulus. Examples of changes in skin blood flow during local thermal heating are shown for 2 representative individuals: 1 Control and 1 SCA children. *Significantly different from controls ($P < 0.05$).

reactivity ($r = -0.066$, $P = 0.394$ for peak vasodilation during LTH, and $r = -0.118$, $P = 0.315$ for the vasodilation reached during the plateau of LTH).

Blood viscosity and microvascular oxygenation were used as covariates in a binary multivariate logistic model to predict VOC rates. The overall model was statistically significant ($R^2 = 0.381$, $df = 2,18$, $P = 0.013$). Blood viscosity ($\beta = 0.488$; $P = 0.018$) and microvascular oxygenation ($\beta = -0.471$; $P = 0.022$) were independently associated with VOC rates. The inclusion of potential confounders (age and sex) in the model did not affect the results with blood viscosity still being independently associated with VOC rates ($\beta = 0.497$; $P = 0.023$) and microvascular oxygenation showing a marginal significant association with VOC rates ($\beta = -0.428$; $P = 0.054$).

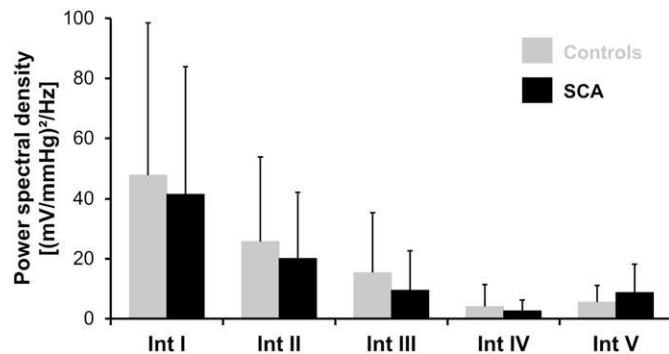


Fig. 2. Five intervals of skin blood flowmotion at steady-state in children/adolescents with sickle cell anemia (SCA) and healthy control individuals (controls). Each interval has physiological significance: I) vascular endothelium activity (0.009–0.02 Hz), II) local sympathetic activity (0.02–0.06 Hz), III) myogenic activity (0.06–0.2 Hz), IV) respiration (0.2–0.6 Hz) and V) transmission to the skin microcirculation of the hemodynamic modifications caused by heart activity (0.6–1.6 Hz) (see 20 for details). The sum of the first 3 intervals (0.009–0.2 Hz) is considered to represent vasomotion activity. The total spectrum corresponds to the flowmotion activity.

4. Discussion

This study is the first one to investigate both blood viscosity and microvascular function in the same time in a group of SCA children/adolescents. Our results confirmed that microvascular reactivity is blunted in SCA compared to healthy children. However, the level of microvascular dysfunction (Peak or Plateau %CVC_{BL}) does not predict the occurrence of frequent VOC. Instead, increased blood viscosity seems to be an independent risk factor of frequent VOC. In addition, our findings also support a key role of microvascular oxygenation, independently of blood viscosity, on the occurrence of frequent VOC.

Tissue oxygen consumption has recently been reported to be increased in SCA compared to healthy individuals at steady-state and during VOC [25]. This difference is attributable to the high levels of inflammation and oxidative stress [25], the reduced hemoglobin S affinity for oxygen and the highest baseline blood flow in SCA [26]. This higher tissue oxygen consumption would lead to a large decrease of the microvascular oxygenation level, as observed in SCA children in our study. Our findings clearly demonstrate an independent association between the level of microvascular oxygenation and VOC rate in SCA

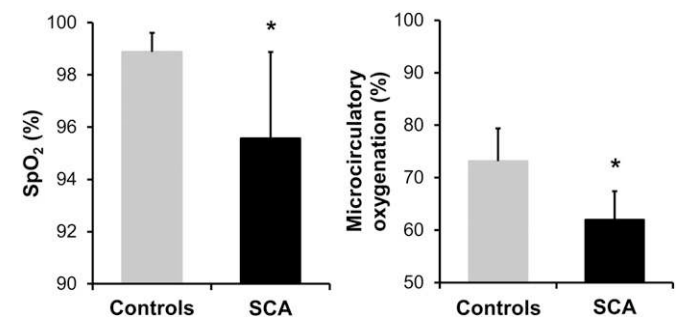


Fig. 3. Peripheral oxygen saturation (SpO₂) and microvascular oxygenation, assessed with near infrared spectroscopy, in steady-state in children/adolescents with sickle cell anemia (SCA) and healthy control individuals (controls). *Significantly different from controls ($P < 0.05$).

children/adolescents. SpO₂ was also reduced in SCA compared to controls but the difference between the two populations did not explain the difference in microvascular oxygenation, and SpO₂ level did not correlate with VOC rate. We hypothesize that the lower microvascular oxygenation level could promote RBC sickling in these vascular areas, hence increasing the risks for VOC occurrence when associated with stressful physiological situations.

Spectral analysis of the blood flow signal, notably in the frequency interval 0.009–0.02 Hz, has been proposed to be useful to quantify the endothelial function in several diseases [27,28]. Vasomotion is considered to favor the optimal distribution of blood flow in the skin microvascular bed [20,29]. However, this compensatory mechanism via rhythmic contraction and dilation of skin microvessels seems to be observable only when blood flow is weak [20,30], which is not the case in SCA. Indeed, neither flowmotion nor vasomotion activity was different between SCA and control subjects. In contrast, microvascular reactivity assessed by LTH was blunted in SCA compared to control children, which is in agreement with previous studies focusing on arterial vessels or microcirculation [8,10,13]. As suggested by the findings of Brunt and Minson [31], the increased level of reactive oxygen species in SCA [32] probably played a role in the decreased microvascular reactivity observed during the plateau phase of the LTH.

Interestingly, the initial skin blood flow response (i.e., the peak) during LTH was also blunted in SCA compared to control children. The magnitude of this initial response depends on the level of activation of the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels, which are strongly expressed in nociceptive primary afferent neurons of the peripheral nervous system [33] and seem to play a key role in pain modulation in SCA [34]. It would be interesting to test whether the magnitude of the initial response during LTH correlates with the level of pain in SCA patients with chronic and unmanageable pain [34].

Impaired vascular/endothelial function participates in the pathophysiology of SCA and in the progression of the disease [3]. Vascular reactivity to NO has been found impaired in SCA compared to healthy controls [35]. Increased oxidative stress and chronic hemolysis are involved in the development of chronic vasculopathy and the loss of vasodilatory reserve [3,36]. Our findings demonstrated that the level of microvascular dysfunction does not allow the prediction of frequent VOC in SCA children, and the repetition of frequent VOC does not seem to cause greater alteration of the microvascular function compared to patients with rare VOC (at least in children/adolescents). This is in agreement with the model proposed by Kato et al. [3] which predicts that vascular dysfunction would predispose to pulmonary hypertension, stroke, leg ulcers and priapism, but not VOC. In contrast, our study clearly showed that VOC rate was independently associated with the level of blood viscosity. Increased blood viscosity may not be as deleterious as it is often thought if the vascular function is not impaired [37]. Most of the time, a mild rise in blood viscosity is very well supported by the cardiovascular system in healthy individuals because the consecutive increase of shear stress (i.e., the product of shear rate by blood viscosity) stimulates endothelial cells to produce NO and promote vasodilation [38]. Altogether, our findings support the fact that while all SCA children/adolescents have impaired microvascular function, those with the highest blood viscosity are at greatest risk to develop frequent VOC.

5. Conclusion

Our study demonstrated that although SCA children/adolescents have impaired microvascular reactivity, not only increased blood viscosity but also reduced microvascular oxygenation are the most important factors in promoting frequent vaso-occlusive crises in this population.

Acknowledgments

XV, MDHD, MR, SAJ and PC designed the study. KC, BM, SJ, SAJ and PC designed the data collection instruments, and coordinated and

supervised data collection. KC, BM, SJ, LDD, MP, BT, VT, SAJ and PC carried out the study. KC and PC conducted the statistical analyses. KC, MR and PC drafted the initial manuscript. All authors reviewed and revised the manuscript, approved the final manuscript as submitted and agreed to be accountable for all aspects of the work.

KC, BK, SJ and XW were funded by the Region de Guadeloupe for their PhD or post-doc position. All authors have indicated that they have no financial relationships relevant to this article to disclose and no conflict of interest.

The authors would like to express their sincere gratitude to all the patients who accepted to participate in the study. The authors would like to thank Pr Gregory J Kato for useful comments on our manuscript.

References

- [1] O.S. Platt, B.D. Thorington, D.J. Brambilla, P.F. Milner, W.F. Rosse, E. Vichinsky, et al., Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 11–16, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199107043250103>.
- [2] M.T. Gladwin, E. Vichinsky, Pulmonary complications of sickle cell disease, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 2254–2265, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0804411>.
- [3] G.J. Kato, M.T. Gladwin, M.H. Steinberg, Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes, *Blood Rev.* 21 (2007) 37–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2006.07.001>.
- [4] Y. Lamarre, M. Romana, X. Waltz, M.-L. Lalanne-Mistrih, B. Tessières, L. Divialle-Doumido, et al., Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease, *Haematologica* 97 (2012) 1641–1647, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2012.066670>.
- [5] D. Nebor, A. Bowers, M.-D. Hardy-Dessources, J.M. Knight-Madden, M. Romana, H. Reid, et al., Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation, *Haematologica* 96 (2011) 1589–1594, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.047365>.
- [6] P. Connes, Y. Lamarre, X. Waltz, S.K. Ballas, N. Lemonne, M. Etienne-Julan, et al., Hemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia, *Br. J. Haematol.* 165 (2014) 564–572, <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12786>.
- [7] M.J. Simmonds, J.A. Detterich, P. Connes, Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell, *Biorheology* 51 (2014) 121–134, <http://dx.doi.org/10.3233/BIR-140653>.
- [8] L. Belhassen, G. Pelle, S. Sediame, D. Bachir, C. Carville, C. Bucherer, et al., Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation, *Blood* 97 (2001) 1584–1589 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238095> (accessed December 8, 2014)).
- [9] A. Blum, S. Yeganeh, A. Peleg, F. Vigder, K. Kryuger, A. Khatib, et al., Endothelial function in patients with sickle cell anemia during and after sickle cell crises, *J. Thromb. Thrombolysis* 19 (2005) 83–86, <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-005-1377-7>.
- [10] P.L. Tharoux, R. Giro, A. Kanfer, J.C. Dussault, J.P. Gaitz, L. Tribout, et al., Cutaneous microvascular blood flow and reactivity in patients with homozygous sickle cell anaemia, *Eur. J. Haematol.* 68 (2002) 327–331 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12225389> (accessed December 8, 2014)).
- [11] X. Waltz, A. Pichon, D. Mougenel, N. Lemonne, M.-L. Lalanne-Mistrih, S. Sinnapah, et al., Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients, *Am. J. Hematol.* 87 (2012) 1070–1073, <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23318>.
- [12] A. Aessopos, D. Farmakis, M. Tsironi, E. Diamanti-Kandarakis, M. Matzourani, C. Fragodimiri, et al., Endothelial function and arterial stiffness in sickle-thalassemia patients, *Atherosclerosis* 191 (2007) 427–432, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.015>.
- [13] M. de Montalembert, Y. Aggoun, A. Niakate, I. Szezepanski, D. Bonnet, Endothelial-dependent vasodilation is impaired in children with sickle cell disease, *Haematologica* 92 (2007) 1709–1710, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.11253>.
- [14] X. Waltz, M. Romana, M.-D. Hardy-Dessources, Y. Lamarre, L. Divialle-Doumido, M. Petras, et al., Hematological and hemorheological determinants of the six-minute walk test performance in children with sickle cell anemia, *PLoS ONE* 8 (2013), e77830, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077830>.
- [15] O.K. Baskurt, M. Boynard, G.C. Cokelet, P. Connes, B.M. Cooke, S. Forconi, et al., New guidelines for hemorheological laboratory techniques, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 42 (2009) 75–97, <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2009-1202>.
- [16] N.M. Navasoliava, F. Dignat-George, F. Sabatier, I.M. Larina, C. Demiot, J.-O. Fortrat, et al., Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299 (2010) H248–H256, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00152.2010>.
- [17] M. Ferrari, L. Mottola, V. Quaresima, Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy, *Can. J. Appl. Physiol.* 29 (2004) 463–487 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328595> (accessed February 10, 2015)).
- [18] M. Roustic, J.-L. Cracowski, Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods, *Microcirculation* 19 (2012) 47–64, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x>.
- [19] A. Boignard, M. Salvat-Melis, P.H. Carpentier, C.T. Minson, L. Grange, C. Duc, et al., Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon, *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) R1103–R1112, <http://dx.doi.org/10.1186/ar1785>.
- [20] M. Rossi, A. Carpi, C. Di Maria, F. Galetta, G. Santoro, Spectral analysis of laser Doppler skin blood flow oscillations in human essential arterial hypertension, *Microvasc. Res.* 72 (2006) 34–41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2006.04.001>.

- [21] C.-S. Huang, S.-F. Wang, Y.-F. Tsai, Axon reflex-related hyperemia induced by short local heating is reproducible, *Microvasc. Res.* 84 (2012) 351–355, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2012.07.003>.
- [22] C.T. Minson, L.T. Berry, M.J. Joyner, Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating, *J. Appl. Physiol.* 91 (2001) 1619–1626 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568143> (accessed February 10, 2015)).
- [23] J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd Ed. Lawrence Erlbaum Assoc., Hillsdale, 1988 (567 pp.).
- [24] X. Waltz, M. Romana, M.-L. Lalanne-Mistrih, R.F. Machado, Y. Lamarre, V. Tarer, et al., Hematologic and hemorheological determinants of resting and exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease, *Haematologica* 98 (2013) 1039–1044, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2013.083576>.
- [25] C.A. Rowley, A.K. Ikeda, M. Seidel, T.C. Anaebere, M.D. Antalek, C. Seamon, et al., Microvascular oxygen consumption during sickle cell pain crisis, *Blood* 123 (2014) 3101–3104, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-11-533406>.
- [26] X. Waltz, A. Pichon, N. Lemonne, D. Mougenel, M.-L. Lalanne-Mistrih, Y. Lamarre, et al., Normal muscle oxygen consumption and fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities, *PLoS ONE* 7 (2012) e52471, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052471>.
- [27] M. Rossi, F. Pistelli, M. Pesce, F. Aquilini, F. Franzoni, G. Santoro, et al., Impact of long-term exposure to cigarette smoking on skin microvascular function, *Microvasc. Res.* 93 (2014) 46–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2014.03.001>.
- [28] M. Rossi, A. Carpi, C. Di Maria, F. Franzoni, F. Galetta, G. Santoro, Skin blood flowmotion and microvascular reactivity investigation in hypercholesterolemic patients without clinically manifest arterial diseases, *Physiol. Res.* 58 (2009) 39–47 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198995> (accessed February 19, 2015)).
- [29] A. Bollinger, A. Yanar, U. Hoffman, U. Franzeck, Is High Frequency Fluxmotion due to Respiration or to Vasomotion Activity? *Prog. Appl. Microcirc.*, Karger, 1993 52–58.
- [30] D. Parthimos, D.H. Edwards, T.M. Griffith, Comparison of chaotic and sinusoidal vasomotion in the regulation of microvascular flow, *Cardiovasc. Res.* 31 (1996) 388–399 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681326> (accessed February 12, 2015)).
- [31] V.E. Brunt, C.T. Minson, Cutaneous thermal hyperemia: more than skin deep, *J. Appl. Physiol.* 111 (2011) 5–7, <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.00544.2011>.
- [32] A.K. Mack, G.J. Kato, Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (2006) 1237–1243, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.01.010>.
- [33] B.J. Wong, S.M. Fieger, Transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV-1) channels contribute to cutaneous thermal hyperaemia in humans, *J. Physiol.* 588 (2010) 4317–4326, <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2010.195511>.
- [34] S.K. Ballas, K. Gupta, P. Adams-Graves, Sickle cell pain: a critical reappraisal, *Blood* 120 (2012) 3647–3656, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-04-383430>.
- [35] M.T. Gladwin, A.N. Schechter, F.P. Ognibene, W.A. Coles, C.D. Reiter, W.H. Schenke, et al., Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease, *Circulation* 107 (2003) 271–278 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538427> (accessed March 20, 2015)).
- [36] C.D. Reiter, X. Wang, J.E. Tanus-Santos, N. Hogg, R.O. Cannon, A.N. Schechter, et al., Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease, *Nat. Med.* 8 (2002) 1383–1389, <http://dx.doi.org/10.1038/nm799>.
- [37] A.G. Tsai, C. Acero, P.R. Nance, P. Cabrales, J.A. Frangos, D.G. Buerk, et al., Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 (2005) H1730–H1739, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00998.2004>.
- [38] P. Connes, Obstructive sleep apnea and sickle cell disease: towards hemorheological abnormalities and vascular dysfunction worsening, *Sleep Med. Rev.* 24C (2015) 101–102.

Physical Activity Level Is Not a Determinant of Autonomic Nervous System Activity and Clinical Severity in Children/Adolescents With Sickle Cell Anemia: A Pilot Study

Keyne Charlot, PhD,^{1,2,3} Berenike Moeckesch, MSc,^{1,2,3} Stéphane Jumet, MSc,² Marc Romana, PhD,^{1,3} Xavier Waltz, PhD,^{1,2,3} Lydia Divialle-Doumbo, MD,⁴ Marie-Dominique Hardy-Dessources, PhD,^{1,3} Marie Petras, MD,⁴ Benoît Tressières, MSc,⁵ Aurélien Pichon, PhD,⁶ Vanessa Tarer, PhD,⁴ Olivier Hue, PhD,² Maryse Etienne-Julan, MD, PhD,⁴ Sophie Antoine-Jonville, PhD,² and Philippe Connes, PhD^{1,3,7,8*}

Background. Autonomic nervous system (ANS) activity has been suggested to modulate the clinical severity of sickle cell anemia (SCA) by increasing the risk for vaso-occlusive events. Regular physical activity (PA) is known to improve ANS activity and health status in several cardiovascular and metabolic diseases. Whether regular PA improves the health status of SCA patients remains unknown. **Procedure.** Twenty-two patients with SCA and 15 healthy (AA) children/adolescents participated to the study. Heart rate variability was measured in supine position and after a tilt-test to quantify the ANS activity. PA energy expenditure (PAEE) was assessed with questionnaire. **Results.** 1) PAEE was lower in SCA compared to AA

(190 ± 152 vs. 432 ± 277 kcal·d⁻¹, respectively, $P < 0.01$), 2) overall ANS activity was lower in SCA compared to AA, 3) parasympathetic withdrawal was observed in SCA with aging, 4) ANS reactivity was slightly impaired in SCA compared to AA (reduction in HFnu: -38 ± 27 vs. $-58 \pm 14\%$, respectively, $P < 0.05$), 5) ANS indices, PAEE, and rates of clinical events were not correlated. **Conclusion.** Both the level of PA and ANS activity are reduced in SCA compared to AA children/adolescents, particularly in those older than 15 years. Neither PAEE, nor ANS activity seem to influence the clinical severity of children/adolescents with SCA. *Pediatr Blood Cancer* © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: acute chest syndrome; heart rate variability; physical activity energy expenditure; sickle cell disease; vaso-occlusive crises

INTRODUCTION

The identification of physiological and/or biological markers that could help in predicting the occurrence of acute complications in cardiovascular diseases, as well as in the general population, is an important medical challenge. In that way, it is now well accepted that altered autonomic nervous system (ANS) activity is a powerful and independent predictor of an adverse prognosis in patients with heart disease and several other disorders.[1] Using heart rate variability (HRV) analyses, several studies investigated the autonomic nervous system (ANS) activity in sickle cell anemia (SCA).[2] Autonomic imbalance caused by parasympathetic withdrawal at rest[3–5] and impaired autonomic reactivity during different challenges[6–8] have been reported in this population and the degree of impairment has been associated with the clinical severity.[4,9,10] For instance, adults with SCA at high risk for vaso-occlusive crises (VOC) and acute chest syndrome (ACS) have lower ANS activity than those with a mild clinical phenotype.[4,10]

In healthy individuals, free-living physical activity energy expenditure (PAEE) is positively associated with ANS activity and especially parasympathetic nervous system (PNS) activity.[11–13] Regular physical activity increases PNS activity, which protects individuals from the development of cardiovascular diseases,[14] while inactivity causes ANS activity imbalance which may promote the development of cardiovascular disorders and inflammatory syndromes.[15,16] Strenuous exercise must clearly be avoided in SCA since it may trigger severe vaso-occlusive like complications.[17] However, recent experiments conducted in a murine model of SCA (SAD mice) suggest that spontaneous and regular physical activity could be beneficial on the clinical course of this disease.[18–20] No study investigated the associations between regular physical activity, ANS activity, and clinical severity in patients with SCA. We hypothesized that low levels of physical activity would be associated with exacerbated ANS dysfunction and poor health

status in patients with SCA. To answer this question, we investigated HRV and PAEE in a group of 22 children with SCA regularly followed since birth at the Sickle Cell Center of Guadeloupe.

Abbreviations: ACS, acute chest syndrome; ANS, autonomic nervous system; HF, high-frequencies in ms²; HFnu, high-frequencies in normalized units; HRV, heart rate variability; LF, low-frequencies; PAEE, physical activity energy expenditure; PNS, parasympathetic nervous system; REE, resting energy expenditure; RRI, R-R interval; SCA, sickle cell anemia; SNS, sympathetic nervous system; TEE, total energy expenditure; TP, total power; VOC, vaso-occlusive crisis

¹UMR Inserm U1134, French West Indies and Guiana University, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France; ²Laboratory ACTES (EA 3596), Department of Physiology, French West Indies and Guiana University, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France; ³Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (LABEX GR-Ex) PRES Sorbonne, Paris, France; ⁴Sickle Cell Center, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France; ⁵Centre Investigation Clinique Antilles Guyane 1424 Inserm, Academic Hospital of Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France; ⁶Laboratory MOVE, EA6314, University of Poitiers, Poitiers, France; ⁷Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France; ⁸Laboratory CRIS EA647, Section Vascular Biology and Red Blood Cell, University of Lyon, Lyon, France

Sophie Antoine-Jonville and Philippe Connes contributed equally to this work.

Conflict of interest: Nothing to declare.

*Correspondence to: Philippe Connes, UMR Inserm U1134, French West Indies and Guiana University, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France. E-mail: pconnes@yahoo.fr

Received 19 March 2015; Accepted 28 April 2015

METHODS

Subjects

Twenty-two children/adolescents with SCA (all were HbSS; age range: 10–18 years) at steady-state (no blood transfusion in the previous three months, absence of acute episodes of infection, VOC or ACS at least 1 month before inclusion into the study) were included in this study. Four patients were under hydroxyurea treatment for more than 6 months (dose ~20 mg/kg per day). Charts were retrospectively reviewed by three physicians to recognize all ACS and hospitalized VOC episodes in patients with SCA from birth to the time of the study, based on previous described criteria. [21,22] An acute event was considered a VOC if the painful episode lasted for more than 4 hr, the patient felt that the pain was typical of that of vaso-occlusion, no other etiology of pain could be identified by the physicians, and the patient was admitted to the Accident and Emergency Pediatric Department to treat the pain with parenteral opioids. ACS was defined as the appearance of a new infiltrate on chest radiograph, associated with one or more clinical symptoms such as chest pain, respiratory distress, fever, and cough. The rates of ACS and VOC were calculated for each child by dividing the total number of ACS or painful VOC episodes by the number of patient-years. A group of 15 healthy children/adolescents (AA) was included to get normal values for the different physiological markers measured. All participants' characteristics are displayed in Table I. The study was conducted in accordance to the Declaration of Helsinki and was approved by the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France, registration number: 2009-A00211-56/2013, SAPOTILLE/HYPOSNAD project). Children and their parents were informed of the purpose and procedures of the study, and both gave written informed consent. Eighteen-year-old participants gave their consent alone.

Hematological Measurements

Blood was drawn by venipuncture into EDTA tubes and used for measurements of hematological parameters in children/adolescents with SCA as previously described.[21] No biological measurement of AA individuals was performed in that study since previous studies already focused on the hematological difference between healthy subjects and SCA patients. Serum lactate dehydrogenase concentrations were determined by standard biochemical methods. Fetal hemoglobin level was determined using cation-exchange high performance liquid chromatography (VARIANTTM, Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA) and hematological data were obtained with an automated cell counter (Beckman Coulter MAXM AL, FL).

Heart Rate Variability (HRV) and ANS Indices

One hour after a light and standardized meal taken at the hospital and on the same day as blood sampling, participants were equipped with a heart-rate monitor (Suunto Ambit, Vantaa, Finland). After 15 min at rest, R-R intervals (RRI or beat-to-beat intervals) were recorded for 10 min in a lying position on a comfortable bed. Then, AA and SCA participants had to get up rapidly (in less than 2 sec) and remained in a standing position for 10 min (head up tilt-test). Two 5 min samples containing each 512-RRI (this sample size was used according to the Task Force recommendations[23]) were selected: the last 5 min period in the lying position and the first 5 min period in the standing position. These samples were screened for artifacts (less than 1% of total RRIs) that were replaced by the mean of the two neighbors RR.[5] A power spectral analysis (Fast-Fourier Transform) of HRV was performed with the HRV Analysis Software 2.1 for Windows[24] in order to provide information on the power distribution across different ranges of frequencies (low and high frequencies, LF and HF, respectively) that each give particular information on ANS activity.[23] Total power (TP) in the frequency range (0.04–0.40 Hz) was divided into LF (0.04–0.15 Hz) and HF (0.15–0.40 Hz) bands. The LF/HF ratio and HF in normalized units ($HFnu = HFms^2 / (LFms^2 + HFms^2) \times 100$) were also calculated. TP is known to reflect global autonomic activity, LF both sympathetic and parasympathetic activities and HF the parasympathetic activity.[24,25] The LF/HF ratio and HFnu are used as a broad index of “sympathovagal balance.”[24] The participants breathed spontaneously but reproducibility has been shown to be similar between spontaneous[26] and paced breathing techniques.[27] Respiratory frequency was measured for each individual and values (range: 17–22 breaths·min⁻¹) were all comprised in the HF band (0.15–0.40 Hz). The relative difference between the lying-to-standing positions was measured for each HRV indices.

Physical Activity Questionnaire for Adolescents

The International Physical Activity Questionnaire adapted for adolescents[28] was used in this study. The questionnaire investigated physical activities related to the mode of transportation to-and-from school (walk, bicycle, car, or bus), physical activities inside and outside school settings, as well as leisure-time activities

TABLE I. Characteristics of the Children With and Without Sickle Cell Anemia (SCA vs. AA)

	AA (n = 15)	Normal value in AA children	SCA (n = 22)
Males/females	7/8	—	13/9
Age (years)	14.3 ± 2.9	—	15.1 ± 2.3
Height (cm)	162 ± 14	—	162 ± 11
Weight (kg)	50.1 ± 15.9	—	49.6 ± 13.9
Body mass index (kg·m ⁻²)	18.7 ± 3.4	—	18.6 ± 4.0
Hemoglobin (g·dl ⁻¹)	—	≈13 [47–49]	8.43 ± 1.31
Fetal hemoglobin (%)	—	<1.5 [47, 48]	7.97 ± 6.06
Lactate dehydrogenase (U·l ⁻¹)	—	≈200 [47–49]	545 ± 180
VOC rate (years ⁻¹)	—	—	0.39 ± 0.37
ACS rate (years ⁻¹)	—	—	0.14 ± 0.14

Mean ± SD. VOC, vaso occlusive crises; ACS, acute chest syndrome.

to estimate low intensity physical activity energy expenditure and moderate to intense physical activity (PAEE in $\text{kcal}\cdot\text{d}^{-1}$ and $\text{kcal}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). Resting EE (REE in $\text{kcal}\cdot\text{d}^{-1}$) was calculated using Buchowski et al.[29] equations validated for patients with SCA. Total energy expenditure (TEE) was defined as the sum of PAEE and REE.

Statistics

The results are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Differences between groups (SCA vs. AA) were assessed with parametric or non-parametric tests (unpaired Student *t*-test or Mann–Whitney test, respectively) according to the normality of data distribution assessed by Shapiro–Wilk tests. To identify the associations between PAEE, VOC and ACS rates, ANS indices, and hematological parameters, we used parametric or non-parametric correlation tests (Pearson or Spearman, respectively) in each group (SCA and AA). The significance level was defined as $P < 0.05$. Analyses were conducted using SPSS (v. 20, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL).

RESULTS

Analyses showed that PAEE in absolute ($-211 \text{ kcal}\cdot\text{d}^{-1}$, -51% ; $P = 0.004$; Fig. 1) or relative values (8.7 ± 5.4 vs. $4.3 \pm 3.7 \text{ kcal}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $P = 0.005$) was lower and REE higher in SCA than in AA children ($1,555 \pm 215$ vs. $1,288 \pm 212 \text{ kcal}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively; $P = 0.005$) while TEE was not different between the two groups. No correlation was observed between the level of anemia (i.e., hemoglobin level) and PAEE in relative ($\rho = 0.069$; $P = 0.77$) and absolute values ($\rho = 0.030$, $P = 0.899$) in SCA. TP ($-1,034 \text{ ms}^2$; -41% ; $P = 0.048$) and LF (-836 ms^2 ; -67% ; $P = 0.003$) were lower and HFnu ($+8.5 \text{ nu}$; $+16.6\%$; $P = 0.027$) higher in lying position in SCA than in AA (Fig. 2). The change in HFnu between the lying and standing positions was of lower magnitude in SCA compared to AA ($P < 0.05$; Table II).

No association was detected between VOC or ACS rates and ANS indices or PAEE in SCA while in AA, PAEE was positively correlated with some indices of HRV (RRI, $\rho = 0.582$, $P = 0.029$ and LF, $\rho = 0.560$, $P = 0.037$ in absolute values and TP, $\rho = 0.547$, $P = 0.043$ and LF $\rho = 0.798$, $P = 0.001$). Moreover, age was associated with ANS activity in patients with SCA (TP: $\rho = -0.499$, $P = 0.021$; HF: $\rho = -0.496$; $P = 0.022$; HFnu: $\rho = -0.513$, $P = 0.017$; LF/HF: $\rho = 0.496$, $P = 0.022$) suggesting that aging could modulate ANS activity in these patients. Participants were then separated according to the median age: i.e., 15 years old in each group (Table III). Statistical analysis revealed that neither TEE,

PAEE, nor HRV indices were different between the two AA age sub-groups. In contrast TP ($P = 0.046$), HF ($P = 0.048$), and HFnu ($P = 0.013$) were lower and LF/HF ($P = 0.010$) was higher in SCA ≥ 15 years old compared to the youngest patients.

DISCUSSION

We hypothesized that ANS indices, PAEE, and VOC/ACS rates could be associated in children/adolescents with SCA. We showed that 1) spontaneous PAEE in SCA was lower than in AA, 2) overall ANS activity was lower in SCA than in AA, 3) ANS reactivity during a tilt test was slightly impaired in SCA, 4) ANS activity was affected by age only in SCA, and 5) none of the ANS indices correlated with PAEE, VOC, or ACS rates in children/adolescents with SCA.

Our finding showing higher REE in SCA than in AA is consistent with previous reports.[30–33] The higher cardiac output required to compensate for the low oxygen-carrying capacity participates to the higher REE in SCA.[30] In addition, the high protein turnover to replace senescent and altered red blood cells in SCA also consumes energy. Despite the higher REE observed in the SCA group, TEE was similar in the two populations; a finding previously reported as well.[30] This result may be explained by the compensatory decrease in PAEE observed in patients with SCA, as assessed by various techniques such as double labeled water, accelerometer, or physical activity questionnaires.[30,32,33] Buchowski et al.[29] attributed this low level of physical activity to chronic anemia. The lack of significant association between hemoglobin level and PAEE in SCA in our study suggests that other factors are also at the origin of the low PAEE in this population such as muscular, cardiac, and pulmonary limitations.[17] Moreover, PAEE as assessed by the questionnaire is mainly influenced by physical activity during physical education courses and leisure activities outside schools. Given that intense exercise is known to induce important metabolic changes that could be detrimental for individuals with SCA,[17] and that no consensus exists on the maximal safe exercise intensity they may support, health care providers and/or parents may discourage children to engage in any physical activities[34] hence, explaining the low PAEE in this population.

PAEE in healthy children/adolescents was positively correlated with some HRV indices (RRI and LF) but not with the parasympathetic ones confirming that whole ANS activity but not the parasympathetic activity, is improved by mild-to-moderate regular physical activity.[11] Vagal-related ANS activity improvement requires high training volumes in healthy population, like those reached in trained sportsmen and women.[11] In

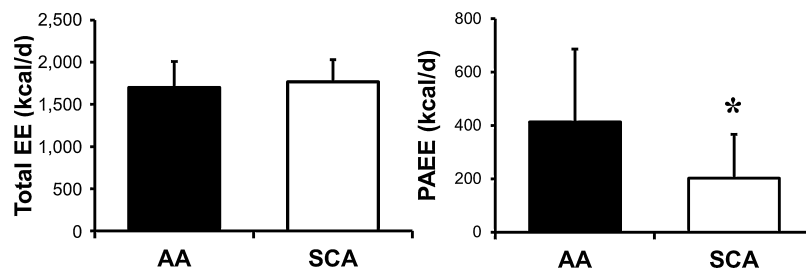


Fig. 1. Total energy expenditure (TEE) and physical activity energy expenditure (PAEE) in SCA and AA children. *Significantly different from AA ($P < 0.05$).

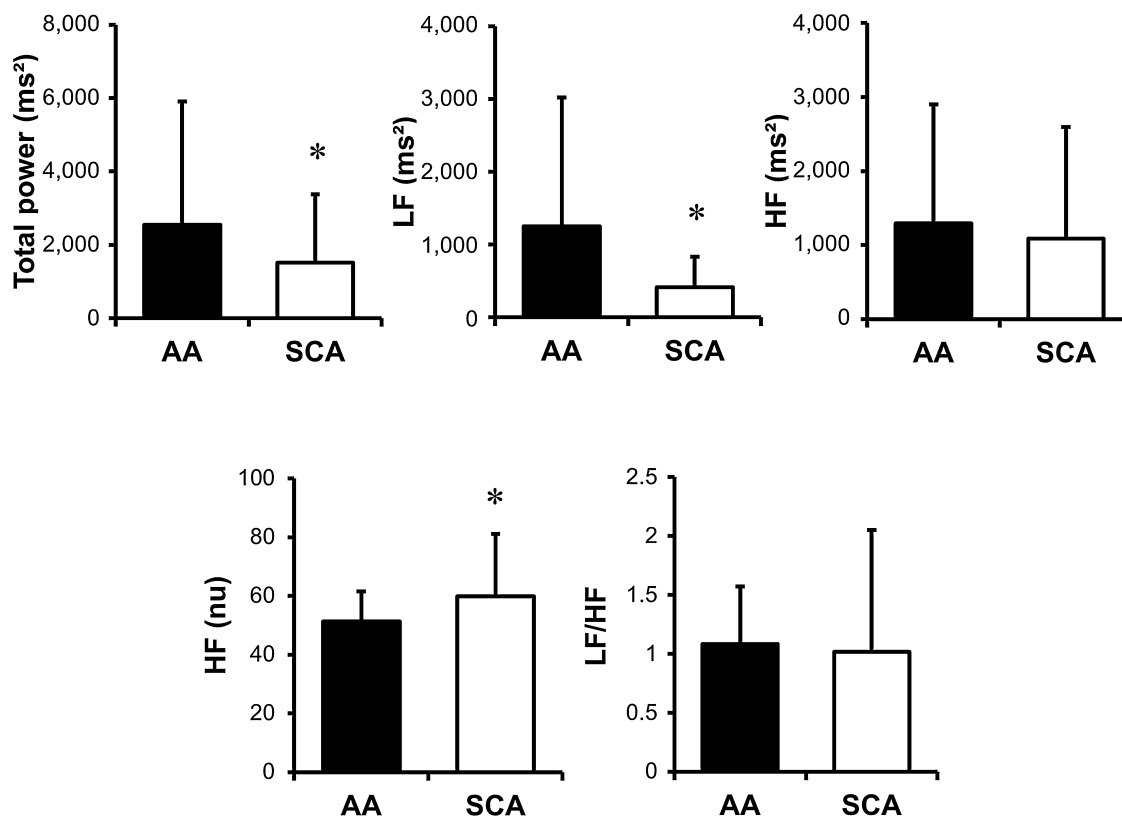


Fig. 2. Spectral domain indices of heart rate variability in SCA and AA children at rest in lying position. TP, total power; LF, low-frequency component; HF, high-frequency component; HF (nu), HF in normalized units. *Significantly different from AA ($P < 0.05$).

contrast, PAEE was not associated with any of the ANS indices in children/adolescents with SCA. As PAEE was lower in SCA than in AA, one may suspect that PAEE is not high enough in individuals with SCA to counter-balance the deleterious effects of the disease on the ANS activity.[3–5,10]

Although the reduced global ANS activity (TP and LF) found in the SCA group is in agreement with previous studies performed in adults with SCA,[3,4,10] we did not find any difference in parasympathetic activity. Nevertheless, separation of the children/adolescents with SCA in two sub-groups according to the median age showed that those older than

15 years old had lower global ANS activity caused by parasympathetic withdrawal in comparison with the youngest patients. Indeed, one may suspect that alterations in the parasympathetic activity would become evident later in life as the disease progresses. This withdrawal promotes a shift of the ANS activity through the sympathetic one, which would be involved in the occurrence of frequent VOC in SCA.[8] During the tilt test, AA and children/adolescents with SCA exhibited a rise in LF power and a drop in HF power, as it is usually the case in the general population.[35] Nevertheless, the decrease in HFnu power was more pronounced in AA than in SCA suggesting that autonomic reactivity was slightly sharper in healthy children as it was suggested in previous works.[6,9]

Nebor et al.[4] showed that adults with SCA with at least three VOC episodes per year (severe group) had a lower HF and higher LF/HF ratio than non-severe patients with SCA, suggesting a role of ANS activity in the modulation of clinical severity in SCA. Our study failed to find any significant association between VOC or ACS rates and ANS indices. One of the main difference between the present study and the one of Nebor et al.[4] is that HRV recordings were performed at night and continuously for more than 5 hr in Nebor's investigation while it was performed for 10 min at daytime in our work. Desaturation has been found to occur frequently during sleeping in SCA[36] which may increase the risks for severe clinical adverse events to occur such as stroke[37] or painful VOC.[38] In the meantime, hypoxia but also hypoxemia are known to be strong modulators of ANS activity by decreasing global HRV and its PNS

TABLE II. Modifications of Indices of Heart Rate Variability (in %) in SCA and AA Children Between the Lying-To-Standing Positions (Head Up Tilt-Test)

	AA	SCA
RRI (ms)	-14 ± 11	-16 ± 9
TP (ms ²)	$+2 \pm 92$	-6 ± 73
LF (ms ²)	$+71 \pm 162$	$+44 \pm 89$
HF (ms ²)	-61 ± 31	$+8 \pm 230$
HF (nu)	-58 ± 14	$-38 \pm 27^*$
LF/HF	$+366 \pm 219$	$+353 \pm 379$

Mean $\pm$ SD. RRI, RR intervals; TP, total power; LF, low-frequency component; HF, high-frequency component. Significantly different from AA * $P < 0.05$.

TABLE III. Total and Physical Activity Energy Expenditures and Heart Rate Variability Indices in SCA and AA Children Separated by Age

	AA		SCA	
	<15 years	≥15 years	<15 years	≥15 years
Sample size (n)	8	7	11	11
Males/females	5/3	2/5	7/4	6/5
TEE (kcal·d ⁻¹)	1,650 ± 318	1,758 ± 303	1,680 ± 164	1,860 ± 315
PAEE (kcal·d ⁻¹)	407 ± 303	420 ± 257	204 ± 163	219 ± 189
PAEE (kcal·d ⁻¹ ·kg ⁻¹)	9.8 ± 6.0	7.4 ± 4.7	5.3 ± 4.9	3.6 ± 2.4
RRI (ms)	766 ± 108	813 ± 142	722 ± 105	729 ± 102
TP (ms ²)	1,847 ± 884	3,234 ± 4,757	2,249 ± 2,281	685 ± 718 ^a
LF (ms ²)	964 ± 502	1,538 ± 2,521	552 ± 523	264 ± 192
HF (ms ²)	883 ± 397	1,696 ± 2,254	1,697 ± 1,846	421 ± 539 ^a
HF (nu)	48.5 ± 4.9	54.2 ± 13.6	70.4 ± 17.6	48.4 ± 19.3 ^a
LF/HF	1.11 ± 0.2	1.06 ± 0.67	0.61 ± 0.81	1.47 ± 1.09 ^a

Mean ± SD. TEE, total energy expenditure; PAEE, physical activity energy expenditure; RRI, RR intervals; TP, total power; LF, low-frequency component; HF, high-frequency component. ^aDifferent from SCA <15 years old.

part and increasing SNS modulation.[2,39,40] Whether nocturnal HRV recordings would have demonstrated differences in ANS activity between children with SCA and AA children and a negative association between ANS activity and VOC or ACS rates in the present study remained unknown and further studies are warranted to address this issue.

Few case reports or animal studies suggest that regular exercise could be beneficial in SCA. Alcorn et al.[41] previously showed that doing exercise after a VOC episode reduced the length of hospitalization and the use of analgesics. Tinti et al.[42] succeeded in reducing pain intensity and improved the quality of life in one SCA patient who followed a training program consisting of aquatic stretching and aerobic exercises. Finally, it was recently shown that 8 weeks of regular physical activity limited oxidative stress and pulmonary endothelial activation in SAD transgenic mice.[18,19] Thus, it is likely that regular moderate physical activity could improve the health status of SCA patients. However, VOC and ACS rates were not associated with PAEE in our study. In several cardiovascular, metabolic and pulmonary diseases, training programs need to be performed at sufficient duration and intensity to provide health benefits to the patients and re-establish their optimal ANS activity.[14,43] The PAEE level of our SCA children/adolescents was probably too low to induce a significant impact on their health. There is a recent growing effort to identify the modalities of training that are safe for patients with SCA[5,44–46] but there is now a need to find the best training modalities which could provide the greatest health benefits in this disease in children and adults.

This study can be considered as a pilot study. The sample size was limited and inclusion of more patients and control participants is necessary to strengthen our findings. Four SCA children were under HU treatment. While inclusion of these patients did not change the results, we acknowledge that the effect of HU on PAEE and HRV remains to be elucidated on a prospective study and in a larger cohort. Moreover, the determination of PAEE was performed by using a questionnaire, which is probably less accurate than direct measurements of daily activities and PAEE using pedometers and/or accelerometers. Finally, this study was not designed to test the effects of anemia,

independently of the effects of HbS, and we therefore, do not know whether the differences observed between the two groups are caused by the anemia or the genetic mutation responsible of SCA. The inclusion of a third group having anemia without the sickle mutation could help in answering this question.

In conclusion, both the level of physical activity and the global ANS activity was reduced in children/adolescents with SCA compared to healthy controls. However, no association was found between these two parameters and the frequency of VOC-like complications in the SCA group. Further research is needed to determine which kind of exercise therapy could be beneficial for SCA population.

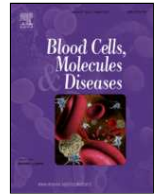
ACKNOWLEDGMENTS

The authors have no competing interests. MR, XW, LDD, MDHD, MP, BT, AP, VT, MEJ, PC designed the research, KC, BM, SJ, SAJ, PC performed the research, KC, BM, SJ, XW, SAJ, and PC analysed the data and KC, BM, SJ, MR, XW, MDHD, BT, AP, OH, SAJ, and PC wrote the paper.

REFERENCES

1. Stauss HM. Heart rate variability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R927–R931.
2. Connes P, Coates TD. Autonomic nervous system dysfunction: Implication in sickle cell disease. *C R Biol* 2013;336:142–147.
3. Inamo J, Connes P, Barthélémy J-C, Dan V, Coates TD, Loko G. Pulmonary hypertension does not affect the autonomic nervous system dysfunction of sickle cell disease. *Am J Hematol* 2009;84:311–312.
4. Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources M-D, Knight-Madden JM, Romana M, Reid H, Barthélémy J-C, Cumming VB, Hue O, Elion J, Reid M, Connes P. Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica* 2011;96:1589–1594.
5. Hedreville M, Charlot K, Waltz X, Sinnaph S, Etienne-Julian M, Soter V, Hue O, Hardy-Dessources M-D, Barthélémy J-C, Connes P. Acute moderate exercise does not further alter the autonomic nervous system activity in patients with sickle cell anemia. *PLoS One* 2014;9:1–5.
6. Romero Mestre JC, Hernández A, Agramonte O, Hernández P. Cardiovascular autonomic dysfunction in sickle cell anemia: A possible risk factor for sudden death? *Clin Auton Res* 1997;7:121–125.
7. Sangkatumvong S, Coates TD, Khoo MCK. Abnormal autonomic cardiac response to transient hypoxia in sickle cell anemia. *Physiol Meas* 2008;29:655–668.
8. Sangkatumvong S, Khoo MCK, Kato R, Detterich J a, Bush A, Keens TG, Meiselman HJ, Wood JC, Coates TD. Peripheral vasoconstriction and abnormal parasympathetic response to sighs and transient hypoxia in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:474–481.
9. Pearson SR, Alkon A, Treadwell M, Wolff B, Quirolo K, Boyce WT. Autonomic reactivity and clinical severity in children with sickle cell disease. *Clin Auton Res* 2005;15:400–407.
10. Knight-Madden JM, Connes P, Bowers A, Nebor D, Hardy-Dessources M-D, Romana M, Reid H, Pichon A, Barthélémy J-C, Cumming VB, Elion J, Reid M. Relationship between acute chest syndrome and the sympatho-vagal balance in adults with hemoglobin SS disease: a case control study. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013;53:231–238.

11. Buchheit M, Platat C, Oujaa M, Simon C. Habitual physical activity, physical fitness and heart rate variability in preadolescents. *Int J Sports Med* 2007;28:204–210.
12. Buchheit M, Simon C, Charloux A, Doutreleau S, Piquard F, Brandenberger G. Relationship between very high physical activity energy expenditure, heart rate variability and self-estimate of health status in middle-aged individuals. *Int J Sports Med* 2006;27:697–701.
13. Buchheit M, Simon C, Charloux A, Doutreleau S, Piquard F, Brandenberger G. Heart rate variability and intensity of habitual physical activity in middle-aged persons. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:1530–1534.
14. Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Intl J Cardiol* 2010;141:122–131.
15. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853–859.
16. Hughson RL, Shoemaker JK. Autonomic responses to exercise: Deconditioning/inactivity. *Auton Neurosci* 2015;188:32–35.
17. Connes P, Machado RF, Hue O, Reid H. Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011;49:151–163.
18. Charrin E, Aufradet E, Douillard A, Romdhani A, Souza De G, Bessaad A, Faes C, Chirico EN, Pialoux V, Martin C. Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice. *Br J Haematol* 2015;168:747–756.
19. Aufradet E, Douillard A, Charrin E, Romdhani A, De Souza G, Bessaad A, Faes C, Bourgeois V, Chirico EN, Canet-Soulas E, Pialoux V, Martin C. Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. *Blood* 2014;123:2745–2747.
20. Faes C, Charrin E, Connes P, Pialoux V, Martin C. Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice. *Am J Hematol* 2015;90:E32–E33.
21. Lamarre Y, Romana M, Waltz X, Lalanne-Mistrih M-L, Tressières B, Divialle-Doumou L, Hardy-Dessources M-D, Vent-Schmidt J, Petras M, Broquiere 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;97:1641–1647.
22. Waltz X, Romana M, Hardy-Dessources M-D, Lamarre Y, Divialle-Doumou L, Petras M, Tarer V, Hierso R, Baltyde K-C, Tressières B, Lalanne-Mistrih M-L, Maillard F, Hue O, Etienne-Julan M, Connes P. Hematological and hemorheological determinants of the six-minute walk test performance in children with sickle cell anemia. *PLoS One* 2013;8:e77830.
23. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* 1996;17:354–381.
24. Tarvainen MP, Niskanen J-P, Lipponen JA, Ranta-Aho PO, Karjalainen PA. Kubios HRV-heart rate variability analysis software. *Comput Methods Programs Biomed* 2014;113:210–220.
25. Billman GE. Heart rate variability - a historical perspective. *Front Physiol* 2011;2:1–13.
26. Larsen PD, Tzeng YC, Sin PYW, Galletly DC. Respiratory sinus arrhythmia in conscious humans during spontaneous respiration. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;174:111–118.
27. Pinna GD, Maestri R, Torunski A, Danilowicz-Szymanowicz L, Szwoch M, La Rovere MT, Raczak G. Heart rate variability measures: A fresh look at reliability. *Clin Sci (Lond)* 2007;113:131–140.
28. Arvidsson D, Slinde F, Hulthén L. Physical activity questionnaire for adolescents validated against doubly labelled water. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:376–383.
29. Buchowski MS, Chen KY, Byrne D, Wang WC. Equation to estimate resting energy expenditure in adolescents with sickle cell anemia. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1335–1344.
30. Buchowski MS, Townsend KM, Williams R, Chen KY. Patterns and energy expenditure of free-living physical activity in adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr* 2002;140:86–92.
31. Kopp-Hoolihan LE, van Loan MD, Mentzer WC, Heyman MB. Elevated resting energy expenditure in adolescents with sickle cell anemia. *J Am Diet Assoc* 1999;99:195–199.
32. Singhal A, Davies P, Wierenga KJ, Thomas P, Serjeant G. Is there an energy deficiency in homozygous sickle cell disease? *Am J Clin Nutr* 1997;66:386–390.
33. Barden EM, Zemel BS, Kawchak DA, Goran MI, Ohene-Frempong K, Stallings VA. Total and resting energy expenditure in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 2000;136:73–79.
34. Al-Rimawi H, Jallad S. Sport participation in adolescents with sickle cell disease. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;6:214–216.
35. Longin E, Dimitriadis C, Shazi S, Gerstner T, Lenz T, König S. Autonomic nervous system function in infants and adolescents: Impact of autonomic tests on heart rate variability. *Pediatr Cardiol* 2009;30:311–324.
36. Halphen I, Elie C, Brousse V, Le Bourgeois M, Allali S, Bonnet D, de Montalembert M. Severe nocturnal and postexercise hypoxia in children and adolescents with sickle cell disease. *PLoS One* 2014;9:e97462.
37. Kirkham FJ, Hewes DK, Prengler M, Wade A, Lane R, Evans JP. Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet* 2001;357:1656–1659.
38. Hargrave DR, Wade A, Evans JPM, Hewes DKM, Kirkham FJ. Nocturnal oxygen saturation and painful sickle cell crises in children. *Blood* 2003;101:846–848.
39. Perini R, Veicsteinas A. Heart rate variability and autonomic activity at rest and during exercise in various physiological conditions. *Eur J Appl Physiol* 2003;90:317–325.
40. Chen Y-C, Lin F-C, Shiao G-M, Chang S-C. Effect of rapid ascent to high altitude on autonomic cardiovascular modulation. *Am J Med Sci* 2008;336:248–253.
41. Alcorn R, Bowser B, Henley EJ, Holloway V. Fluidotherapy and exercise in the management of sickle cell anemia. A clinical report. *Phys Ther* 1984;64:1520–1522.
42. Tinti G, Somera R, Valente FM, Domingos CRB. Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report. *Gen Mol Res* 2010;9:360–364.
43. Prinsloo GE, Rauch HGL, Derman WE. A brief review and clinical application of heart rate variability biofeedback in sports, exercise, and rehabilitation medicine. *Phys Sports Med* 2014;42:88–99.
44. Waltz X, Hedreville M, Sinnaph S, Lamarre Y, Soter V, Lemonne N, Etienne-Julan M, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Hue O, Mouguel D, Hardy-Dessources M-D, Connes P. Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012;52:15–26.
45. Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, Danho C, Diaw M, Sanogo I, Hardy-Dessources M-D, Samb A, Ballas SK, Bogui P. Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2011;154:398–407.
46. Faes C, Balayssac-Siransy E, Connes P, Hivert L, Danho C. Moderate endurance exercise in patients with sickle cell anemia: Effects on oxidative stress and endothelial activation. *Br J Haematol* 2014;164:124–130.
47. Asbeutah A, Gupta R, Al-Saeid O, Ashebu S, Al-Sharida S, Mullah-Ali A, Mustafa NY, Adekile A. Transcranial Doppler and brain MRI in children with sickle cell disease and high hemoglobin F levels. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:25–28.
48. Tantawy AAG, Adly AAM, Ismail EAR, Habeeb NM, Farouk A. Circulating platelet and erythrocyte microparticles in young children and adolescents with sickle cell disease: Relation to cardiovascular complications. *Platelets* 2013;24:605–614.
49. Alvarado AM, Ward KM, Muntz DS, Thompson AA, Rodeghier M, Fernhall B, Liem RI. Heart rate recovery is impaired after maximal exercise testing in children with sickle cell anemia. *J Pediatr* 2014;166:389–393.



Cerebral and muscle microvascular oxygenation in children with sickle cell disease: Influence of hematology, hemorheology and vasomotion

Keyne Charlot^{a, b, c}, Sophie Antoine-Jonville^b, Berenike Moeckesch^{a, b}, Stéphane Jumet^b, Marc Romana^a, Xavier Waltz^{a, b}, Lydia Divialle-Doumdo^d, Marie-Dominique Hardy-Dessources^a, Marie Petras^d, Benoît Tressières^e, Vanessa Tarer^d, Olivier Hue^b, Maryse Etienne-Julan^d, Philippe Connes^{a, f, g, *}

^a Université des Antilles, Inserm, Unité Biologie Intégrée du Globule Rouge, Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge GR-Ex, Paris, France

^b Université des Antilles, Laboratoire ACTES (EA 3596), Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

^c Département Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Environnements Opérationnels, Brétigny-sur-Orge, France

^d CHU de Pointe-à-Pitre, Unité transversale de la Drépanocytose, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

^e Centre Investigation Clinique Antilles Guyane, Inserm/DGOS CIC 1424, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

^f Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

^g Laboratoire Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) EA7424, Equipe "Biologie Vasculaire et du Globule Rouge", Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Sickle cell disease
Near-infrared spectroscopy
Tissue oxygen index
Vasomotion

ABSTRACT

The present study investigated cerebral and muscle hemoglobin oxygen saturation (tissue oxygen index, TOI) in children with sickle cell anemia (SS), sickle cell hemoglobin C disease (SC) and healthy children (AA). TOI was measured by near-infrared spectroscopy (NIRS) and spectral analysis of the TOI variability was used to assess flowmotion and vasomotion. Arterial oxyhemoglobin saturation (SpO₂), hemorheological and hematological parameters were also measured in SS and SC children. Both TOI were lower in SS compared to both AA and SC children, with SC exhibiting lower values than AA children. Cerebral vasomotion expressed in absolute values was enhanced in SS compared to AA and SC children. Muscle vasomotion did not differ between the three groups. Hematocrit, SpO₂ and red blood cell deformability were positively associated with cerebral TOI in SS children. We demonstrated that 1) cerebral and muscle TOI were markedly decreased in SS children while the decrease of TOI was milder in SC children, 2) cerebral TOI level was associated with several biological markers in SS children only and 3) cerebral vasomotion was enhanced in SS, possibly to counterbalance the effects of chronic cerebral hypoxia.

1. Introduction

Microvascular hemoglobin (Hb) oxygen saturation (tissue oxygen index; i.e., TOI) determined by near-infrared spectroscopy (NIRS) in cerebral or muscle tissue is reduced in patients with sickle cell anemia (SS genotype) and to a lesser extent in sickle cell hemoglobin C disease (SC genotype) [1–6]. The low level of hemoglobin and red blood cell deformability have been suggested to explain, at least in part, the reduction in cerebral and muscle TOI in sickle cell disease (SCD), and more particularly in individuals

with SS genotype [6,7]. However, studies looking at brain or muscle oxygenation in SCD were performed in adults at the exception of the study of Quinn & Dowling [7] that included children/adolescents. However, the study of Quinn & Dowling [7] focused on cerebral TOI and whether children with SCD are also characterized by low muscle TOI remains unknown. Several studies investigating physiological and biological parameters involved in SCD pathophysiology have reported large differences between pediatric and adult populations [8–11]. In contrast to adults with SCD [6], factors associated with TOI alterations have been poorly investigated in children with SCD.

Abbreviations: AI, aggregation index; Hb, hemoglobin; NIRS, near-infrared spectroscopy; SCD, sickle cell disease; TOI, tissue oxygen index; EI, elongation index; LDH, lactate dehydrogenase; RBC, red blood cell; SpO₂, arterial oxyhemoglobin saturation.

* Corresponding author at: Laboratoire LIBM EA7424, Equipe "Biologie Vasculaire et du Globule Rouge", Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69100 Villeurbanne, France.

Email addresses: berenike-moeckesch@web.de (B. Moeckesch); marc.romana@wanadoo.fr (M. Romana); xavier.waltz@wanadoo.fr (X. Waltz); lydia.doumdo@chu-guadeloupe.fr (L. Divialle-Doumdo); marie-dominique.hardy-dessources@inserm.fr (M-D Hardy-Dessources); marie.petras@chu-guadeloupe.fr (M. Petras); vanessa.tarer@chu-guadeloupe.fr (V. Tarer); ohue@univ-ag.fr (O. Hue); maryse.etienne-julan@chu-guadeloupe.fr (M. Etienne-Julan); philippe.connes@uiv-lyon1.fr (P. Connes)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.03.015>

Received 31 January 2017; Received in revised form 3 March 2017; Accepted 30 March 2017

Available online xxx

1079-9796/ © 2016 Published by Elsevier Ltd.

Despite significant lower microvascular oxygenation, oxygen consumption was reported to be similar at cerebral [12] and muscle levels [4,13] in patients with SS genotype compared to healthy subjects. The increase in microvascular blood flow [14–16], as well as the decrease of hemoglobin S affinity for oxygen [17], could partially compensate for this reduced microvascular oxygenation to maintain adequate tissue oxygen consumption in patients with SS genotype. Moreover, theoretical analysis suggested that vasomotion can increase blood flow up to 60% compared to steady-state condition [18], further improving tissue oxygenation. Vasomotion is defined as the spontaneous rhythmic contraction and dilation of the muscle components in the small blood vessel walls which generate rhythmic changes in their diameter [19,20]. It can be quantified using spectral analysis of TOI variability over time [4,6,21,22] and contributes to the chronic oscillations of microvascular blood flow; i.e., flowmotion. While preliminary studies indicated higher flowmotion and vasomotion activities at the cerebral level, but not at the muscle level, in adults with SS and SC genotypes compared to healthy (AA) individuals [6], no data is currently available in children/adolescents with SCD.

The aims of this study were 1) to investigate whether the decrease in microvascular oxygenation usually observed in adults with SCD compared to healthy individuals is also observed during childhood/adolescence, 2) to assess the associations between hematological and hemoreological parameters and cerebral and muscle microvascular oxygenation in children with SS and SC genotypes and 3) to compare the flowmotion and vasomotion activities between children/adolescents with SS, SC and AA genotypes. Since the clinical expression of SS disease is usually more severe than in SC disease, we hypothesized that cerebral/muscle TOI would be lower in children/adolescents with SS genotype compared to those with SC or AA genotype.

2. Materials and methods

2.1. Participants' characteristics

Sixty-one age- and ethnicity-matched participants were included in the study: 15 participants with AA genotype, 22 patients with SC genotype and 24 with SS genotype. Patients with SCD's characteristics are displayed in Table 1. These patients were regularly followed by the Sick Cell Unit of Pointe-à-Pitre Hospital (Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France). All participants were aged between 10 and 18 years old and were Afro-Caribbean native from Guadeloupe. The participants with SCD were in clinical steady state at the time of the study (i.e., without vaso-occlusive crisis, acute medical complication or blood transfusion within the last 3 months). Exclusion criteria for all subjects were recent infectious episode (in the last month), positive history of stroke or cerebral vasculopathy. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Re-

Table 1
Characteristics of children/adolescents with AA, SC or SS genotype.

	AA	SC	SS
Sex ratio (M/F)	7/8	9/13	14/10
Age (y)	15.0 ± 2.4	15.1 ± 2.6	15.0 ± 2.4
Height (cm)	162 ± 13	160 ± 11	162 ± 13
Weight (kg)	49 ± 14	50 ± 13	49 ± 14
BMI (kg·m ⁻²)	18.5 ± 3.8	19.2 ± 2.7	18.5 ± 3.8
SpO ₂ (%)		98.3 ± 1.6	95.5 ± 3.3***
Lactate		292 ± 85	546 ± 172***
dehydrogenase (IU)			
Hematocrit (%)		33.0 ± 3.2	25.4 ± 3.8***
RBC deformability at 30 Pa (a.u.)		0.390 ± 0.082	0.384 ± 0.101
RBC aggregation index (%)		46.4 ± 6.7	51.4 ± 8.7*

Mean ± SD. BMI: body mass index; SpO₂: peripheral hemoglobin oxygen saturation; RBC: red blood cells. Different from SC: *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001.

gional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France, registration number: 2009-A00211-56/2013, SAPOTILLE/HYPONAD project). Children and their parents were informed of the purpose and procedures of the study, and both gave written informed consent.

2.2. Design

Participants came in a fasted state at 9:00 a.m. Blood was drawn (for patients with SCD only) by venipuncture into EDTA tubes for hematological (Beckman Coulter, MAXM AL, FL, USA) [23] and hemoreological measurements (red blood cell (RBC) deformability and aggregation) [23,24]. Thirty minutes after a light and standardized breakfast, subjects remained on a comfortable bed in lying position for 10 min in a quiet room with temperature fixed at ~ 24 °C. During this period, they were equipped with 2 NIRS probes (NIRS, NIRO-200, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) on the forehead (at left prefrontal cortex level between Brodmann Area 10 and Brodmann Area 46 to avoid sagittal and frontal sinuses) and on the right forearm (the center of the NIRS probes was placed on the flexor digitorum superficialis muscle at the proximal third of the forearm). Fig. 1 shows the localization of both probes. We chose these localizations since they were previously selected in adults with SCD [6] to be able to compare children and adult values. After this period of stabilization, NIRS measurements were performed at a sampling frequency of 6 Hz. Hemoglobin oxygen saturation (SpO₂) was also obtained by finger pulse oximetry (Oxycon Mobile, Jaeger, Germany).

2.3. NIRS measurements

NIRS techniques have been described elsewhere [25]. Briefly, NIRS is based on the relative transparency of tissue to light in the near-infrared region between 700 nm and 1000 nm, and on the oxygen-dependent absorption changes of hemoglobin. NIRS can be used in SCD patients since the near-infrared spectra absorbance of hemoglobin S is similar to the one of normal hemoglobin [2]. The relative concentration changes of oxygenated hemoglobin (Δ HbO₂), deoxygenated hemoglobin (Δ HHb), total hemoglobin (Δ cHb) and tissue oxyhemoglobin saturation expressed as a tissue oxygenation index (TOI) were measured continuously and simultaneously throughout the experiment using two channels of a three-wavelength (775 nm, 810 nm, 850 nm) high temporal resolution NIRS device. The TOI can be calculated as $(\Delta \text{HbO}_2 / (\Delta \text{HHb} + \Delta \text{HbO}_2)) \times 100$. The TOI value reflects the microvascular oxygen saturation at the local region of muscle or brain situated between emission and detection probes. TOI has been shown to be independent of skull thickness and of the area of the cerebrospinal fluid layer underlying the probes since this variable is measured by spatial resolved spectroscopy [26]. Even if NIRS presents some limitations [27,28], NIRS is now considered as a reliable and widespread method to measure oxygen saturation at rest in brain [29] and muscles [30]. The two probes were firmly attached with an inter-probes distance of 4 cm by means of a medical adhesive (Hamamatsu Photonics, Massy, France). It has been demonstrated that skin pigmentation may interfere at some extent with the quality of NIRS signal in attenuating light reflectance in dark skins [31]. All children were Afro-Caribbean and had homogeneous skin pigmentation: they were classified by the Fitzpatrick scale between V and VI (on a scale ranging from I to VI). Indeed, the differences observed between the three groups were not related to skin color differences.

2.4. Flowmotion and vasomotion

Microvascular blood flow is variable over time for a given subject and this variability reflects microvascular flowmotion and vasomotion activities. In resting condition, the TOI variability mainly reflects blood flow variability assuming that muscle oxygen consumption is constant [20,32,33]. Microvascular oxygenation exhibits spontaneous oscillations in five frequency components [20,32,33]. The TOI signals were linearly detrended (to remove

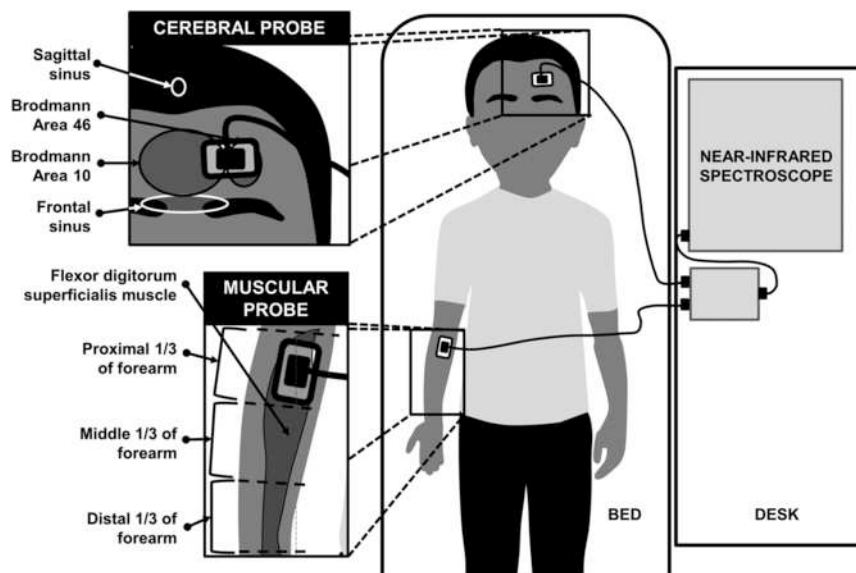


Fig. 1. Localization of the cerebral and muscular near-infrared spectroscopy probes. Participants were equipped with 2 NIRS probes (NIRS, NIRO-200, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) on the forehead (at left prefrontal cortex level between Brodmann Area 10 and Brodmann Area 46 to avoid sagittal and frontal sinuses) and on the right forearm (the center of the NIRS probes was placed on the flexor digitorum superficialis muscle at the proximal third of the forearm).

the effect of very low frequency drifts). The Fast Fourier Transform (Welch's periodogram method - the data were smoothed with a 100 second Hanning window with 50% overlap) was applied on the TOI signal for the evaluation of the total power of the spectrum in the frequency interval 0.005–2 Hz and calculation of the power across 5 band frequencies. It has been demonstrated that interval I (0.005–0.02 Hz) reflects nitric oxide metabolism and/or endothelial function [34–36], interval II (0.02–0.06 Hz) depends on the sympathetic activity of the vessel wall [33], and interval III (0.06–0.20 Hz) corresponds to the myogenic activity [36]. For the high oscillatory activities, interval IV (0.20–0.6 Hz) depends on the breathing frequency and interval V (0.6–2 Hz) is under the influence of heart rate and cardiac output [32]. The whole oscillations recorded (i.e., TOI variability or total power of the spectrum) reflect flowmotion that results from the motion of the blood cells and their interaction with the vessel walls. The low frequency domain (sum of intervals I, II and III) corresponds to the vasomotion activity [32,33].

2.5. Hemorheological parameters

Hematocrit was measured after blood microcentrifugation at 9500g for 10 min (JOUAN-HEMA-C, Saint Herblain, France). Serum lactate dehydrogenase (LDH) concentration was determined by standard biochemical methods.

Hemorheological parameters were measured within the 4 h after sampling and after full re-oxygenation of blood for 10–15 min [24]. The RBC elongation index (EI) values were determined at 30 Pa by laser diffraction analysis (eektactometry) and at 37 °C, using the Laser assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands). The system calculates an average RBC EI. The higher this index, the more deformable the RBCs [24]. We strictly followed the recent methodological recommendations for RBC deformability measurement in SCD by ektactometry [37]. RBC aggregation was determined at 37 °C via syllectometry (i.e., laser backscatter versus time), using the LORCA (RR Mechatronics, Hoom, The Netherlands), after adjustment of hematocrit to 40%. The system calculates an aggregation index (AI) reflecting the extent of RBC aggregation integrated during a time period of 2 min. Hemorheological measurements were performed according to the international guidelines for hemorheological laboratory techniques [24].

2.6. Statistics

Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. After data being tested for the normality of variance (Shapiro-Wilk test), comparisons of TOI, vasomotion and flowmotion between children/adolescents with AA, SC and SS genotypes were performed with parametric or non-parametric tests (one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post-hoc test or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, respectively). For the parameters obtained only in SC and SS, unpaired *t*-test or Mann-Whitney test were performed. Parametric (Pearson) or non-parametric (Spearman) correlation tests, as well as multiple linear regression, were used to test the associations between cerebral or muscle TOI and biological parameters. The significance level was defined as $P < 0.05$ (SPSS, v. 20, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL).

3. Results

3.1. Subjects characteristic, hematological and hemorheological parameters

The data are summarized in Table 1. SpO₂ ($p < 0.001$) and hematocrit ($p < 0.001$) were lower in patients with SS genotype compared to those with SC genotype while lactate dehydrogenase ($p < 0.001$) and RBC aggregation index ($p = 0.049$) were higher. The other parameters listed in the Table 1 were not different between groups.

3.2. Tissue oxygen index

Results are displayed in Fig. 2A and B. Analyses showed a group effect for cerebral and muscle TOI ($p < 0.001$ for both). Post hoc tests revealed that TOI was higher in children with AA genotype compared to those with SC ($p = 0.036$ and 0.009 for cerebral and muscle TOI, respectively) and SS genotypes ($p < 0.001$ for both sites). Moreover, cerebral and muscle TOI were higher in patients with SC genotype compared to those with SS genotype ($p = 0.005$ and 0.047 , respectively).

Hematocrit ($r = 0.55$, $p = 0.008$), SpO₂ ($r = 0.65$, $p = 0.01$) and RBC deformability ($r = 0.42$, $p = 0.018$) were positively and lactate dehydrogenase ($r = -0.52$, $p = 0.017$) negatively correlated with cerebral TOI in patients with SS genotype. Multiple linear regression including both hematocrit and lactate dehydrogenase was tested to evaluate the independent association

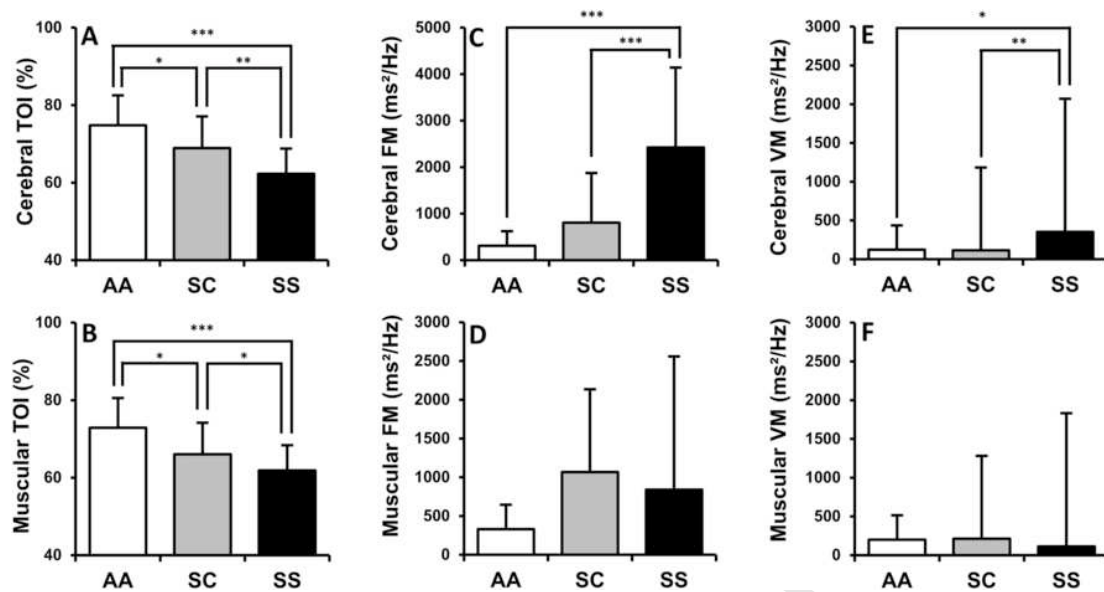


Fig. 2. Cerebral and muscle tissue oxygen index (TOI, A and B), flowmotion (C and D) and vasomotion (E and F) activities in children/adolescents with AA, SC and SS genotypes. Flowmotion is the sum of the power spectral densities of the five intervals and vasomotion is the sum of the power spectral densities of the first three intervals. Mean $\pm$ SD. Significantly differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

of anemia and hemolysis with cerebral TOI. The model was significant ($R^2 = 0.576$) but only hematocrit remained significantly associated (LDH $p = 0.39$ and hematocrit $p < 0.05$). Only hematocrit tended to be positively associated with muscle TOI in children with SS genotype ($r = 0.39$, $p = 0.050$). No correlation was observed in the group with SC genotype.

3.3. Tissue oxygen index variability

As shown in Fig. 2, a group effect was observed for cerebral flowmotion (sum of the five bands, $p < 0.001$) and vasomotion (sum of intervals I, II and III, $p = 0.011$). Cerebral flowmotion (Fig. 2C) and vasomotion (Fig. 2E) activities were higher in children with SS genotype than in those with AA ($p < 0.001$ and $p = 0.027$, respectively) and SC genotypes ($p < 0.001$ and $p = 0.005$, respectively). Muscle flowmotion (Fig. 2D) and vasomotion (Fig. 2F) did not differ between the three groups.

Each of the 5 bands (from I to V) are presented in Fig. 3 in absolute (Fig. 3A and B) and in relative values (i.e. in % of the total power, Fig. 3C and D). Analyses showed that absolute cerebral power spectral density for interval II was higher in children with SS genotype compared to children with SC genotype ($p = 0.019$, Fig. 3A). Moreover, absolute cerebral power spectral densities (Fig. 3A) for intervals III, IV and V were higher in SS than in AA ($p < 0.001$ for all) and SC ($p = 0.002$, $p = 0.001$ and $p = 0.002$, respectively). When expressed in relative values, cerebral power spectral densities for intervals I, II and III were lower in children with SS genotype than in those with AA genotype ($p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p = 0.009$) and cerebral power spectral densities for intervals IV and V were higher ($p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively). Indeed, the relative value of vasomotion activity (sums of I, II and III intervals) was lower in children with SS genotype compared to children with SC ($p = 0.016$) and AA genotypes ($p < 0.001$). Rela-

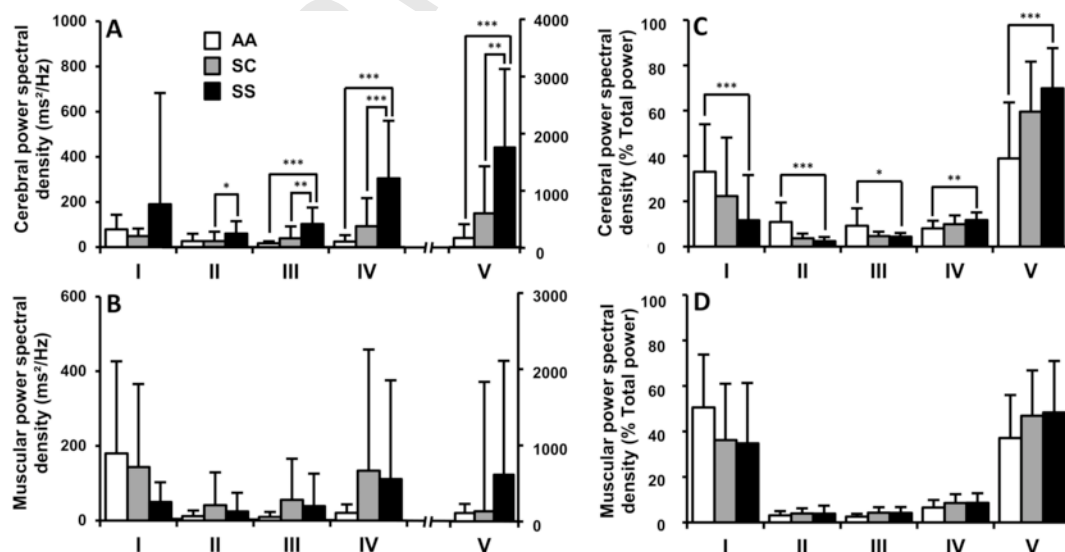


Fig. 3. Absolute (A and B) and relative (C and D) power spectral densities in the five intervals of cerebral and muscular tissue oxygen index variability in children/adolescents with AA, SC and SS genotypes. Each interval has physiological significance: I) vascular endothelium activity, II) local sympathetic activity, III) myogenic activity, IV) effects of respiration and V) transmission to the skin microcirculation of the hemodynamic modifications synchronous with heart activity. Mean $\pm$ SD. Significantly differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

tive vasomotion activity was lower in children with SC genotype than in those with AA genotype ($p = 0.001$).

4. Discussion

In this study, we observed that 1) cerebral and muscle microvascular oxygenation were lower in children/adolescents with SCD compared to children with AA genotype and that patients with SS genotype were more affected than those with SC genotype, 2) cerebral TOI in children with SS genotype was correlated with hematocrit, RBC deformability and SpO_2 and 3) absolute cerebral vasomotion and flowmotion were markedly increased in SS compared to AA and SC children, while no difference was observed at the muscle level.

The lower cerebral and muscle TOI detected in children with SS genotype is in agreement with previous studies performed in adults with SS genotype [4,6]. RBC deformability is a key factor of blood flow through the microcirculation and any decrease affects oxygen transport to tissue [38]. For instance, Parthasarathi and Lipowsky [39] showed that a reduction of RBC deformability in rat cremaster muscle induced a dramatic reduction in tissue oxygenation. While cerebral TOI and RBC deformability were positively correlated in children with SS genotype, as it is the case in adults [6], we found no influence of the degree of RBC deformability on muscle TOI. Although this finding seems surprising, it is in agreement with our previous findings in adults [4]. Further studies are needed to better decipher the underlining mechanisms of the decreased muscle TOI in patients with SS genotype.

The level of cerebral TOI in children with SS genotype was also associated with the hematocrit, indicating that the degree of anemia may affect brain microcirculatory oxygenation. Our findings confirm previous studies from Raj et al. [3] and Quinn & Dowling [7], who demonstrated that patients undergoing transfusion have higher cerebral oxygen saturation than patients without.

Our study also showed that both cerebral and muscle TOI in children/adolescents with SC genotype were lower than in those with AA genotype but higher than in children with SS genotype. Although none of the parameters investigated in this study was associated with brain or muscle oxygenation in children with SC genotype, we found a trend through a positive correlation between hematocrit and cerebral TOI, which reinforces the role of anemia on brain oxygenation in SCD. Although patients with SC genotype, like those with SS genotype, are at risk for developing chronic organ damage with ageing such as retinopathy, osteonecrosis, otologic disorders or glomerulopathy [40,41], they are at lower risk for developing cerebral vasculopathy [42]. Decreased hemolysis, mild anemia and higher brain oxygenation in patients with SC genotype compared to children with SS genotype could partly explain this lower risk. Moreover, the higher muscle TOI found in children with SC genotype compared to children with SS genotype could participate to the higher functional physical exercise abilities usually reported in the former population [43].

Increased vasomotion activity is a way to limit tissue hypoxia [44]. While no difference was observed in muscle vasomotion and flowmotion activities between the three groups, we observed increased activities at the cerebral level in children with SS genotype compared to both children with AA and SC genotype, which is in agreement with a previous study performed in adults with SS genotype [6]. Physiological interpretations of vasomotion modifications are still debated [20]. It was suggested that increased vasomotion could represent a mechanism to compensate for the reduced cerebral TOI in SS [44,45]. It has been demonstrated that vasomotion activity could theoretically increase oxygen delivery to the surrounding tissues up to 8 times compared to a continuous flow [44] and a link was observed between vasomotion activity and oxygen extraction in healthy males [46]. However, when expressed in percentage of the total cerebral power, we observed a lower contribution of the three vasomotion intervals and higher contribution of the two last intervals in the flowmotion activity in children with SS genotype compared to those with AA genotype. Indeed, it seems

that there is an over-representation of the cardiac and respiratory activities (intervals IV and V, respectively) in SS compared to AA children, which is in agreement with the fact that cardiac output is usually elevated in this population.

While cerebral flowmotion and vasomotion activities differed between patients with SCD and individuals with AA genotype, we found no difference at the muscle level between the three groups. Cerebral hemodynamic is very different from muscle hemodynamic. Autoregulation is present in many vascular beds, but is particularly well-developed in the brain, likely due to the need for a constant blood supply and water homeostasis, but the underlying mechanisms are not completely understood [47]. We have no clear hypothesis to explain the difference of vasomotion/flowmotion activities between the two tissues and further studies are needed to adequately address this question.

5. Conclusion

We showed in the present study that children with SCD have decreased cerebral and muscle microvascular oxygenation, as it is the case in adults with SCD. We speculate that anemia, RBC rheology and peripheral Hb oxygenation may play a role in modulating the cerebral microvascular oxygenation in children with SS genotype. In this group, absolute cerebral but not muscular flowmotion and vasomotion were higher than in children with AA and SC genotypes. Increased cerebral vasomotion activity in SS could be an adaptation of the cerebrovascular system to compensate for the chronic cerebral hypoxaemia to limit its deleterious effects on endothelial function.

Funding

This work was supported by the Region of Guadeloupe.

References

- [1] F. Tavakkoli, M. Nahavandi, M.Q. Wyche, O. Castro, Effects of hydroxyurea treatment on cerebral oxygenation in adult patients with sickle cell disease: an open-label pilot study, *Clin. Ther.* 27 (2005) 1083–1088, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.07.002>.
- [2] M. Nahavandi, J.P. Nichols, M. Hassan, A. Gandjbakhche, G.J. Kato, Near-infrared spectra absorbance of blood from sickle cell patients and normal individuals, *Hematology* 14 (2009) 46–48, <http://dx.doi.org/10.1179/102453309X385133>.
- [3] A. Raj, S.J. Bertolone, S. Mangold, H.L. Edmonds, Assessment of cerebral tissue oxygenation in patients with sickle cell disease: effect of transfusion therapy, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 26 (2004) 2792–2783.
- [4] X. Waltz, A. Pichon, N. Lemonne, D. Mouguel, M.-L. Lalanne-Mistrih, Y. Lamarre, et al., Normal muscle oxygen consumption and fatigability in sickle cell patients despite reduced microvascular oxygenation and hemorheological abnormalities, *PLoS One* 7 (2012)e52471 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052471>.
- [5] X. Waltz, M.-D. Hardy-Dessources, N. Lemonne, D. Mouguel, M.-L. Lalanne-Mistrih, Y. Lamarre, et al., Is there a relationship between the hematocrit-to-viscosity ratio and microvascular oxygenation in brain and muscle?, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 59 (2015) 37–43, <http://dx.doi.org/10.3233/CH-131742>.
- [6] X. Waltz, A. Pichon, D. Mouguel, N. Lemonne, M.-L. Lalanne-Mistrih, S. Sinnappah, et al., Hemorheological alterations, decreased cerebral microvascular oxygenation and cerebral vasomotion compensation in sickle cell patients, *Am. J. Hematol.* 87 (2012) 1070–1073, <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23318>.
- [7] C.T. Quinn, M.M. Dowling, Cerebral tissue hemoglobin saturation in children with sickle cell disease, *Pediatr. Blood Cancer* 59 (2012) 881–887, <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.24227>.
- [8] C. Renoux, M. Romana, P. Joly, S. Ferdinand, C. Faes, N. Lemonne, et al., Effect of age on blood rheology in sickle cell anaemia and sickle cell haemoglobin C disease: a cross-sectional study, *PLoS One* 11 (2016)e0158182 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0158182>.
- [9] D. Nebor, A. Bowers, M.-D. Hardy-Dessources, J.M. Knight-Madden, M. Romana, H. Reid, et al., Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation, *Haematologica* 96 (2011) 1589–1594, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.047365>.
- [10] K. Charlot, B. Moeckesch, S. Jumeat, M. Romana, X. Waltz, L. Divialle-Doumido, et al., Physical activity level is not a determinant of autonomic nervous system activity and clinical severity in children/adolescents with sickle cell anemia: a pilot study, *Pediatr. Blood Cancer* 62 (2015) 1962–1967, <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.25604>.
- [11] K. Hadeed, S. Hascoet, M.-P. Castex, C. Munzer, P. Acar, Y. Dulac, Endothelial function and vascular properties in children with sickle cell disease, *Echocardiography* (2014) 1285–1290, <http://dx.doi.org/10.1111/echo.12851>.
- [12] S. Herold, M. Brozovic, J. Gibbs, A.A. Lammertsma, K.L. Leenders, D. Carr, et al., Measurement of regional cerebral blood flow, blood volume and oxygen metabolism in

- patients with sickle cell disease using positron emission tomography, *Stroke* 17 (1986) 692–698.
- [13] C.A. Rowley, A.K. Ikeda, M. Seidel, T.C. Anaeber, M.D. Antalek, C. Seamon, et al., Microvascular oxygen consumption during sickle cell pain crisis, *Blood* 123 (2014) 3101–3104, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-11-533406>.
- [14] P.L. Tharaux, R. Girot, A. Kanfer, J.C. Dussault, J.P. Gaitz, L. Tribout, et al., Cutaneous microvascular blood flow and reactivity in patients with homozygous sickle cell anaemia, *Eur. J. Haematol.* 68 (2002) 327–331.
- [15] V.S. L'Esperance, S.E. Cox, D. Simpson, C. Gill, J. Makani, D. Soka, et al., Peripheral vascular response to inspiratory breath hold in paediatric homozygous sickle cell disease, *Exp. Physiol.* 98 (2013) 49–56, <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2011.064055>.
- [16] K. Charlot, M. Romana, B. Moeckesch, S. Jumeat, L. Divialle-Doumdo, M.-D. Hardy-Dessources, et al., Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: blood viscosity or microvascular dysfunction?, *Blood Cells Mol. Dis.* 56 (2016) 41–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.10.005>.
- [17] M.R. Becklake, S.B. Griffiths, M. McGregor, H.I. Goldman, J.P. Schreve, Oxygen dissociation curves in sickle cell anemia and in subjects with the sickle cell trait, *J. Clin. Invest.* 34 (1955) 751–755, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI103129>.
- [18] M. Ursino, S. Cavalcanti, S. Bertuglia, A. Colantuoni, Theoretical analysis of complex oscillations in multibranched microvascular networks, *Microvasc. Res.* 51 (1996) 229–249, <http://dx.doi.org/10.1006/mvre.1996.0023>.
- [19] M. Rossi, A. Carpi, C. Di Maria, F. Franzoni, F. Galetta, G. Santoro, Skin blood flowmotion and microvascular reactivity investigation in hypercholesterolemic patients without clinically manifest arterial diseases, *Physiol. Res.* 58 (2009) 39–47.
- [20] M. Rossi, A. Carpi, F. Galetta, F. Franzoni, G. Santoro, The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases?, *Biomed. Pharmacother.* 60 (2006) 437–442, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.012>.
- [21] Z. Li, Y. Wang, Y. Li, Y. Wang, J. Li, L. Zhang, Wavelet analysis of cerebral oxygenation signal measured by near infrared spectroscopy in subjects with cerebral infarction, *Microvasc. Res.* 80 (2010) 142–147, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2010.02.004>.
- [22] M.L. Schroeter, O. Schmiedel, D.Y. von Cramon, Spontaneous low-frequency oscillations decline in the aging brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24 (2004) 1183–1191, <http://dx.doi.org/10.1097/01.WCB.0000135231.90164.40>.
- [23] Y. Lamarre, M. Romana, X. Waltz, M.-L. Lalanne-Mistrih, B. Tressières, L. Divialle-Doumdo, et al., Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease, *Haematologica* 97 (2012) 1641–1647, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2012.066670>.
- [24] O.K. Baskurt, M. Boynard, G.C. Cokelet, P. Connes, B.M. Cooke, S. Forconi, et al., New guidelines for hemorheological laboratory techniques, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 42 (2009) 75–97, <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2009-1202>.
- [25] S. Perrey, Non-invasive NIR spectroscopy of human brain function during exercise, *Methods* 45 (2008) 289–299, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jymeth.2008.04.005>.
- [26] K. Yoshitani, M. Kawaguchi, N. Miura, T. Okuno, T. Kanoda, Y. Ohnishi, et al., Effects of hemoglobin concentration, skull thickness, and the area of the cerebrospinal fluid layer on near-infrared spectroscopy measurements, *Anesthesiology* 106 (2007) 458–462.
- [27] S. Jones, S.T. Chiesa, N. Chaturvedi, A.D. Hughes, Recent developments in near-infrared spectroscopy (NIRS) for the assessment of local skeletal muscle microvascular function and capacity to utilise oxygen, *Artery Res.* 16 (2016) 25–33, <http://dx.doi.org/10.1016/j.artres.2016.09.001>.
- [28] K. Yoshitani, Y. Ohnishi, The clinical validity of the absolute value of near infrared spectroscopy, *J. Anesth.* 22 (2008) 502–504, <http://dx.doi.org/10.1007/s00540-008-0671-x>.
- [29] K. Yoshitani, K. Kuwajima, T. Irie, Y. Inatomi, A. Miyazaki, K. Iihara, et al., Clinical validity of cerebral oxygen saturation measured by time-resolved spectroscopy during carotid endarterectomy, *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 25 (2013) 248–253, <http://dx.doi.org/10.1097/ANA.0b013e31827ee0cf>.
- [30] S.N. Vasdekis, I. Tzemailas, C.N. Antonopoulos, S. Mastoraki, G.K. Mantas, A. Lazaris, The value of near-infrared spectroscopy for the assessment of calf muscle function in venous patients, *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.* 5 (2017) 244–253, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvsv.2016.01.006>.
- [31] E. Wassenaar, J. Van den Brand, Reliability of near-infrared spectroscopy in people with dark skin pigmentation, *J. Clin. Monit. Comput.* 19 (2005) 195–199, <http://dx.doi.org/10.1007/s10877-005-1655-0>.
- [32] Z. Li, J.Y. Leung, E.W. Tam, A.F. Mak, Wavelet analysis of skin blood oscillations in persons with spinal cord injury and able-bodied subjects, *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 87 (2006) 1207–1212, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apmr.2006.05.025>.
- [33] T. Söderström, A. Stefanovska, M. Veber, H. Svensson, Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (2003) H1638–H1646, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00826.2000>.
- [34] P. Kandal, A. Stefanovska, M. Veber, H.D. Kvermmo, H.D. Kvermmo, K.A. Kirkeboen, Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandins, *Microvasc. Res.* 65 (2003) 160–171.
- [35] H.D. Kvermmo, A. Stefanovska, K.A. Kirkeboen, K. Kvernebo, Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators, *Microvasc. Res.* 57 (1999) 298–309, <http://dx.doi.org/10.1006/mvre.1998.2139>.
- [36] A. Stefanovska, M. Bracic, H.D. Kvermmo, Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 46 (1999) 1230–1239.
- [37] C. Renoux, N. Parrow, C. Paes, P. Joly, M. Hardeman, J. Tisdale, et al., Importance of methodological standardization for the ektacytometric measures of red blood cell deformability in sickle cell anemia, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 62 (2015) 173–179, <http://dx.doi.org/10.3233/CH-151979>.
- [38] Y. Kikuchi, Q.W. Da, T. Fujino, Variation in red blood cell deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue, *Microvasc. Res.* 47 (1994) 222–231, <http://dx.doi.org/10.1006/mvre.1994.1017>.
- [39] K. Parthasarathi, H.H. Lipowsky, Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability, *Am. J. Phys.* 277 (1999) H2145–H2157.
- [40] F. Lionnet, N. Hammoudi, K.S. Stojanovic, V. Avellino, G. Grateau, R. Girot, et al., Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases, *Haematologica* 97 (2012) 1136–1141, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.055202>.
- [41] N. Lemonne, Y. Lamarre, M. Romana, M.-D. Hardy-Dessources, F. Lionnet, X. Waltz, et al., Impaired blood rheology plays a role in the chronic disorders associated with sickle cell-hemoglobin C disease, *Haematologica* 99 (2014) 74–75, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2014.104745>.
- [42] P. Connes, S. Verlhac, F. Bernaudin, Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia, *Br. J. Haematol.* 161 (2013) 484–498, <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12300>.
- [43] X. Waltz, M. Romana, M.-L. Lalanne-Mistrih, R.F. Machado, Y. Lamarre, V. Tarer, et al., Hematologic and hemorheological determinants of resting and exercise-induced hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease, *Haematologica* 98 (2013) 1039–1044, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2013.083576>.
- [44] V.V. Kisliukhin, Stochasticity of flow through microcirculation as a regulator of oxygen delivery, *Theor. Biol. Med. Model.* 7 (2010) 29, <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4682-7-29>.
- [45] S. Bertuglia, A. Colantuoni, G. Coppini, M. Intaglietta, Hypoxia- or hyperoxia-induced changes in arteriolar vasomotion in skeletal muscle microcirculation, *Am. J. Phys.* 260 (1991) H362–H372.
- [46] C.E. Thorn, H. Kyte, D.W. Slaff, A.C. Shore, An association between vasomotion and oxygen extraction, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301 (2011) H442–H449, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01316.2010>.
- [47] L. Meng, W. Hou, J. Chui, R. Han, A.W. Gelb, Cardiac output and cerebral blood flow, *Anesthesiology* 123 (2015) 1198–1208, <http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0000000000000872>.

Effects of hydroxyurea on blood rheology in sickle cell anemia: A two-years follow-up study

Nathalie Lemonne^a, Berenike Möckesch^b, Keyne Charlot^{c,d}, Yohann Garnier^{c,d},
Xavier Waltz^{c,d}, Yann Lamarre^{c,d}, Sophie Antoine-Jonville^b, Maryse Etienne-Julan^a,
Marie-Dominique Hardy-Dessources^{c,d}, Marc Romana^{c,d} and Philippe Connes^{c,d,f,g,*}

^aUnité Transversale de la Drépanocytose, Hôpital Ricou, CHU de Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^bLaboratoire ACTES, EA3596, Université des Antilles, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^cInserm UMR 1134, Hôpital Ricou, CHU de Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^dLaboratoire d'Excellence GR-Ex « The red cell: from genesis to death », PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^eArmed Forces Biomedical Research Institute, Brétigny-sur-Orge, France

^fLaboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM), EA7424, Equipe Biologie Vasculaire et du Globule Rouge, Université Claude Bernard Lyon 1, COMUE Lyon, Villeurbanne, France

^gInstitut Universitaire de France, Paris, France

Abstract. The aim of the present study was to test the effects of hydroxyurea (HU) therapy on clinical, hematological and hemorheological parameters in adult patients with sickle cell anemia (SCA). Hematological and hemorheological parameters were measured in 28 SCA patients before HU therapy (i.e., baseline) and at 6, 12 and 24 months of treatment. RBC deformability was determined by ektacytometry at 30 Pa. RBC aggregation properties were investigated by light-backscatter method. Blood viscosity was measured at 225 s⁻¹ by a cone-plate viscometer. The rates of vaso-occlusive crises and acute chest syndrome were lower at 1 and 2 years of HU therapy compared to baseline. The proportion of patients with leg ulcers tended to decrease after 2 years of treatment. Hemoglobin oxygen saturation improved with HU therapy. HU therapy induced a decrease of platelet and white blood cell counts and a rise in fetal hemoglobin level and mean cell volume. While hemoglobin concentrations increased under HU, blood viscosity remained unchanged all along the study. RBC deformability increased over baseline values at 6 months of HU therapy and continued to rise until the end of the follow-up period. In conclusion, the improvement in RBC deformability probably compensates the increase of hemoglobin on blood viscosity and participates to the improvement of the clinical status of patients.

Keywords: Hydroxyurea, blood rheology, sickle cell disease, clinical severity

1. Introduction

The presence of sickle hemoglobin (HbS) in red blood cells (RBC) of patients with sickle cell anemia (SCA) is at the origin of their rheological abnormalities. When oxygen is delivered to tissues, HbS polymerization causes the mechanical distortion of RBC. Sickled RBC are rigid, fragile and do not easily flow through the microcirculation, leading to frequent vaso-occlusive crises (VOC) in affected patients [3, 9]. Recurrent HbS polymerization is responsible for numerous RBC and systemic

*Corresponding author: Philippe Connes, Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM), EA7424, Equipe Biologie Vasculaire et du Globule Rouge, Université Claude Bernard Lyon 1, France. E-mails: pconnes@yahoo.fr; philippe.connes@univ-lyon1.fr

physiological abnormalities with variable phenotypic severity [13]. Abnormal blood rheology has been shown to modulate clinical severity and to be involved in several complications of SCA [3, 9, 25]. It has been clearly established that SCA children and adults with increased blood viscosity are at risk for frequent VOC [8, 16, 18, 21].

Hydroxyurea (HU) therapy improves the clinical course of both children and adults with SCA, by reducing the frequency of VOC and acute chest syndrome (ACS) and the number of hospitalizations per year [7, 30]. Beneficial effects of HU on biological parameters include increase of fetal hemoglobin (HbF) and hemoglobin (Hb) levels, RBC deformability and mean cell volume (MCV) [2, 7, 23, 30]. In addition, HU therapy decreases white blood cell (WBC), reticulocyte (RET) and platelet (PLT) counts, hemolytic rate, as well as RET and neutrophils adhesiveness [4, 19, 30]. Nevertheless, because HU therapy increases Hb levels, it has sometimes been postulated that some patients could develop blood hyperviscosity which could slightly attenuate the clinical benefits of this therapy [30]. We recently reported that 1 year of HU therapy did not change blood viscosity despite a rise in Hb in SCA patients [17]. However, it is unknown whether blood viscosity still remained unchanged after prolonged use of HU. The aim of the present study was to evaluate the blood rheological changes that could occur after 2 years of HU therapy in SCA patients. Evaluating the long term effects of HU therapy on blood viscosity is of particular importance, before its use can be extended more widely to patients with cerebral vasculopathy or other genotypes, such as sickle cell hemoglobin-C disease (SC), a sickle cell syndrome marked by higher blood viscosity than SCA patients at steady-state [22, 28].

2. Material and methods

2.1. Patients

Twenty-eight adult SCA patients (37.0 ± 11.6 yrs, 60.2 ± 10.7 kg, 171.5 ± 11.0 cm; 15 males/13 females; 50% with α -thalassemia) regularly followed by the Sickle Cell Center of Pointe-à-Pitre (Academic Hospital, Guadeloupe) were included in this study. At the beginning of the HU therapy all patients were at steady state, i.e., no blood transfusions in the previous three months and absence of acute episodes (infection, VOC, ACS, stroke, priapism) at least one month before inclusion into the study. Frequent hospitalized VOC ($n = 14$) and/or at least one ACS ($n = 10$) event in the preceding year were the main reasons to propose HU therapy to these patients. ACS and VOC were defined as previously described [11, 16]. For the other patients, HU therapy has been recommended because of frequent ambulatory sub-clinical VOC and persistent low hemoglobin levels. None of the participants had renal insufficiency, hepatic insufficiency or human immunodeficiency virus infection. Routine examination before starting HU therapy included the measurements of blood pressures (BP), mean hemoglobin saturation (by pulse oxymetry, SpO_2), heart rate (HR), collection of information regarding the presence of leg ulcers and frequencies of priapism. Patients were also questioned about chronic asthenia and the incidence of dyspnea during daily activities. The same parameters, as well as occurrence of the above complications (VOC, ACS), were prospectively recorded for 1 year and 2 years after the initiation of HU therapy. Before HU therapy (i.e., baseline) and at 6, 12 and 24 months of treatment, blood was collected for biochemical, hematological and hemorheological measurements. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, was approved by the IRB of the Academic Hospital of Pointe à Pitre (DRCI-CHUPAP 230514, Guadeloupe) and written informed consent was obtained from all patients.

2.2. Laboratory methods

Diagnosis of SCA was made by isoelectrofocusing (Multiphor II™ System, GE HEALTH CARE, Buck, UK), and cation-exchange high performance liquid chromatography (VARIANT™, Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, USA). Solubility test was also performed to confirm the presence of HbS. Genomic DNA was isolated from peripheral blood using standard desalting methods. Polymerase Chain Reaction technology (Gap-PCR) was used to detect 7 common α -thalassemia deletions including $-\alpha^{3.7}$ and $-\alpha^{4.2}$ alleles and triplication defects of the α -globin genes [26, 27].

2.3. Hematological and biochemical parameters

Hb concentration, hematocrit (Hct), MCV, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), RET, RBC, PLT, WBC and neutrophils counts were determined using a hematology analyzer (Max M-Retic, Coulter, USA). Lactate dehydrogenase (LDH) level was measured by standard biochemical methods at baseline, 1 year and 2 years of treatment.

2.4. Hemorheological parameters

All hemorheological measurements were carried out within 4 hours of the venipuncture to avoid blood rheological alterations, and after complete oxygenation of the blood [5]. Blood viscosity was determined at native Hct, at 25°C, and at a shear rate of 225 s⁻¹ using a cone/plate viscometer (Brookfield DVII+ with CPE40 spindle, Brookfield Engineering Labs, Natick, MA). RBC deformability was measured at 37°C and 30 Pa by laser diffraction analysis (eektacytometry), using the Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands). The system has been described elsewhere in detail [5]. Briefly, 25 μ l of prepared blood suspension was mixed with 5 ml polyvinylpyrrolidone (PVP; viscosity = 30 cP) and sheared into a Couette system made of glass. The diffraction pattern was analysed by the computer to calculate an elongation index reflecting RBC deformability [5]. RBC aggregation was determined at 37°C via syllectometry, (i.e., laser backscatter versus time, using the LORCA) after adjustment of the Hct to 40%. In addition, the RBC disaggregation threshold (i.e., RBC aggregates strength) was determined using a re-iteration procedure [5]. Seven pre-defined shear rates ranging between 7.5 s⁻¹ and 800 s⁻¹ were applied on the RBC suspension to locate the minimal shear rate needed to prevent RBC aggregation.

2.5. Statistical analysis

Values are expressed as means $\pm$ SD. A One-Way Analysis of Variance (ANOVA) with repeated measurement was used to study the physiological, clinical and biological changes occurring with HU therapy. *Post-hoc* Tukey test was performed to locate the differences. McNemar test was used to test the effects of HU on different clinical parameters after 2 years of treatment. Pearson correlation was performed to test the associations between different variables. Significance level was defined as $p < 0.05$. Analyses were conducted using SPSS (v. 20, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL).

3. Results

3.1. Clinical data

Regarding the clinical course of the disease, HU was effective in 25 of the 28 patients after 1 year of treatment (two patients had ACS and one had VOC) and in 27 of the 28 patients after 2 years therapy (only one patient experienced a VOC episode). The number of VOC and ACS events decreased ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) from 0.81 ± 1.09 and 0.56 ± 0.98 before treatment, respectively, to 0.16 ± 0.52 and 0 after 1 year treatment and 0.04 ± 0.20 and 0 after 2 years treatment. SpO₂ was

Table 1
Routine clinical parameters before, 1 year after and 2 years after HU therapy

	Before	1 year	2 years
SpO ₂ (%)	95.8 ± 3.3	98.1 ± 2.2**	98.5 ± 1.9***
HR (bpm)	76 ± 10	73 ± 8	71 ± 8*
SBP (mmHg)	118 ± 9	118 ± 10	119 ± 12
DBP (mmHg)	65 ± 9	67 ± 9	69 ± 8

SpO₂, hemoglobin saturation; HR, heart rate; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure. Different from before treatment: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

improved compared to baseline values after 1 year and 2 years of HU therapy. HR was decreased after 2 years of HU therapy compared to baseline (Table 1). Blood pressures did not change with HU (Table 1). HU treatment decreased the proportion of patients with chronic asthenia and dyspnea from 64% and 93% to 0% and 21%, respectively ($p < 0.001$ for both). The frequency of patients with frequent priapism did not significantly change with HU (18% vs 4% before and after 2 years of therapy, respectively, $p = 0.25$) but the proportion of patients with leg ulcers tended to decrease (27% vs 13% before and after 2 years of therapy, respectively, $p = 0.06$).

3.2. Hematological and hemorheological parameters

Doses of HU were increased progressively and adjusted for each patient, based on the hematological parameters [30]. The mean doses of HU prescribed to the patients in this study are relatively low because some patients had early sign of hemato-toxicity leading physicians to decrease the doses. At 2 years of therapy, patients received 15.7 ± 5.4 mg/kg/days of HU. HbF (Fig. 1A), Hb (Fig. 1B), MCV (Fig. 1C) and RBC deformability (Fig. 1I) increased at 6 months of HU treatment and remained elevated at 1 and 2 years after the beginning of therapy. RBC deformability at 2 years was also higher than at 6 months of HU therapy (Fig. 1I). WBC (Fig. 1D) and PLT (Fig. 1E) counts, LDH level (Fig. 1F) and RET count (data not shown; $p < 0.001$) were decreased at 6 months, 1 year and 2 years of HU therapy in comparison with baseline. MCHC was decreased after 2 years of HU therapy compared to baseline (data not shown, $p < 0.05$). RBC aggregates strength decreased below baseline values at 6 months but then the difference between baseline and 1 year/2 years of treatments was not significant (Fig. 1H). Blood viscosity (Fig. 1G) and RBC aggregation (data not shown) did not change with HU therapy.

3.3. Correlations

Since the highest changes in the biological values occurred at 6 months of HU therapy, we calculated the percentages of changes between baseline (i.e., before treatment) and 6 months of treatment. Subsequently, correlations were used to test associations between variables using these percentages of changes. Our results showed positive correlation between the changes in HbF level and RBC deformability ($r = 0.46$; $p < 0.05$) and MCV and RBC deformability ($r = 0.56$; $p < 0.01$). In addition, the changes in Hb level positively correlated with the changes in RBC deformability ($r = 0.55$; $p < 0.01$).

4. Discussion

Our study demonstrated that 2 years of HU therapy decreases the severity of anemia in SCA patients without any increase in blood viscosity. Enhanced RBC deformability probably limits the consequences

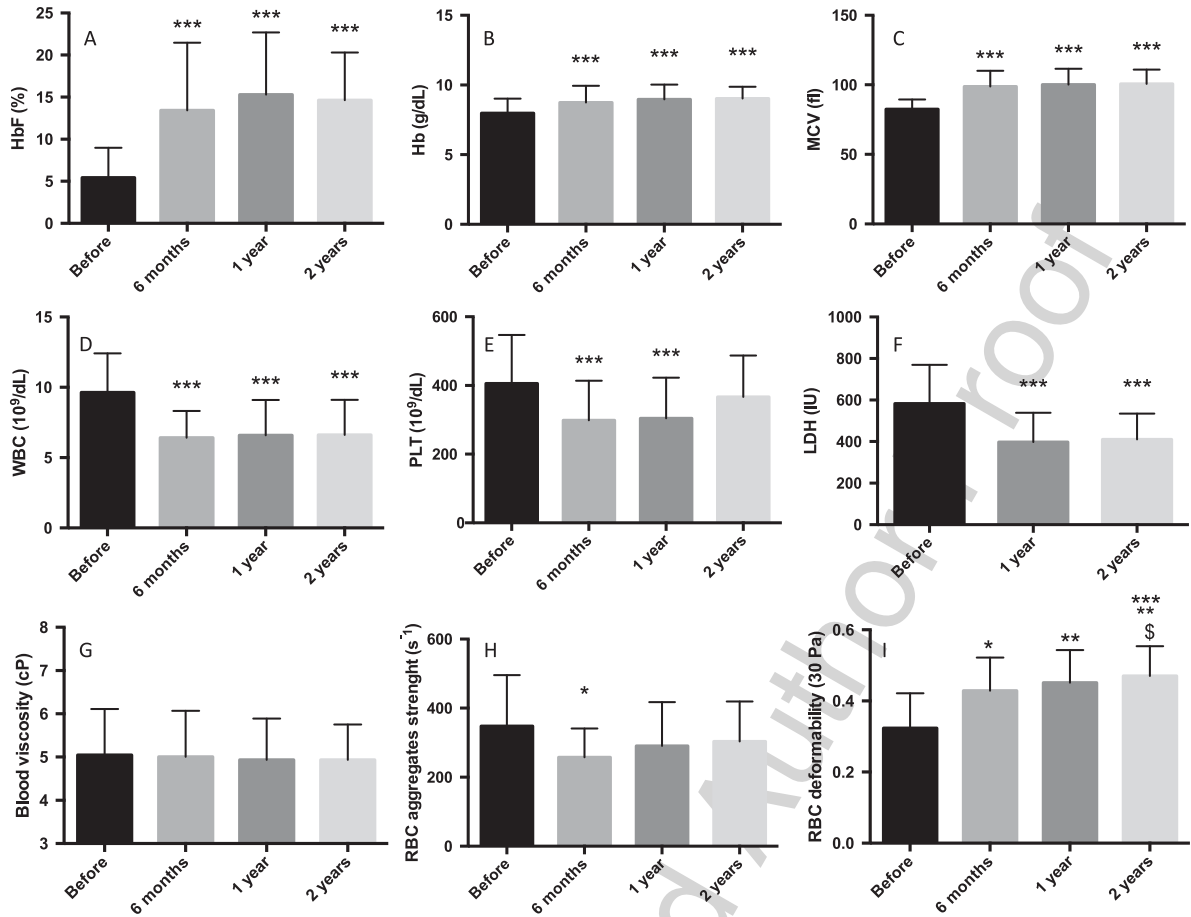


Fig. 1. Effects of HU therapy on HbF level (1A), Hb level (1B), MCV (1C), WBC (1D) and PLT (1E) counts, LDH level (1F), blood viscosity (1G), RBC aggregates strength (1H) and RBC deformability (1I). HbF, Fetal hemoglobin; Hb, hemoglobin; MCV, mean cell volume; WBC, white blood cells; PLT, platelet; LDH, lactate dehydrogenase; RBC, red blood cell. Different from before treatment: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Different from 6 months: \$ $p < 0.05$.

of elevation of hemoglobin level on blood viscosity and participates to the clinical improvements observed in the present study.

In agreement with previous studies, HU significantly decreased the rates of hospitalized VOC and ACS in SCA patients who frequently exhibited these complications [7, 23, 30]. In addition, the proportion of patients with leg ulcers tended to decline. High level of white blood cell and platelet counts increase the risk for vaso-occlusive crises, acute chest syndrome and stroke in SCA [1, 6, 20]. In addition, patients with increased hemolytic rate (as indicated by a high lactate dehydrogenase level) would be prone to develop several complications such as leg ulcers [10] or stroke [12]. Reduced hemoglobin oxygen saturation is clearly a significant risk factor for several complications such as stroke [15] and vaso-occlusive crises [14] because it may promote the activation of platelet and endothelial cells [24]. Indeed, the decrease of reticulocyte, white blood cell and platelet counts, as well as the decrease of hemolysis and the increase of Hb level under HU treatment, have most likely participated to the clinical improvements observed in our study [30]. The decrease of anemia severity and the improvement of hemoglobin oxygen saturation have also probably participated to the reduction of the proportion of patients complaining for chronic asthenia (i.e. fatigue) and dyspnea. HU clearly improved patients' quality of life. Anecdotally, clinical interviews revealed that all patients were able to perform daily

activities, such as physical activity or house cleaning, more easily after two years of HU medication than before.

It is now widely recognized that increasing blood viscosity in SCA patients is a significant risk factor of frequent VOC, both in adults [18] and children [8, 16, 21]. Although previous studies suggested that the rise in hemoglobin level under HU therapy could increase blood viscosity in SCA patients [30], our findings clearly demonstrate that blood viscosity remains unchanged over 2 years of HU therapy. This observation confirms preliminary published data showing that blood viscosity did not change after 1 year of HU therapy compared to baseline values [17]. The absence of rise in blood viscosity in SCA patients receiving HU, may be explained by the large improvement of RBC deformability, the decrease of white blood cell count and the slight decrease of the RBC aggregates strength, which compensate for the increase in hemoglobin. The increase in hemoglobin/hematocrit level without any change in blood viscosity probably improved the oxygen transport and delivery to tissues [29]. Improvement of RBC deformability in HU-treated patients is likely due to 1) the increase in HbF level, which decreases the proportion of abnormal HbS inside the RBCs and its ability to polymerize, 2) the decrease of internal viscosity (MCHC) and 3) high hydration status of RBCs, as noted by the increase in MCV (and the decrease in MCHC). As a consequence, RBCs are less fragile and survive longer in the circulation, leading to a reduction of anemia.

In conclusion, we demonstrated that HU therapy improves the hematological profile and RBC rheology in SCA patients, without any deleterious effects on blood viscosity, which may explain why this treatment provides large clinical benefits especially for SCA patients suffering from frequent vaso-occlusive like episodes. Moreover, our findings suggest that the biological effects of HU are at their maximum at 6 months of treatment and then remain stable.

Acknowledgments

K.C., X.W. and Y.L. were funded by the Region of Guadeloupe.

Conflict-of-interest disclosure

No conflict of interest.

References

- [1] R. Antonucci, R. Walker, J. Herion and E. Orringer, Enhancement of sickle erythrocyte adherence to endothelium by autologous platelets, *Am J Hematol* **34** (1990), 44–48.
- [2] S.K. Ballas, G.J. Dover and S. Charache, Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo, *Am J Hematol* **32** (1989), 104–111.
- [3] S.K. Ballas and N. Mohandas, Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation* **11** (2004), 209–225.
- [4] P. Bartolucci, V. Chaar, J. Picot, D. Bachir, A. Habibi, C. Fauroux, F. Galacteros, Y. Colin, C. Le Van Kim and W. El Nemer, Decreased sickle red blood cell adhesion to laminin by hydroxyurea is associated with inhibition of Lu/BCAM protein phosphorylation, *Blood* **116** (2010), 2152–2159.
- [5] O.K. Baskurt, M. Boynard, G.C. Cokelet, P. Connes, B.M. Cooke, S. Forconi, F. Liao, M.R. Hardeman, F. Jung, H.J. Meiselman, G. Nash, N. Nemeth, B. Neu, B. Sandhagen, S. Shin, G. Thurston and J.L. Wautier, New guidelines for hemorheological laboratory techniques, *Clin Hemorheol Microcirc* **42** (2009), 75–97.
- [6] O. Castro, D.J. Brambilla, B. Thorington, C.A. Reindorf, R.B. Scott, P. Gillette, J.C. Vera and P.S. Levy, The acute chest syndrome in sickle cell disease: Incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease, *Blood* **84** (1994), 643–649.

- [7] S. Charache, M.L. Terrin, R.D. Moore, G.J. Dover, F.B. Barton, S.V. Eckert, R.P. McMahon and D.R. Bonds, Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia, *N Engl J Med* **332** (1995), 1317–1322.
- [8] K. Charlot, M. Romana, B. Moeckesch, S. Jumeat, X. Waltz, L. Divialle-Doumido, M.D. Hardy-Dessources, M. Petras, B. Tressieres, V. Tarer, O. Hue, M. Etienne-Julan, S. Antoine-Jonville and P. Connes, Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: Blood viscosity or microvascular dysfunction? *Blood Cells Mol Dis* **56** (2016), 41–45.
- [9] P. Connes, T. Alexy, J. Dettlerich, M. Romana, M.D. Hardy-Dessources and S.K. Ballas, The role of blood rheology in sickle cell disease, *Blood Rev* **30** (2016), 111–118.
- [10] P. Connes, Y. Lamarre, M.D. Hardy-Dessources, N. Lemonne, X. Waltz, D. Mougenel, M. Mukisi-Mukaza, M.L. Lalanne-Mistrih, V. Tarer, B. Tressieres, M. Etienne-Julan and M. Romana, Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers, *PLoS One* **8** (2013), e79680.
- [11] P. Connes, Y. Lamarre, X. Waltz, S.K. Ballas, N. Lemonne, M. Etienne-Julan, O. Hue, M.D. Hardy-Dessources and M. Romana, Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia, *Br J Haematol* **165** (2014), 564–572.
- [12] P. Connes, S. Verlhac and F. Bernaudin, Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia, *Br J Haematol* **161** (2013), 484–498.
- [13] S.H. Embury, The clinical pathophysiology of sickle cell disease, *Annu Rev Med* **37** (1986), 361–376.
- [14] D.R. Hargrave, A. Wade, J.P. Evans, D.K. Hewes and F.J. Kirkham, Nocturnal oxygen saturation and painful sickle cell crises in children, *Blood* **101** (2003), 846–848.
- [15] F.J. Kirkham, D.K. Hewes, M. Prengler, A. Wade, R. Lane and J.P. Evans, Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease, *Lancet* **357** (2001), 1656–1659.
- [16] Y. Lamarre, M. Romana, X. Waltz, M.L. Lalanne-Mistrih, B. Tressieres, L. Divialle-Doumido, M.D. Hardy-Dessources, J. Vent-Schmidt, M. Petras, C. Broquere, F. Maillard, V. Tarer, M. Etienne-Julan and P. Connes, Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica* **97** (2012), 1641–1647.
- [17] N. Lemonne, K. Charlot, X. Waltz, S.K. Ballas, Y. Lamarre, K. Lee, R. Hierso, C. Connes, M. Etienne-Julan, M. Romana and P. Connes, Hydroxyurea treatment does not increase blood viscosity and improves red blood cell rheology in sickle cell anemia, *Haematologica* **100** (2015), e383–386.
- [18] D. Nebor, A. Bowers, M.D. Hardy-Dessources, J. Knight-Madden, M. Romana, H. Reid, J.C. Barthelemy, V. Cumming, O. Hue, J. Elion, M. Reid, P. Connes and C.S. Group, Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation, *Haematologica* **96** (2011), 1589–1594.
- [19] M.H. Odievre, V. Bony, M. Benkerrou, C. Lapoumeroulie, C. Alberti, R. Ducrocq, E. Jacqz-Aigrain, J. Elion and J.P. Cartron, Modulation of erythroid adhesion receptor expression by hydroxyurea in children with sickle cell disease, *Haematologica* **93** (2008), 502–510.
- [20] K. Ohene-Frempong, S.J. Weiner, L.A. Sleeper, S.T. Miller, S. Embury, J.W. Moohr, D.L. Wethers, C.H. Pegelow and F.M. Gill, Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: Rates and risk factors, *Blood* **91** (1998), 288–294.
- [21] C. Renoux, P. Connes, E. Nader, S. Skinner, C. Faes, M. Petras, Y. Bertrand, N. Garnier, D. Cuzzubbo, L. Divialle-Doumido, K. Kebaili, C. Renard, A. Gauthier, M. Etienne-Julan, G. Cannas, C. Martin, M.D. Hardy-Dessources, V. Pialoux, M. Romana and P. Joly, Alpha-thalassaemia promotes frequent vaso-occlusive crises in children with sickle cell anaemia through haemorheological changes, *Ped Blood Cancer* (In press).
- [22] C. Renoux, M. Romana, P. Joly, S. Ferdinand, C. Faes, N. Lemonne, S. Skinner, N. Garnier, M. Etienne-Julan, Y. Bertrand, M. Petras, G. Cannas, L. Divialle-Doumido, E. Nader, D. Cuzzubbo, Y. Lamarre, A. Gauthier, X. Waltz, K. Kebaili, C. Martin, A. Hot, M.D. Hardy-Dessources, V. Pialoux and P. Connes, Effect of age on blood rheology in sickle cell anaemia and sickle cell haemoglobin C disease: A cross-sectional study, *PLoS One* **11** (2016), e0158182.
- [23] G.P. Rodgers, G.J. Dover, C.T. Noguchi, A.N. Schechter and A.W. Nienhuis, Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea, *N Engl J Med* **322** (1990), 1037–1045.
- [24] B.N. Setty, M.J. Stuart, C. Dampier, D. Brodecki and J.L. Allen, Hypoxaemia in sickle cell disease: Biomarker modulation and relevance to pathophysiology, *Lancet* **362** (2003), 1450–1455.
- [25] M. Silva, S. Vargas, A. Coelho, A. Dias, T. Ferreira, A. Morais, R. Maia, P. Kjollerstrom, J. Lavinha and P. Faustino, Hemorheological alterations in sickle cell anemia and their clinical consequences - The role of genetic modulators, *Clin Hemorheol Microcirc* **64** (2016), 859–866.
- [26] A.S. Tan, T.C. Quah, P.S. Low and S.S. Chong, A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia, *Blood* **98** (2001), 250–251.
- [27] V. Tarer, M. Etienne-Julan, J.P. Diara, M.S. Belloy, M. Mukizi-Mukaza, J. Elion and M. Romana, Sickle cell anemia in Guadeloupean children: Pattern and prevalence of acute clinical events, *Eur J Haematol* **76** (2006), 193–199.

- [28] J. Tripette, T. Alexy, M.D. Hardy-Dessources, D. Mougénel, E. Beltan, T. Chalabi, R. Chout, M. Etienne-Julan, O. Hue, H.J. Meiselman and P. Connes, 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** (2009), 1060–1065.
- [29] X. Waltz, M.D. Hardy-Dessources, N. Lemonne, D. Mougénel, M.L. Lalanne-Mistrih, Y. Lamarre, V. Tarer, B. Tressières, M. Etienne-Julan, O. Hue and P. Connes, Is there a relationship between the hematocrit-to-viscosity ratio and microvascular oxygenation in brain and muscle? *Clin Hemorheol Microcirc* **59** (2015), 37–43.
- [30] R.E. Ware, How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia, *Blood* **115** (2010), 5300–5311.

~ *The End* ~

Songtext Follow The Sun (Xavier Rudd)

Follow, follow the sun
and which way the wind blows
when this day is done.

Breath, breath in the air.
Set your intentions.
Dream with care.

Tomorrow is a new day for everyone,
a brand new moon, brand new sun.

So follow, follow the sun,
the direction of the bird,
the direction of love.

RESUME

La Drépanocytose est une maladie génétique caractérisée par la présence d'une hémoglobine anormale. Il en résulte des nombreuses complications aiguës et chroniques, notamment résultant de phénomènes vaso-occlusifs. Dans la population générale, la réserve vasomotrice est indispensable pour compenser des perturbations du flux sanguin et normaliser les résistances vasculaires. Dans le cadre de la Drépanocytose, peu d'études ont étudié la fonction vasculaire chez les enfants drépanocytaires particulièrement en ce qui concerne les enfants drépanocytaires hétérozygotes (SC). Nos résultats, réalisés sur une cohorte pédiatrique antillaise, démontrent que les fonctions micro-et macrovasculaires étaient altérées chez les enfants drépanocytaires homozygotes (SS) et chez les enfants SC par rapport aux enfants non malades. Ainsi il semble que les patients drépanocytaires présentent, et ce dès le plus jeune âge, une défaillance vasculaire marquée. Plusieurs facteurs semblent être impliquer : (1) l'activation endothéliale chronique, (2) la faible biodisponibilité en monoxyde d'azote causée par l'installation d'un état du stress oxydatif et nitrosatif chronique, (3) l'altération du système nerveux autonome avec un risque vasoconstricteur croissant avec l'âge, (4) la défense antioxydante sur-sollicitée et (5) le faible niveau d'activité physique qui n' permet pas d'apporter des effets bénéfiques sur la fonction vasculaire. Cependant le degré de dysfonction vasculaire ne semble pas moduler la sévérité clinique. En outre, nos résultats indiquent que la dysfonction vasculaire était plus sévère chez les enfants SS comparé aux enfants SC. Le faible taux d'hémolyse et le moindre stress oxydatif, pourraient expliquer la meilleure fonction vasculaire chez les enfants SC. Cette interaction entre stress oxydatif et hémolyse semble jouer un rôle clefs dans le cercle vicieux de la physiopathologie drépanocytaire.

Mots clefs : Drépanocytose, fonction vasculaire, stress oxydant, hémolyse, monoxyde d'azote

ABSTRACT

Sickle cell disease is the most common genetic disease that affects hemoglobin. The abnormal hemoglobin, called sickle hemoglobin or hemoglobin S, leads to loss in red blood cell functionality, which results in blood flow alterations, painful vaso-occlusive crises, tissue damage and chronic organ dysfunction. Because of considerable heterogeneity in clinical outcomes, its complex pathophysiology is still not totally understood. For many decades it was widely assumed that blood disorders were the sole cause of vaso-occlusion. More recently blood vessel dysfunction also seems to be involved. It is unclear whether vascular function is affected similarly in children with sickle cell anaemia (SS) and children with sickle hemoglobin C (SC) disease. This study with a cohort of Guadeloupean children demonstrated that microvascular reactivity is impaired already in sickle cell SS and SC children compared to healthy children. Divers biological and physiological analysis revealed that there are many interacting factors, all of which may contribute to vasculopathy: (1) chronic endothelial stress due to elevated blood flow level, (2) reduced nitric oxide bioavailability due to chronic hemolysis and oxidative stress, (3) altered autonomic nervous system activity with increased vasoconstrictor activity, (4) saturated antioxidant activity and (5) limited physical activity, known to improve vascular function. In this children cohort, vascular impairments were not associated to clinical severity. However vascular dysfunction seems to be exacerbated in SS children. Mild hemolysis in SC, compared to SS, may limit oxidative and nitrosative stress and could explain the better preserved microvascular function in this group. Learning more about the progress of vascular dysfunction in sickle cell disease seems to be essential. In advanced state it may possible seriously worsen clinical severity.

Keywords: Sickle cell, Vascular function, oxidative stress, hemolysis, Nitric oxide